

ANALECTA VETERINARIA



ISSN 0365514-8 Versión impresa
ISSN 1514-2590 Versión electrónica
ISSN 1666295-4 Versión CD-ROM

Publicación de la
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Autoridades
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

Decano

Dr. Marcelo I. Pecoraro

Vicedecana

Dra. Sara I. Williams

Secretaria de Asuntos Académicos

Dra. Vanina L. Cambiaggi

Secretario de Posgrado

Dr. Rodolfo L. de la Sota

Secretaria de Ciencia y Técnica

Dra. María C. Venturini

Secretaria de Extensión

Dra. Alicia Antonini

Secretaria de Asuntos Estudiantiles

Med. Vet. Ana Belén Scuffi

ANALECTA VETERINARIA

Director

Dr. Enrique L. Portiansky
Universidad Nacional de La Plata

Consejo Editorial

Editor Responsable

Dr. Marcelo I. Pecoraro
Universidad Nacional de La Plata

Editora Asociada

Dra. María C. Venturini
Universidad Nacional de La Plata

Coordinación Editorial

Dr. Julio R. Idiart
Universidad Nacional de La Plata

Dra. Cecilia M. Galosi

Universidad Nacional de La Plata

Asistente Editorial

Dr. Germán E. Metz
Universidad Nacional de La Plata

Secretaría de Redacción

Dr. Gastón Moré
Universidad Nacional de La Plata

Dra. Carla García Mitacek

Universidad Nacional de La Plata

ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol. 39 N° 1, 2019

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

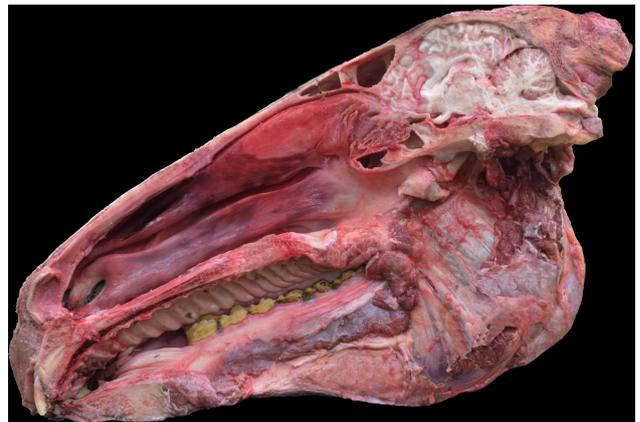


Foto de tapa: Imagen de una cabeza equina para la observación de los sitios anatómicos de la cavidad nasal. Ferreira *et al.*

Acerca de ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA (ANALECTA VET) es una revista de publicación semestral (cubre los meses de enero/junio y julio/diciembre) y constituye el órgano oficial de comunicación científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Se reciben para su consideración trabajos que versen acerca de cualquiera de las áreas de las Ciencias Veterinarias, generados por profesionales de esta u otras Unidades Académicas, entes nacionales o de la actividad privada, escritos en español o en inglés.

Todos los trabajos publicados en ANALECTA VETERINARIA son sometidos a revisión con modalidad doble ciego por parte de expertos del área de conocimiento que no pertenecen a las instituciones de origen del trabajo recibido.

About ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA is a biannual publication of the School of Veterinary Sciences of the National University of La Plata, Argentina. It is committed to the diffusion of scientific reports in the field of the Veterinary Sciences, generated both in this and other institutions. All works are subjected to double-blind review.

ISSN 1514-2590 Versión en línea

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

Registro Propiedad Intelectual 77383

Dirección postal: 60 y 118 (B1900AVW)

La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA

Comité Científico

Dr. José I. Aguirre

Department of Physiological Sciences, College of Veterinary Medicine, University of Florida, USA

Dra. María Barrandeguy

Instituto de Virología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVYA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina

Ph.D. Julián A. Bartolomé

Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam), Argentina

Dr. Carlos Campero

Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Argentina

Dr. Rodolfo Cantet

Mejoramiento Genético Animal, Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

Ph.D. Eduardo R. Cobo

Production Animal Health, Veterinary Medicine, University of Calgary, Canada

Dr. Guillermo M. Denegri

Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, Instituto de Investigaciones en Producción, Salud y Ambiente (IIPROSAM), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Dr. Eduardo J. Gimeno

Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Dra. Nélide V. Gómez

Clínica Médica de Pequeños Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

Ph.D. Alberto A. Guglielmone

Laboratorio de Parasitología, Departamento de Sanidad Animal, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina

Dr. Carlos Lanusse

Fisiología y Farmacología Veterinaria, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Argentina

Dr. Antonio Javier Masot Gómez-Landero

Anatomía y Anatomía Patológica Comparada, Departamento de Medicina Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Extremadura, España

Dr. Dadín Prando Moore

Patología Veterinaria, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); Unidad Integrada Balcarce, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Me. Eduardo V. Moras

Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

Dr. Hugo H. Ortega

Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (UNL); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Ph.D. Luis M. Ortega Mora

Grupo SALUVET, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España

Ph.D. Pablo E. Piñeyro

Veterinary Diagnostic & Production Animal Medicine, Veterinary Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, USA

Dr. Martí Pumarola i Batle

Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Barcelona, España

Dr. Manuel Quezada Orellana

Departamento de Patología y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chile

Dr. Francisco Reynaldi

Micología Médica e Industrial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Dr. Franklin Riet-Correa

Plataforma de Salud Animal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), INIA-La Estanzuela, Uruguay

Dr. Luis E. Samartino

Instituto de Patobiología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVYA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); Microbiología, Carrera de Veterinaria, Universidad del Salvador (USAL), Argentina

Dra. Analía I. Seoane

Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Dra. Irma E. Sommerfelt

Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

Dr. Nestor O. Stanchi

Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de La Plata (UNLP), Argentina

Ph.D. José M. Verdes García

Departamento de Patología, Área Patología y Departamento de Biología Molecular y Celular, Área Biofísica, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay

Equipo técnico

Revisión del idioma inglés: PhD. Magdalena Rambeaud
Maquetación: Dr. Enrique L. Portiansky

ANALECTA

Pronunciación: «a-n&l-'ek-t&»

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

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

Opinions expressed by authors do not necessarily reflect those of this journal, nor those of their sponsoring entities or the institutions to which the authors belong.

El uso de nombres comerciales tiene como único objetivo facilitar la identificación de los productos mencionados 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.

ANALECTA VETERINARIA ha sido editada, desde 1905, por la Facultad de Ciencias Veterinarias, inicialmente con el nombre de Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de La Plata, pasando a denominarse Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria, desde 1922, y luego, a partir de 1959, como Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Finalmente, desde 1969, la revista adquirió su actual denominación. De esta manera, nuestra revista ha cumplido más de 100 años de ininterrumpida edición. Actualmente se publica sólo en su versión *en línea* (ISSN 1514-2590).

Licencia



La obra de los autores se pondrá a disposición del público para que haga de ella un uso justo y respetuoso de los derechos de autor, cumpliendo las condiciones internacionales de la licencia de uso *Creative Commons CC-BY-NC-ND*. Este tipo de licencia permite a otros descargar la obra y compartirla, siempre y cuando se dé crédito a los autores, pero no permite cambiarlas de forma alguna ni usarlas comercialmente.

ANALECTA VETERINARIA meets the international conditions of the Creative Commons CC-BY-NC-ND license. This type of license allows others to download the work and share it, as long as credit is given to the authors, but it does not allow to change them in any way or use them commercially.

Citación de la versión en línea

La citación de los artículos aparecidos en la versión electrónica de ANALECTA VETERINARIA deberá seguirse según el siguiente ejemplo:

Durante E, Marcos A, Ayerbe M, Chiricosta A, Segato L, Donato ME, Capellino F, D'Alessio F, Piskorz A, Carballo Longo M. 2017. Prevalencia de anticuerpos contra virus de influenza equina en equinos deportivos de la República Argentina durante 2015 y 2016. *Analecta Veterinaria*. 37(2):25-32. doi: 10.24215/15142590e013

ANALECTA VETERINARIA está indizada en:



Acceso en línea a ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA puede ser recuperada gratuitamente en internet en el repositorio institucional SeDiCi UNLP:

<http://sedici.unlp.edu.ar>

A partir del volumen 36(2), 2016, también se puede acceder desde el Portal de Revistas de la UNLP:

<http://revistas.unlp.edu.ar/analecta>

Si desea consultar los volúmenes previos (1969 en adelante) debe dirigirse a la siguiente dirección electrónica:

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

A partir del Volumen 18, los números de la revista se encuentran a disposición 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 esta posea una resolución mínima de 600 x 600 dpi.

ANALECTA VETERINARIA can be downloaded in PDF file format and can be printed on any printer that allows to differentiate grayscale or colors.

Evaluadores de trabajos de ANALECTA VETERINARIA

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

Se invita a todos los potenciales evaluadores a registrarse en el Portal de Revistas de la UNLP, en la siguiente dirección electrónica:

<https://revistas.unlp.edu.ar//user/register>

Todos los trabajos publicados en ANALECTA VETERINARIA son sometidos a revisores externos. El Consejo Editorial se reserva el derecho de editar los artículos para clarificarlos y de modificarles el formato para adecuarlos al estilo de ANALECTA VETERINARIA.

All articles published in ANALECTA VETERINARIA are submitted to external scientific reviewers. The Editorial Staff reserves the right to edit articles for clarity and to modify the format to fit the publication style of ANALECTA VETERINARIA.

Contacto

Para cualquier comunicación oficial dirigirse al Sr. Director de la Revista ANALECTA VETERINARIA a la dirección: analecta@fcv.unlp.edu.ar

For any official communication, please contact the Director of ANALECTA VETERINARIA at: analecta@fcv.unlp.edu.ar

Nota editorial

Un paso más, adelante

doi.org/10.24215/15142590e031

1

Trabajos de investigación / Research works

Seroprevalencia de paratuberculosis bovina mediante la prueba de ELISA urea en rodeos de cría y de leche con sospecha de la enfermedad, localizados en la provincia de Buenos Aires, Argentina

Seroprevalence of bovine paratuberculosis with the urea ELISA test in suspicious breeding and milk herds from Buenos Aires province, Argentina

ALVARADO PINEDO MF, DI PAOLO LA, SOSA PS, ROMERO MA, PERALTA LM, COSTA EF, TRAVERÍA GE

doi.org/10.24215/15142590e032

2-9

Artículos de revisión / Reviews

Vía intranasal: una alternativa para la administración de fármacos de acción central en equinos

Intranasal drug delivery: an alternative for the administration of central acting drugs in horses

FERREIRA V, VELLOSO MI, VITA M, LANDONI MF

doi.org/10.24215/15142590e033

10-20

De reactivo biológico al animal sintiente: el bienestar animal como cambio de paradigma en la investigación biomédica y su impacto en los resultados

From biological reagent to sentient animal: animal welfare as a paradigm shift in biomedical research and its impact on results

MASCHI FA, CARBONE C, FERRARI HR

doi.org/10.24215/15142590e034

21-31

Descripciones de casos / Case reports

Descripción de un caso de mieloencefalitis equina por protozoos (EPM) en Argentina

Case report of equine protozoal myeloencephalitis (EPM) in Argentina

MORÉ GASTÓN, MONINA MARTA, GIROTTI GABRIELA,

IDIART JULIO ROBERTO, VENTURINI LUCILA, VENTURINI MARÍA CECILIA

doi.org/10.24215/15142590e035

32-36

Información para autores/as

37-44

Information for authors

45-51

Un paso más, adelante

ANALECTA VETERINARIA se renueva con cada volumen, logrando, de esta manera, mayor visibilidad entre sus lectores habituales y los que día a día se van sumando. Nuevos integrantes se avienen a colaborar en el proceso editorial por la simple razón de devolver a la Facultad de Ciencias Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata todo lo que la institución les brindó en sus pasos por las aulas o los laboratorios.

En los últimos volúmenes de la revista hemos recibido casi el 100% de trabajos con autores provenientes de instituciones ajenas a nuestra Universidad. Esto nos llena de orgullo, ya que significa que la revista trasciende las fronteras locales y hasta llega a países latinoamericanos cuyos autores nos aportan sus conocimientos y experiencias.

Un nuevo logro se alcanzó, recientemente, con el reconocimiento de la versión en línea de ANALECTA VETERINARIA por parte de Latindex (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal) (<https://www.latindex.org/>), que es un sistema de información académica, sin fines de lucro y de consulta gratuita, especializado en revistas académicas editadas en Iberoamérica. Esto le permitirá llegar a nuestra revista hasta otras instituciones latinoamericanas y, probablemente, a través de estas, a aquellos países que aún no la conocen. De la misma manera, ANALECTA VETERINARIA ha sido aceptada, luego de una evaluación por pares, para integrar la base de datos EuroPub (<http://europub.co.uk/>), que cubre literatura académica e indiza artículos de revistas de todo el mundo. Su principal objetivo es aumentar la visibilidad de las revistas académicas de acceso abierto, promoviendo así su mayor uso e impacto.

Consejo Editorial
ANALECTA VETERINARIA

Seroprevalencia de paratuberculosis bovina mediante la prueba de ELISA urea en rodeos de cría y de leche con sospecha de la enfermedad, localizados en la provincia de Buenos Aires, Argentina

Seroprevalence of bovine paratuberculosis with the urea ELISA test in suspicious breeding and milk herds from Buenos Aires province, Argentina

ALVARADO PINEDO MARÍA FIORELLA ^{1,*}, DI PAOLO LEANDRO ADRIÁN^{1,2}, SOSA PEDRO SEBASTIÁN¹, ROMERO MAGALÍ ANDREA ¹, PERALTA LUIS MARÍA¹, COSTA ENRIQUE FÉLIX², TRAVERÍA GABRIEL EDUARDO ¹

1. Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE), 2. Cátedra de Patología Médica; Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

* Correo electrónico de la autora de contacto: alvarado@fcv.unlp.edu.ar

Resumen

Se presentan los resultados obtenidos en 17.747 sueros analizados para el diagnóstico serológico de paratuberculosis bovina, provenientes de 85 rodeos de cría y 5 de leche, ubicados en 14 partidos de la provincia de Buenos Aires. La prueba de ELISA permite diagnosticar esta enfermedad en estadio subclínico, y la incorporación de urea mejora la eficiencia para detectar los anticuerpos específicos contra el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Se estimó la seroprevalencia sobre la base de los resultados obtenidos de animales caracterizados como positivos y sospechosos en la prueba de ELISA urea. Se observó una seroprevalencia individual del 5,5 % en los rodeos de cría y del 13,6 % en los rodeos lecheros, siendo la seroprevalencia predial del 78,8 %. De 425 muestras de heces cultivadas se aisló MAP en el 67,6 % de los animales positivos, del 52,7 % de los sospechosos y del 7 % de los negativos por la prueba de ELISA urea. Mediante estadística bayesiana, el valor predictivo positivo de esta prueba fue de 0,61 y el valor predictivo negativo de 0,93. Nuestros resultados aportan información actualizada sobre la estimación de la seroprevalencia regional de paratuberculosis bovina, la cual es elevada, y confirma la utilidad de la prueba de ELISA urea, desarrollada localmente, en el diagnóstico y control de la enfermedad.

Palabras clave

Rumiantes, enfermedad de Johne, diagnóstico, ELISA urea

Abstract

The results of 17.747 bovine serum samples belonging to 85 beef herds and 5 dairy herds from 14 localities of Buenos Aires province are presented. ELISA is the diagnostic test of choice in cattle with subclinical paratuberculosis, and addition of urea in this assay improves the efficiency to detect antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Seroprevalence was estimated based on positive and suspicious sera to urea ELISA. Individual seroprevalence for beef and dairy herds was 5.5 % and 13.6 %, respectively, with an overall herd seroprevalence of 78.8 %. In addition, 425 fecal samples were analyzed by microbiological culture. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* was isolated in 67.6 % of positive, 52.7 % of suspicious and 7 % of negative urea ELISA animals. The positive predictive value of urea ELISA was 0.61, and the negative predictive value was 0.93 using Bayesian statistics. These results are an update to the estimated regional paratuberculosis seroprevalence and confirm the usefulness of urea ELISA in the diagnosis and control of paratuberculosis in cattle.

Key words

Ruminants, Johne's disease, diagnosis, urea ELISA

Fecha de recepción: 31/01/2019

Fecha de revisión: 11/04/2019

Fecha de aprobación: 24/04/2019

ANALECTA VET 2019; Enero-Junio; 39(1):2-9

Impresa ISSN 03655 14-8 Electrónica ISSN 1514-2590

doi.org/10.24215/15142590e032

Introducción

La paratuberculosis (PTB) es una enfermedad infecciosa crónica de los rumiantes, caracterizada por causar una ileocolitis granulomatosa difusa con compromiso de los linfonodos y vasos linfáticos asociados al íleon y colon. La infección con el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) se produce en los bovinos jóvenes vía fecal-oral, por contacto directo con las heces infectantes durante el parto o al ingerir calostro o leche contaminados provenientes de un animal enfermo (Chiodini *et al.*, 1984; Clarke, 1997; Sweeney, 1996). La enfermedad presenta un periodo de incubación prolongado que oscila entre 2 y 8 años, iniciándose con estadios subclínicos que pueden durar varios años, hasta la presentación de signos clínicos y la eliminación de micobacterias en la materia fecal (Whitlock & Buergelt, 1996). A medida que la enfermedad progresa, los niveles de los títulos de anticuerpos séricos aumentan, coincidiendo con la mayor eliminación de MAP (Barkema *et al.*, 2018; Maroudam *et al.*, 2015). En los bovinos, los signos clínicos son: disminución de la producción láctea, mala condición corporal y diarrea, al principio intermitente y posteriormente continua, la que produce hipoproteïnemia con síndrome de malabsorción proteica y pérdida de masa muscular. El cuadro clínico, de varios meses de duración, lleva a la emaciación y muerte. La PTB bovina genera importantes pérdidas económicas, tanto en los rodeos lecheros como en los de carne (Clarke, 1997; Maroudam *et al.*, 2015; OIE, 2018).

En Argentina, Rosenbusch describió por primera vez en los bovinos esta afección en 1932, siendo posteriormente comunicada en 1942 en los ovinos, en 1995 en las cabras y en el 2000 en los ciervos. Se han descrito numerosos casos clínicos compatibles con esta enfermedad, representando una de las principales causas infecciosas de muerte en los bovinos adultos (Costa *et al.*, 2004; Späth *et al.*, 2012). Paolicchi *et al.* (2003) demostraron una seroprevalencia de 50 % de establecimientos afectados en la provincia de Buenos Aires utilizando la prueba de ELISA. En Uruguay se ha establecido una prevalencia predial del 70,2 % \pm 8,1 % (Suanes & Rubino, 2012) y, en Brasil, también se confirmó la presencia de MAP mediante distintas pruebas diagnósticas (Albuquerque *et al.*, 2017).

En nuestro país, las medidas de control se basan en el diagnóstico y la eliminación de los enfermos, en conjunto con medidas de bioseguridad tendientes a evitar el contacto de los bovinos eliminadores de MAP con los terneros en sus primeras semanas de vida (Alvarado Pinedo, 2015; Gilardoni *et al.*, 2012; Paolicchi *et al.*, 2003).

Las pruebas diagnósticas que se emplean en la actualidad están dirigidas a la detección de MAP de forma directa o a determinar la respuesta inmune del hospedador. La detección del patógeno se puede efectuar a partir del cultivo bacteriológico de muestras de materia fecal, leche, intestino,

linfonodos o bien de órganos con lesiones macroscópicas. Las pruebas diagnósticas se comparan con el cultivo bacteriológico que es considerado la prueba de oro o *gold standard*. El desarrollo de colonias puede observarse en un tiempo no menor a 6 semanas y hasta 6 meses (Whitlock *et al.*, 2000). Para evidenciar la presencia de ADN de MAP existen diversas técnicas moleculares, tales como la PCR convencional, la PCR en tiempo real, la multiplex PCR y las sondas de hibridación (Ali-novi *et al.*, 2009; Timms *et al.*, 2015). Estas pruebas se pueden realizar a partir de las muestras clínicas o de los aislamientos, siendo la mayor limitante para su uso masivo los elevados costos. Otra alternativa para el diagnóstico es el hallazgo de lesiones microscópicas características de PTB, con presencia de micobacterias libres o en el interior de macrófagos evidenciables con la coloración de Ziehl Neelsen o mediante inmunohistoquímica (OIE, 2018).

La respuesta inmune es, en un primer momento, de tipo celular, siendo factible su determinación con el uso de la prueba intradérmica con derivado proteico purificado (PPD) aviar, la prueba de linfoproliferación y la cuantificación de gamma interferón (Alvarado Pinedo, 2015; Jungersen *et al.*, 2012; OIE, 2018). Posteriormente la respuesta inmune es de tipo humoral, obteniéndose un diagnóstico serológico indirecto mediante las pruebas de inmunodifusión en gel de agar (AGID) y de ELISA. Sin embargo, de acuerdo con el estadio en el que se encuentre el animal infectado, los resultados pueden variar con cada técnica (Nielsen *et al.*, 2001, 2008; OIE, 2018).

La prueba de ELISA urea se ha utilizado en el diagnóstico serológico de diversas enfermedades para determinar la avidéz de los anticuerpos con respecto al antígeno; dicha avidéz aumenta con el tiempo después del contacto inicial con el patógeno y se relaciona con la cronicidad de la infección (Iddawela *et al.*, 2015; Lynch *et al.*, 2014). La urea es un agente caotrópico que afecta los enlaces de hidrógeno, desestabilizando las fuerzas hidrófobas que actúan en la unión antígeno-anticuerpo. Las uniones débiles se rompen, quedando unidas las que tienen mayor afinidad funcional o avidéz (Fialová *et al.*, 2017). Este efecto es similar al logrado cuando los sueros son absorbidos con otras micobacterias, como *Mycobacterium phlei* (Di Paolo *et al.*, 2016; OIE, 2018). El objetivo de este trabajo fue estimar la seroprevalencia actualizada de PTB bovina en la provincia de Buenos Aires, utilizando la prueba de ELISA urea con muestras de suero bovino remitidas a nuestro laboratorio.

Materiales y métodos

Muestras y prueba de ELISA urea

Se analizaron 17.747 muestras de suero provenientes de 90 establecimientos (85 de rodeos

de cría y 5 de rodeos lecheros) que fueron remitidas al Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE) para el diagnóstico de PTB bovina, entre los años 2016 y 2018. En la mayoría de los casos las muestras pertenecían a bovinos adultos de rodeos en los cuales se sospechaba la presencia de esta enfermedad. Además, se incluyeron rodeos en los que se realizaba un control sanitario con fines de saneamiento o para la venta de animales como reproductores. Se procesaron muestras provenientes de 14 partidos de la provincia de Buenos Aires, en su mayoría de Chascomús, Magdalena, General Belgrano y Lobos (Fig. 1). La cantidad de muestras y de establecimientos analizados por partido se presentan en la Tabla 1.

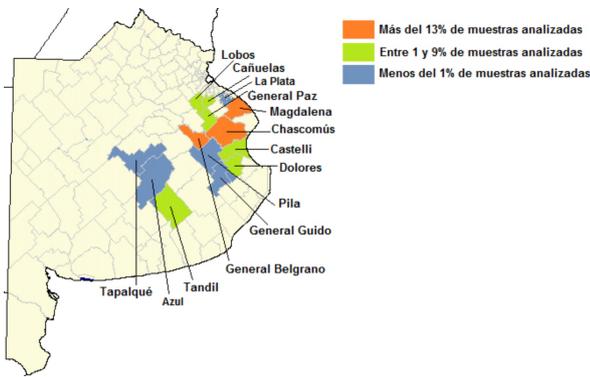


Figura 1. Porcentaje de muestras totales analizadas de cada uno de los partidos que intervinieron en el estudio, para la determinación de la seroprevalencia de paratuberculosis bovina mediante la técnica de ELISA urea.

En la prueba de ELISA urea, se utilizaron placas de 96 pocillos (Microolon®, Greinerbio-one, Kremsmünster, Austria) que se sensibilizaron con 100 µl por pocillo de antígeno protoplasmático de MAP con una concentración de 20 µg/ml en solución de carbonato 0,05 M (pH 9,6). Estas placas se colocaron durante la noche en heladera a 4 °C. Al día siguiente, después de lavar 3 veces con una solución tamponada de fosfatos (PBS) con 0,05 % Tween 20, (ELISA-PBS), se agregaron 100 µL de una dilución 1/180 de los sueros control y negativo y de los sueros problema por duplicado. Las placas se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C). Posteriormente cada placa fue lavada 3 veces con ELISA-PBS y se incorporaron 100 µl de solución de urea 8 M por pocillo, incubándose a temperatura ambiente durante 4 minutos. A continuación, cada placa fue lavada 3 veces con ELISA-PBS y se agregaron 100 µl por pocillo de inmunoglobulina anti-IgG bovina conjugada con peroxidasa (Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Alemania) con una dilución de 1:5000 en ELISA-PBS. Después de incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces con ELISA-PBS y posteriormente se agregaron, en cada pocillo, 100 µl de solución de revelado. Finalmente se

realizó la lectura utilizándose un espectrofotómetro (Lab-systems Multiskan® Plus, Helsinki, Finlandia) y un filtro de 405 nm (Di Paolo et al., 2016). Para obtener un valor asociado al porcentaje de positividad de la muestra analizada en relación con los controles (PPRC) se realizó un cálculo a partir de la densidad óptica (DO) promedio obtenida en cada muestra. Dicho cálculo se muestra en la figura 2.

Partidos	Cantidad de establecimientos	Cantidad de muestras de suero	Porcentaje de muestras (%)
Azul	1	4	0,02
Pila	1	25	0,14
Castelli	5	44	0,25
Tapalqué	1	54	0,30
La Plata	2	62	0,35
General Guido	2	124	0,70
Dolores	4	181	1,02
Tandil	1	300	1,69
Cañuelas	1	319	1,80
General Paz	3	774	4,36
Lobos	4	1480	8,34
General Belgrano	5	2459	13,86
Magdalena	16	3482	19,62
Chascomús	44	8439	47,55
TOTAL	90	17.747	100

Tabla 1. Cantidad de establecimientos y de muestras de suero analizadas en cada partido de la provincia de Buenos Aires, para la determinación de la seroprevalencia de paratuberculosis bovina mediante la técnica de ELISA urea.

Se consideraron como positivos aquellos valores de PPRC iguales o superiores al 70 %. Los valores del 60 % al 69 % se informaron como sospechosos. Este protocolo es una modificación del desarrollado previamente por Travería (2003) y el mismo es utilizado en el CEDIVE para el diagnóstico serológico de rutina de PTB bovina.

$$PPRC = \frac{(DO \bar{X} \text{ de la muestra} - DO \bar{X} \text{ del control negativo})}{(DO \bar{X} \text{ del control positivo} - DO \bar{X} \text{ del control negativo})} \times 100$$

PPRC: porcentaje de positividad en relación a los controles
 DO: densidad óptica
 X: promedio

Figura 2. Fórmula utilizada en el cálculo del porcentaje de positividad de las muestras en relación con los controles (PPRC), utilizando el valor de densidad óptica de cada suero analizado mediante la prueba de ELISA urea.

Análisis bacteriológico de materia fecal

Para corroborar la eliminación de MAP en las heces mediante el cultivo bacteriológico, se solicitó el envío voluntario de muestras de materia fecal de los animales positivos o sospechosos a la prueba de ELISA urea. Además, se cultivaron 28 muestras de animales que habían resultado negativos. En total se analizaron 425 muestras de materia fecal. Para el cultivo bacteriológico se

efectuó, durante la noche a 37 °C, la descontaminación de 2 g por muestra de materia fecal en cloruro de hexadecilpiridinio (Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Alemania) al 0,75 % en agua destilada. Posteriormente se centrifugó a 900 g durante 30 minutos y al pellet se le adicionó 1 ml de una mezcla de antibióticos conformada por ácido nalidíxico, vancomicina y anfotericina B. Algunas muestras se sembraron en medio de cultivo de Herrold con micobactina (Stabel, 1997) y otras fueron sembradas en un medio de cultivo líquido con el agregado de micobactina, elaborado en el CEDIVE como parte de un trabajo de tesis doctoral (Romero *et al.*, 2018; Whittington *et al.*, 2013). Todas las muestras sembradas se incubaron a 37 °C entre 1 y 3 meses. El tiempo de desarrollo del cultivo, la morfología de las colonias en los medios sólidos y de las micobacterias al realizar la coloración de Ziehl Neelsen, fueron características microbiológicas que permitieron definir la presencia de MAP en la materia fecal.

Análisis estadístico

Mediante estadística bayesiana se calcularon los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) de la prueba de ELISA urea (Risso & Risso, 2017). Para elaborar una curva ROC (Receiver Operating Characteristic) y calcular el área bajo la curva y el punto de corte sugerido de PPRC, se utilizó el sistema estadístico R Core Team (2013) con el paquete pROC (Robinet *al.*, 2011). Para determinar la asociación entre los resultados positivos y sospechosos por la prueba de ELISA urea y el aislamiento de MAP de materia fecal, se utilizó la prueba de chi cuadrado (X^2) con la corrección de Yates con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

Resultados

Sobre un total de 17.747 muestras analizadas con la prueba de ELISA urea se encontraron 653 animales positivos (3,6 %), 428 sospechosos (2,4 %) y 16.666 negativos (94 %). Del total de establecimientos que participaron de este estudio (90) se encontró serología positiva en 71 (78,8 %) correspondientes a 66 rodeos de cría y a 5 rodeos lecheros. Se observó una seroprevalencia individual a PTB bovina del 5,5 % en los rodeos de cría y del 13,6 % en los rodeos lecheros. En 19 de los 90 establecimientos estudiados (21,2 %) se obtuvo resultado negativo, representando un total de 475 muestras de suero, con un promedio de 25 muestras por establecimiento y un rango entre 2 y 45 muestras.

Si bien se indicó efectuar el cultivo de materia fecal de todos los animales que habían resultado positivos o sospechosos a la prueba de ELISA urea, solamente se recibieron en el labo-

ratorio 213 heces de bovinos positivos (32,6 %) y 184 de sospechosos (42,9 %). Dichas muestras derivaron de 30 establecimientos ubicados en los partidos de Magdalena, Chascomús, General Paz, General Belgrano, La Plata, Tandil, Tapalqué, Castelli y Dolores. Dos de 28 muestras negativas al ELISA urea, provenientes de un rodeo de cría con PTB endémica, resultaron positivas al cultivo. Los resultados totales de los cultivos bacteriológicos realizados se presentan en la tabla 2.

Partidos	Cantidad de establecimientos que enviaron muestras de materia fecal	Aislamientos de MAP de cultivos de materia fecal		
		Previamente ELISA urea positivos	Previamente ELISA urea sospechosos	Previamente ELISA urea negativos
Magdalena	10	60	34	2
Chascomús	8	46	30	0
General Paz	3	16	14	0
General Belgrano	3	11	16	0
La Plata	2	2	1	0
Tandil	1	4	2	0
Tapalqué	1	3	0	0
Castelli	1	1	0	0
Dolores	1	1	0	0
TOTAL	30	144	97	2
Porcentaje (%) de cultivo positivo de MAP para cada categoría		67,6	52,7	7,1

Tabla 2. Resultados totales de los aislamientos de *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis (MAP), a partir de los cultivos de materia fecal de bovinos de algunos partidos de la provincia de Buenos Aires.

Se obtuvo desarrollo de MAP en el 67,6 % de los cultivos de los animales positivos por la prueba de ELISA urea y en el 52,7 % de los sospechosos, observándose diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,034$). Se aisló MAP a partir de materia fecal en el 7 % de las muestras negativas al ELISA urea.

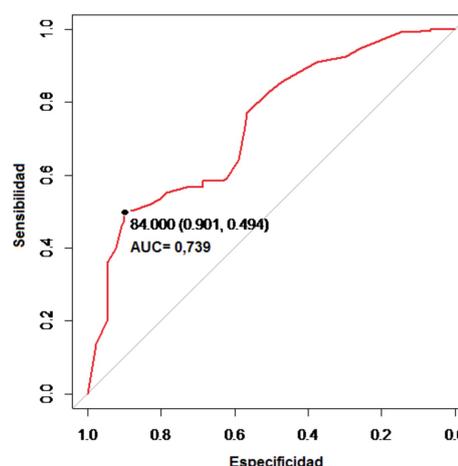


Figura 3. Curva ROC de la prueba de ELISA urea de paratuberculosis. Gráfica de un área bajo la curva (AUC) de 0,739 y una especificidad y sensibilidad del 90 % y 49 %, respectivamente.

De acuerdo con los resultados bacteriológicos obtenidos en las muestras de heces analizadas, la prueba de ELISA urea para detección de PTB bovina presentó una sensibilidad del 49 % y especificidad del 90 %, con un punto de corte sugerido de 84 PPRC para un área bajo la curva de 0,739 (Figura 3), con un VPP de 0,61 y un VPN de 0,93.

Discusión

En nuestro trabajo se estimó una seroprevalencia individual a PTB bovina del 5,5 % en los rodeos de cría y del 13,6 % en los rodeos lecheros, coincidiendo con los hallazgos descriptos por otros autores en rodeos bovinos en los que la enfermedad se considera endémica (OIE, 2018). La seroprevalencia predial fue del 78,8 % en los establecimientos analizados, observando, en la mayoría de los mismos, animales con signología clínica compatible con PTB bovina. Estos resultados muestran concordancia con un resumen de datos serológicos de esta enfermedad obtenidos durante 25 años en el INTA Balcarce mediante la prueba de ELISA, en donde para rodeos de carne se informó una seroprevalencia predial del 79 % y una individual del 6,3 %. En los rodeos lecheros se informó una seroprevalencia predial del 81 % y una individual del 15,7 %, considerándose al sistema productivo lechero como un factor asociado a la enfermedad (Moreno *et al.*, 2017). En los últimos años, en el servicio de diagnóstico que ofrece el CEDIVE, se han incrementado las consultas relacionadas con esta enfermedad, que afecta a rodeos de cría y lecheros y cabañas. Además de las condiciones de manejo propias del sistema lechero, varios factores pueden asociarse a este incremento. Entre estos pueden incluirse los cambios productivos generados por la expansión agrícola, lo que significa que se concentre la cría bovina en sistemas pastoriles de menor superficie. De esa manera, se incrementa la probabilidad de diseminación del MAP.

En la PTB bovina los títulos de anticuerpos séricos son más altos durante la etapa de enfermedad clínica, cuando los animales presentan más lesiones y liberan grandes cantidades de MAP en sus heces y leche (Maroudam *et al.*, 2015). La prueba de ELISA se caracteriza por presentar una mayor sensibilidad en comparación con las técnicas de fijación del complemento y AGID, en cuanto a la detección de animales con enfermedad subclínica y que actúan como portadores (OIE, 2018). Esta técnica es capaz de detectar entre un 30 % y 40 % del ganado vacuno identificado como positivo mediante el cultivo de heces en medio sólido (Whitlock *et al.*, 2000). Esta sensibilidad también depende de la edad del animal, hecho documentado en numerosos artículos que mencionan diferentes porcentajes de sensibilidad, aunque hay estudios en los que se ha

calculado que la sensibilidad global estimada para los diferentes grupos de edad es del 15 % (Jubb *et al.*, 2004, Whitlock *et al.*, 2000). La especificidad se encuentra en el rango del 40-100 % (Nielsen & Toft, 2008).

En concordancia con esta información, la prueba de ELISA indirecta utilizada en el CEDIVE posee una sensibilidad y especificidad calculada de un 38 % y 97 %, respectivamente, presentando mayor eficiencia en animales mayores a los dos años (Travería, 2003). La incorporación de urea, luego de la incubación de los sueros con el antígeno fijado a las placas, le aporta mayor certeza al diagnóstico serológico de la PTB bovina al mejorar sus características operativas. En una enfermedad crónica como la paratuberculosis, los animales que poseen anticuerpos con mayor avidez tienen valores elevados de DO en la prueba de ELISA urea, y estos resultados se pueden asociar a estadios subclínicos o clínicos incipientes que se presentan luego del prolongado periodo de incubación.

En este trabajo se consideraron como positivas las muestras que resultaron con un PPRC ≥ 70 % y, como sospechosas, aquellas con un PPRC entre 60 y 69 %, indicándose, en ambos casos, el envío de materia fecal de esos animales para realizar el cultivo bacteriológico y confirmar la infección por MAP. Al analizar los aislamientos de MAP de acuerdo con los resultados previos en la prueba de ELISA urea, obtuvimos 67,6 % de aislamientos en los positivos y 52,7 % en los sospechosos, con diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0,024$). Nuestros hallazgos son comparables con los informados por Barkema *et al.*, (2018), pudiéndose correlacionar altos títulos en la prueba de ELISA urea con mayor grado de diseminación de MAP. Con la cantidad de muestras de heces analizadas en este trabajo se obtuvo un 49 % de sensibilidad y un 90 % de especificidad para un punto de corte sugerido de 84 PPRC y un área bajo la curva de 0,739; el VPP y el VPN fueron de 0,61 y 0,93, respectivamente.

Usualmente, el cultivo de materia fecal es capaz de detectar la mayoría de los animales en estadios avanzados de la enfermedad, pero solo identifica algunos animales en las primeras etapas de la infección (Nielsen & Toft, 2008). La sensibilidad del cultivo fecal es del 70-74 % para el ganado con signos clínicos y del 23-29 % para el ganado con infección subclínica (OIE, 2018). Es sabido que ninguna prueba para el diagnóstico de PTB bovina es el 100 % sensible o específica y estas características operativas son consideradas por nuestro grupo de trabajo al momento de confirmar un diagnóstico y de proponer medidas de control. Los establecimientos que aplican voluntariamente programas de control basándose en el diagnóstico sistematizado y en la eliminación de los animales positivos, logran disminuir la seroprevalencia al cabo de varios años (Alvarado Pinedo, 2015; Moreno *et al.*, 2017; OIE, 2018).

Conclusiones

La PTB bovina es una enfermedad infecciosa crónica con un prolongado periodo de incubación, que ocasiona la baja productiva y muerte de los animales enfermos, justificando la existencia de variados métodos diagnósticos que intenten detectar eficientemente la mayor cantidad de animales infectados.

En nuestro país, la PTB bovina se presenta endémicamente y la ausencia de una vacuna aprobada por el SENASA para su aplicación, hace necesaria la utilización de protocolos de control que combinen el uso de técnicas diagnósticas en distintos estadios de la enfermedad.

Aunque las pruebas de ELISA son rápidas y altamente sensibles en animales infectados, en nuestro país aún son de elevado costo, restringiendo su uso a nivel predial si no se utilizan de manera programada y criteriosa.

El uso de la prueba de ELISA urea desarrollada localmente, de menor costo que las actualmente en uso, genera una plataforma promisoriosa para avanzar en el diseño de las pruebas diagnósticas, tendientes a mejorar las características operativas, adaptándolas a las condiciones epidemiológicas imperantes en la región y a las capacidades de los laboratorios de diagnóstico veterinario.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de los médicos veterinarios que enviaron las muestras. Este estudio fue financiado parcialmente por el Proyecto de Investigación y Desarrollo (11V220) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y por el Fondo para la investigación científica y tecnológica (PICT-2017-2231 Categoría II: Plan Argentina Innovadora 2020). Sosa PS y Romero MA son becarios de la UNLP y de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, respectivamente.

Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Bibliografía

Alinovi CA, Ward MP, Lin TL, Moore GE, Wu CC. 2009. Real-time PCR, compared to liquid and solid culture media and ELISA, for the detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology*. 136(1-2):177-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.012

Alvarado Pinedo MF. 2015. Posibilidades diagnósticas de la PPD aviar en la paratuberculosis bovina en animales jóvenes. Tesis de Doctorado en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/48228>

Albuquerque PPF, Santos AS, Souza Neto OL, Kim PC, Cavalcanti, Oliveira JM, Mota RA, Júnior JW. 2017. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine milk from the state of Pernambuco, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 48(1):113-7. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.010

Barkema HW, Orsel K, Nielsen SS, Koets AP, Rutten VPMG, Bannantine JP, Keefe GP, Kelton DF, Wells SJ, Whittington RJ, Mackintosh CG, Manning EJ, Weber MF, Heuer C, Forde TL, Ritter C, Roche S, Corbett CS, Wolf R, Griebel PJ, Kastelic JP, De Buck J. 2018. Knowledge gaps that hamper prevention and control of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Transboundary and Emerging Diseases*. 65(1):125-48. doi: 10.1111/tbed.12723

Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS, Thayer WR Jr, Coutu JA. 1984. Characteristics of an unclassified *Mycobacterium* species isolated from patients with Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 20(5): 966-71.

Costa EF, Fazzio LE, Travería GE, Sánchez RO, Alvarado Pinedo MF, Mattioli GA, Otero MM, Chialva M, Romero JR. 2004. Causas de mortalidad y aborto en bovinos. Informe de 1163 casos entre 1986 y 2001 en la provincia de Buenos Aires. *Revista de Medicina Veterinaria*. 85:16-22.

Clarke CJ. 1997. The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *Journal of Comparative Pathology*. 116(3): 217-61. doi: 10.1016/S0021-9975(97)80001-1

Di Paolo LA, Alvarado Pinedo MF, Peralta LM, Romero MA, Travería GE. 2016. Paratuberculosis bovina: diagnóstico serológico con un ELISA urea para intentar categorizar el estadio de la enfermedad. En: XXI Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. Jujuy, Argentina, p 79. Disponible en: <http://www.aavld.org.ar/documentos/3-MEMORIAS%20XXI%20AAVDL%202016.pdf> [Consultado 20/01/2019].

Fialová L, Petráčková M, Kuchař O. 2017. Comparison of different enzyme-linked immunosorbent assay methods for avidity determination of antiphospholipid antibodies. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 31(6). doi: 10.1002/jcla.22121

- Gilardoni LR, Paolicchi FA, Mundo SL. 2012. Bovine paratuberculosis: a review of the advantages and disadvantages of different diagnostic tests. *Revista Argentina de Microbiología*. 44: 201-15.
- Iddawela D, Ehambaram K, Kumarasiri PV, Wijesundera S. 2015. Development and validation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) test for the diagnosis of toxoplasmosis in Sri Lanka. *Ceylon Medical Journal*. 60(3):82-6. doi: [10.4038/cmj.v60i3.8185](https://doi.org/10.4038/cmj.v60i3.8185)
- Jubb TF, Sergeant ES, Callinan AP, Galvin J. 2004. Estimate of the sensitivity of an ELISA used to detect Johne's disease in Victorian dairy cattle herds. *Australian Veterinary Journal*. 82(9):569-73.
- Jungersen G, Mikkelsen H, Grell SN. 2012. Use of the johnin PPD interferon-gamma assay in control of bovine paratuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 148(1-2):48-54. doi: [10.1016/j.vetimm.2011.05.010](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.05.010)
- Lynch HE, Stewart SM, Kepler TB, Sempowski GD, Alam SM. 2014. Surface plasmon resonance measurements of plasma antibody avidity during primary and secondary responses to anthrax protective antigen. *Journal of Immunological Methods*. 404:1-12. doi: [10.1016/j.jim.2013.11.026](https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.11.026)
- Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Chapter 3.1.15. 2018. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.15_PARATB%20.pdf [Consultado 30/01/2019].
- Maroudam V, Mohana Subramanian B, Praveen Kumar P, Dhinakar Raj G. 2015. Paratuberculosis: diagnostic methods and their constraints. *Journal of Veterinary Science and Technology*. 6:259. doi: [10.4172/2157-7579.1000259](https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000259)
- Moreno F, Frade V, Morsella C, Méndez A, Paolicchi F, Späth EJA. 2017. Análisis retrospectivo de paratuberculosis en establecimientos bovinos diagnosticados en INTA EEA Balcarce, Argentina, durante el periodo 1991-2015. En: *Memorias de la Sociedad Iberoamericana de Epidemiología Veterinaria y Medicina Preventiva*. Valdivia, Chile, p 35. Disponible en: http://www.sag.cl/sites/default/files/resumenes_sievmp_valdivia-2017.pdf [Consultado 14/01/2019].
- Nielsen SS, Houe H, Thamsborg SM, Bitsch V. 2001. Comparison of two enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle using different subspecies strains of *Mycobacterium avium*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 13(2):164-6. doi: [10.1177/104063870101300213](https://doi.org/10.1177/104063870101300213)
- Nielsen SS, Toft N. 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Veterinary Microbiology*. 129(3-4): 217-35. doi: [10.1016/j.vetmic.2007.12.011](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.011)
- Paolicchi FA, Zumarraga MJ, Gioffre A, Zamorano P, Morsella C, Verna A, Cataldi A, Alito A, Romano M. 2003. Application of different methods for the diagnosis of paratuberculosis in a dairy cattle herd in Argentina. *Journal of Veterinary Medicine. Series B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 50(1):20-6. doi: [10.1046/j.1439-0450.2003.00606.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00606.x)
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en: <http://www.R-project.org/> [Consultado 16/01/2019].
- Risso MA, Risso P. 2017. Introducción a la estadística bayesiana: uso de lenguaje R y Winbugs. La Plata, La Plata, Vuelta a Casa.
- Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez JC, Müller M. 2011. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, 12, p. 77. doi: [10.1186/1471-2105-12-77](https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-77)
- Romero M, Alvarado Pinedo M, Moyano R, Peralta L, Sosa P, Santángelo M, Travería G. 2018. Medio de cultivo líquido para el diagnóstico de paratuberculosis bovina. Aplicación y análisis comparativo con el medio de Herrold: resultados preliminares. *Analecta Veterinaria*. 38(1):50-5. doi: [10.24215/15142590e025](https://doi.org/10.24215/15142590e025)
- Späth EJA, Entrocasso CM, Plorutti F, Manazza JA, Brusca G, Faverín C. 2012. Enfermedades de los bovinos diagnosticadas por veterinarios en el centro-sur de Buenos Aires. Años 2001 a 2007. *Boletín técnico N° 161, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce INTA*. Disponible en: <http://inta.gob.ar/documentos/enfermedades-de-los-bovinos-diagnosticadas-por-veterinarios-en-el-centro-sur-de-buenos-aires.-anos-2001-al-2007> [Consultado 07/01/2019].
- Stabel JR. 1997. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three other methods. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 9(4):375-80. doi: [10.1177/104063879700900406](https://doi.org/10.1177/104063879700900406)
- Suanes A, Rubino MC. 2012. Paratuberculosis bovina: diagnóstico, riesgos, impacto económico y

estrategia de prevención. En: XL Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, p. 66-72. Disponible en:

<http://centromedicoveterinariopaysandu.com/wp-content/uploads/2015/06/Suanes-et-al.-PARATUBERCULOSIS-BOVINA-DIAGNOSTICO-RIESGOS-IMPACTO-ECONOMICO-Y-ESTRATEGIA.-2012.pdf>

[Consultado 15/01/2019].

Sweeney RW. 1996. Transmission of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 12(2):305-12.

doi: [10.1016/S0749-0720\(15\)30408-4](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30408-4)

Timms VJ, Mitchell HM, Neilan BA. 2015. Optimisation of DNA extraction and validation of PCR assays to detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods*. 112:99-103.

doi: [10.1016/j.mimet.2015.03.016](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.03.016)

Travería GE. 2003. Análisis antigénico del *Mycobacterium paratuberculosis* y diagnóstico de la paratuberculosis bovina mediante enzoinmunoensayo (ELISA). Tesis de Doctorado en Ciencias

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

Whittington RJ, Whittington AM, Waldron A, Begg DJ, de Silva K, Purdie AC, Plain KM. 2013. Development and validation of a liquid medium (M7H9C) for routine culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to replace modified Bactec 12B medium. *Journal of Clinical Microbiology*. 51(12):3993-4000.

doi: [10.1128/JCM.01373-13](https://doi.org/10.1128/JCM.01373-13)

Whitlock RH, Wells SJ, Sweeney RW, Van Tiem J. 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Veterinary Microbiology*. 77(3-4):387-98.

doi: [10.1016/S0378-1135\(00\)00324-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00324-2)

Whitlock RH, Buergelt C. 1996. Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 12(2):345-56.

doi: [10.1016/S0749-0720\(15\)30410-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30410-2)

Vía intranasal: una alternativa para la administración de fármacos de acción central en equinos

Intranasal drug delivery: an alternative for the administration of central acting drugs in horses

FERREIRA VIOLETA ^{1#}, VELLOSO MARÍA INÉS ^{2,4#}, VITA MARIÁNGELES ³,
LANDONI MARÍA FABIANA ^{2*}

1. Servicio de Medicina y Cirugía de Grandes Animales. Hospital Escuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 2. Cátedra de Farmacología General y Clínica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. ANPCyT. 3. Cátedra de Anatomía Comparada. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Argentina. 4. Becaria ANPCyT

* Correo electrónico de la autora de contacto: landoni@fcv.unlp.edu.ar

#igual colaboración

Resumen

La vía intranasal es reconocida en medicina humana como una vía muy promisoría para la administración sistémica y cerebral de fármacos. Es una vía de administración indolora, incruenta, económica y práctica. Por sus características, es muy útil para la aplicación de fármacos en pacientes con alteraciones orales, con diarrea o que no cooperen. Además, es una potencial vía directa al sistema nervioso central (SNC). Su uso en medicina veterinaria es muy raro, salvo para la administración de tratamientos locales. En la especie equina, aun cuando no hay estudios completos y profundos sobre las características anatomofisiológicas de la cavidad nasal, su gran superficie e irrigación (área potencial de absorción) permiten inferir su viabilidad para la administración sistémica de fármacos. En el presente artículo se discuten las características de la cavidad nasal de los equinos en relación a las diversas vías de absorción sistémica y del transporte nariz-cerebro de fármacos, así como las potenciales aplicaciones de esta vía de administración.

Palabras clave

Vía intranasal, fármacos de acción central, pasaje nariz-cerebro, equinos

Abstract

The intranasal route is recognized as a very promising route for the systemic and cerebral administration of drugs in human medicine. It is a painless, non-invasive, economical, and practical administration route. Due to its characteristics, it is very useful for the application of drugs in non-cooperative patients, as well as those with oral alterations or diarrhoea or, being a potential direct route to the central nervous system (CNS). However, its use in veterinary medicine is very rare, except for the administration of local treatments. Even though there are no complete and thorough studies on the anatomophysiological characteristics of the nasal cavity in the equine species, its large surface area and irrigation and consequent potential absorption area suggest a promising alternative for the systemic administration of drugs. In the present article, the characteristics of the nasal cavity of horses in relation to the various routes of systemic absorption and nose-brain passage of drugs are discussed, as well as the potential applications of this route of administration.

Key words

Intranasal route, central acting drugs, nose-brain passage, horse

Introducción

La vía intranasal es reconocida en medicina humana como una vía muy promisoriosa para la administración sistémica y cerebral de fármacos (Falcone *et al.*, 2014). Contrariamente, en medicina veterinaria es raramente utilizada; cuando se la utiliza, es solo para tratamientos locales con antihistamínicos o corticoides.

La vía intranasal en animales posee un gran potencial para la administración sistémica y cerebral de fármacos. En la especie equina, aun cuando no hay estudios completos y profundos sobre las características anatomofisiológicas de la cavidad nasal, su gran superficie e irrigación (área potencial de absorción) permiten inferir su viabilidad para la administración sistémica de fármacos.

Esta vía cuenta con ventajas que incrementan el interés en su estudio: es indolora, incruenta y práctica. Por sus características, es muy útil para la aplicación de fármacos en pacientes con alteraciones orales, con diarrea o que no cooperen. Además, es una potencial vía directa al sistema nervioso central (SNC) (Tayebati *et al.*, 2013).

1. Anatomía de la cavidad nasal

La cavidad nasal es el único sitio anatómico donde se expone el sistema nervioso de manera directa al medio ambiente. El aire y las sustancias inspiradas ingresan a la cavidad nasal a través de los ollares.

La cavidad nasal se divide, en un plano medio, en dos compartimentos especulares mediante un septum nasal, formado por la lámina perpendicular del hueso etmoides, el vómer y el cartílago hialino (Hare, 1982). La pared dorsal está formada por los huesos nasal y frontal, las paredes laterales por el maxilar, incisivo y parte perpendicular del palatino y la pared ventral por las apófisis palatinas de los huesos incisivos, maxilares y las partes horizontales de los huesos palatinos. La lámina cribosa del etmoides separa las cavidades nasal y craneal. En dirección a la cavidad craneal tiene una forma cóncava, generando una fosa donde se ubica el bulbo olfatorio (Hare, 1982). Cada mitad de la cavidad nasal está ocupada por los cornetes nasales (conchas o turbinetes), dorsal, medio y ventral, que son las estructuras encargadas del acondicionamiento del aire en su tránsito hacia los pulmones. Entre los cornetes quedan espacios denominados meatos. El meato nasal dorsal se encuentra entre el techo de la cavidad nasal y el cornete nasal dorsal. El meato nasal medio se ubica entre los cornetes dorsal y ventral. En este meato existe una abertura nasomaxilar que comunica con el seno maxilar. El meato nasal ventral, limitado por el cornete nasal ventral y el piso de la cavidad nasal, es el más largo y conduce hacia la nasofaringe. En el suelo del

extremo rostral de este meato se ubica el orificio del órgano vomeronasal y el conducto incisivo. Por último, se encuentra el meato nasal común, situado entre los cornetes nasales y el tabique nasal (Fig. 1).

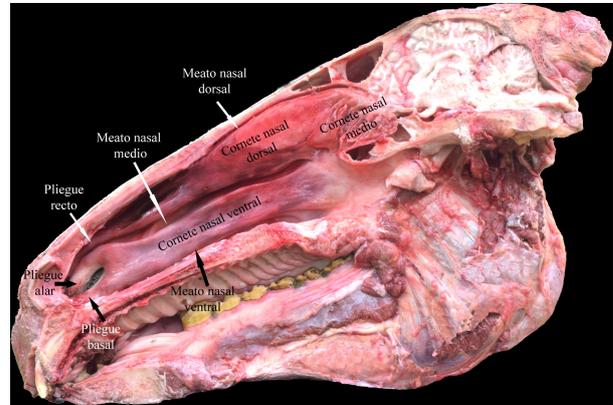


Figura 1. Imagen de una cabeza equina, señalando los sitios anatómicos de la cavidad nasal.

En la porción rostral de la cavidad nasal se encuentran pliegues que se prolongan desde los cornetes, el dorsal, el pliegue recto y desde el ventral los pliegues alar y basal.

La cavidad nasal está muy vascularizada; se encuentra irrigada por las arterias palatina mayor, esfenopalatina y ramas de la etmoidal. Además, se encuentra inervada por el nervio trigémino, cuyas ramas llevan información quimiosensorial y termosensorial desde las mucosas oral, ocular y nasal (Bourganis *et al.*, 2018; Tayebati *et al.*, 2013).

La mucosa de la porción rostral de la cavidad nasal o vestíbulo está cubierta por un epitelio plano estratificado no queratinizado que se continúa con un epitelio cilíndrico ciliado pseudoestratificado con células caliciformes de la porción respiratoria. El vestíbulo, en el cual se encuentra la desembocadura del conducto lagrimal, carece prácticamente de capacidad de absorción.

La mucosa de la porción respiratoria es de color rojizo a causa de la gran vascularización de su submucosa y contiene un rico plexo venoso que forma un tejido de tipo cavernoso en regiones como los pliegues que se extienden rostralmente a partir de los cornetes, la parte ventral del cornete nasal ventral y ventral del septum nasal.

La función primordial de la mucosa respiratoria es el calentamiento y la humidificación del aire inspirado. Normalmente su superficie está recubierta por el mucus segregado por las células caliciformes. El mucus, junto con las partículas de polvo que se le adhieren, se desplaza hacia la nasofaringe por acción de los cilios de las células de revestimiento epitelial, otorgándole una función protectora: el aclaramiento (*clearance*) ciliar (Gänge & Schindowski, 2018; Lochhead & Throne, 2014).

La mucosa que cubre las partes caudales de los huesos etmoturbinados y las aéreas adyacentes del cornete nasal dorsal y septum nasal es gruesa y amarillenta y representa la región olfatoria de la cavidad nasal.

La mucosa olfatoria está formada por un epitelio y una lámina propia densa. El epitelio consta de 3 tipos de células: las epiteliales, llamadas también células de sostén o sustentaculares, las olfatorias o sensoriales y las basales (Lochhead & Thorne, 2014) (Fig. 2).

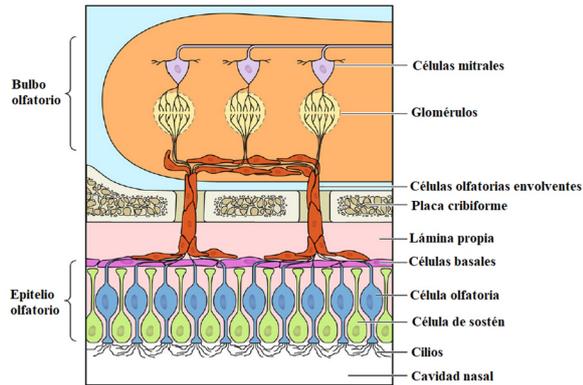


Figura 2. Representación esquemática del sistema olfatorio y su función como un portal para el pasaje de fármacos desde la cavidad nasal hasta el bulbo olfatorio, sorteando la barrera hematoencefálica. Figura adaptada de Dando *et al.*, 2014.

Las células olfatorias o sensoriales (neuronas olfativas periféricas) son neuronas de tipo bipolar, con un cuerpo celular y una fibra nerviosa que emerge de cada extremo; una de ellas, la dendrita, es periférica, muy corta y de conducción sensitiva centripeta y, la otra, el axón, es una prolongación central de conducción centrifuga.

Las células olfatorias tienen la función de recoger las impresiones olorosas y transmitir esta información sensorial desde el ambiente periférico hasta el SNC. Las finas prolongaciones constituidas por las dendritas ascienden hacia la parte superficial siguiendo las hendiduras que quedan entre las células de sostén y terminan en finísimas fibras llamadas cilios olfativos.

Por su parte, el axón va desde el epitelio hacia la lámina propia. Los axones en la lámina propia se encuentran protegidos por las células olfatorias envolventes (OEC, por sus siglas en inglés) (Lochhead & Thorne, 2014). Hay varias clases de OEC y están involucradas en la protección electrofisiológica de las células neuronales olfatorias (Gänge & Schindowski, 2018). Los axones en la lámina propia se reúnen para formar haces de fibras nerviosas olfatorias que se extienden hasta el bulbo olfatorio, constituyendo, en conjunto, el nervio olfatorio.

En el bulbo, las fibras del nervio olfatorio terminan en una arborización libre y flexuosa. La

terminación de cada fibra queda incluida en una formación redondeada llamada glomérulo olfatorio. Esta formación hace sinapsis con la arborización dendrítica de las células mitrales presentes en la zona interna del bulbo. Las células mitrales, por su parte opuesta, emiten los cilindroejes que avanzan hacia la región posterior del bulbo olfatorio para constituir la cinta olfativa, que se divide en 4 raíces. Cada una de ellas sigue un trayecto especial que la conecta a uno de los 4 centros corticales: calloso, hipocampo, temporal y orbitario, que representan los centros corticales del olfato. Desde la mucosa nasal las impresiones olfativas se trasladan a la corteza cerebral siguiendo este trayecto nervioso que en su conjunto constituye la vía olfativa (Dhuria *et al.*, 2010).

Los nervios olfatorio y trigémino inervan la mucosa de la cavidad nasal y proporcionan una conexión directa con el SNC. El trigémino inerva principalmente el epitelio respiratorio y el vestíbulo de la cavidad nasal, aunque curiosamente una pequeña porción del nervio termina también en el epitelio olfatorio (Schaefer *et al.*, 2002). También, establece conexión con el SNC, especialmente con la región caudal del cerebro, el tallo cerebral y la médula espinal, y transmite la información sensorial desde la mucosa nasal hasta estas regiones (Clerico *et al.*, 2003; Gray, 1978).

El sistema olfatorio también está compuesto por órganos accesorios como el órgano vomeronasal. Este se encuentra en las dos fosas nasales y está conectado al bulbo olfatorio a través de un conducto. Su superficie está cubierta por epitelio olfatorio y células neuronales. Tiene una función importante en el comportamiento de las especies porque es capaz de detectar feromonas.

Todas estas características anatomofisiológicas le dan a la cavidad nasal atributos únicos que facilitan la llegada de los agentes terapéuticos directamente desde su mucosa hacia el SNC, eludiendo la barrera hematoencefálica.

2. Transporte cavidad nasal-SNC

El pasaje directo de agentes terapéuticos desde la cavidad nasal al SNC se propuso por primera vez y fue patentado en 1989 por William H. Frey II del Alzheimer's Research Center (Frey, 1991).

Posteriormente, numerosos informes han demostrado que los fármacos administrados por la vía intranasal acceden de manera directa al SNC aumentando su eficacia para el tratamiento de enfermedades y trastornos neurológicos (Dhanda *et al.*, 2005; Frey, 2002; Hanson & Frey, 2008).

Se ha demostrado que ciertos marcadores, como la aglutinina de germen de trigo conjugada con peroxidasa de rábano picante (WGA-HRP), son transportados a través de los axones del nervio olfatorio, alcanzando los bulbos olfatorios en el SNC (Balin *et al.*, 1986). Estos hallazgos fueron posteriormente confirmados por otros estudios

cuantitativos en los que se comparó la administración de WGA-HRP intranasal e intravenosa en ratas, siendo muy superior la llegada de WGA-HRP a los bulbos olfatorios tras la administración intranasal (Thorne *et al.*, 1995).

El conocimiento de las vías y los mecanismos de pasaje de fármacos desde la cavidad nasal hasta el SNC es fundamental para avanzar en el desarrollo de tratamientos intranasales de enfermedades y trastornos neurológicos, así como para la administración de fármacos de acción central, como los analgésicos opioides.

Si bien los mecanismos subyacentes del pasaje de fármacos desde la cavidad nasal al SNC no son del todo comprendidos, varias investigaciones demuestran la gran importancia de los nervios olfatorio y trigémino, que conectan la cavidad nasal con el cerebro y la médula espinal.

Se han reportado otras vías de pasaje, aunque menores, que involucran la vasculatura, líquido cefalorraquídeo (LCR) y sistema linfático. Estas vías actuarían amplificando el transporte de moléculas desde la cavidad nasal al SNC.

Es probable que la combinación de todas estas vías sea la responsable del pasaje total. La predominancia de cada una de ellas en el proceso dependerá de las características fisicoquímicas del fármaco, de la formulación del medicamento y del tipo de dispositivo de entrega utilizado (actuador nasal) (Dhuria *et al.*, 2010).

2.1. Vía del nervio olfatorio

Los fármacos administrados por la vía intranasal pueden acceder rápidamente al SNC transportándose a lo largo de la vía neural del nervio olfatorio.

El nervio olfatorio es el componente principal de la conexión directa entre la cavidad nasal y el SNC. En este contexto, se ha reportado que fármacos coligados con marcadores fluorescentes son transportados a través de la placa cribiforme asociados a los nervios olfatorios (Jansson & Bjork, 2002), alcanzando las concentraciones máximas en los bulbos olfatorios (Thorne *et al.*, 2004). La correlación positiva entre las concentraciones en el epitelio olfatorio y en los bulbos olfatorios ha sido reportada (Dhuria *et al.*, 2009).

Las vías olfatorias tienen su origen en la porción caudal de la cavidad nasal, en la región olfatoria, donde las neuronas receptoras olfatorias (ORN) están intercaladas entre las células de soporte (células sustentaculares), células sensoriales y células basales. Las ORNs median el sentido del olfato al transmitir información sensorial del entorno periférico al SNC (Clerico *et al.*, 2003). La lámina propia contiene glándulas de Bowman, axones, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y tejido conectivo. Las dendritas de las ORNs se extienden a la capa mucosa del epitelio olfatorio, mientras que los axones bipolares se extienden centralmente a través de la lámina propia y a través de

perforaciones en la placa cribiforme del hueso etmoidal. Los axones de las ORNs pasan a través del espacio subaracnoideo, que contiene LCR, y terminan en las células mitrales de los bulbos olfatorios. A partir de ahí, las proyecciones neuronales se extienden a regiones cerebrales múltiples incluyendo el tracto olfatorio, núcleo olfatorio anterior, corteza piriforme, amígdala e hipotálamo (Buck, 2000).

Los mecanismos de transporte a lo largo de los nervios olfatorios son de dos tipos, extracelulares e intracelulares (Fig 3).

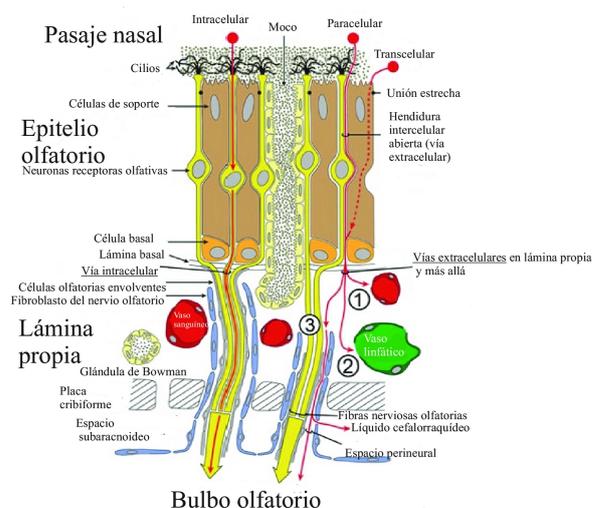


Figura 3. Representación esquemática de las vías de transporte de fármacos desde la cavidad nasal a la circulación sistémica y pasaje directo al SNC. (1) Absorción a través de los capilares olfatorios y entrada en la circulación sistémica. (2) Absorción a través de los vasos linfáticos de la región olfatoria que drenan en los linfonódulos profundos del cuello. (3) Difusión o convección extracelular en compartimentos asociados con haces de nervios olfatorios y entrada en el compartimento craneal. Se muestra el transporte dentro del espacio perineural limitado por fibroblastos del nervio olfatorio. Sin embargo, existen otras posibilidades, por ejemplo, el transporte dentro del compartimento de la neurona olfatoria contenida por células envolventes, el transporte dentro de los espacios perivasculares de los vasos sanguíneos que atraviesan la lámina cribiforme junto con nervios olfatorios (no se muestra) o el transporte dentro de los vasos linfáticos que atraviesan la lámina cribiforme con nervios olfatorios (no se muestra). Se muestran las posibles vías para la distribución de sustancias desde el espacio perineural hacia el líquido cefalorraquídeo (LCR) del espacio subaracnoideo olfatorio o hacia el bulbo olfatorio. Adaptada de Lochhead & Thorne, 2014.

Los mecanismos extracelulares de transporte se consideran los más importantes. Implican el pasaje rápido de moléculas desde las células del epitelio nasal hasta el SNC; se ha reportado que la administración intranasal de neurotrofinas, neuropéptidos, citoquinas y carbamazepina conduce,

en un lapso menor a los 10 minutos, a niveles detectables en los bulbos olfatorios y otras áreas del SNC (Frey, 2002).

El transporte extracelular involucra mecanismos de flujo masivo a través de los espacios (canales) existentes entre las neuronas y las células envoltantes (Thorne & Frey, 2001). Alternativamente, los fármacos también pueden ser propulsados a través de estos canales por los cambios estructurales que ocurren durante la despolarización y propagación axonal del potencial de acción en los axones adyacentes (Luzzati *et al.*, 2004).

El mecanismo de transporte intracelular, si bien es importante, es probable que no sea la vía predominante de transporte de fármacos hacia el SNC. Este involucra la entrada de moléculas a las neuronas por difusión pasiva, endocitosis mediada por receptor y/o endocitosis adsorbente, seguida por transporte axonal lento (Banks *et al.*, 2004; Hashizume *et al.*, 2008; Nonaka *et al.*, 2008; Ross *et al.*, 2004; Thorne *et al.*, 2004).

Este pasaje es mucho más lento que el extracelular, requiriéndose horas, hasta días, para la llegada del fármaco a los bulbos olfatorios y otras áreas cerebrales tras su administración intranasal (Baker & Spencer, 1986; Broadwell & Ballin, 1985; Kristensson & Olsson, 1971). Este tipo de pasaje ha sido reportado para partículas de oro y sales de aluminio (Perl & Good, 1987).

La mayoría de los estudios de administración intranasal de fármacos publicados hasta la fecha reporta una entrega rápida de fármaco, con altas concentraciones en el SNC y efectos clínicos inmediatos, consistente con el mecanismo extracelular de transporte (Banks *et al.*, 2004; Charlton *et al.*, 2008; Hanson & Frey, 2008; Hashizume *et al.*, 2008; Nonaka *et al.*, 2008; Ross *et al.*, 2004; Thorne *et al.*, 2004).

2.2. Vía del nervio trigémino

La vía del nervio trigémino es un tipo de pasaje poco reportado. Sin embargo, en los últimos años su importancia como conexión entre la cavidad nasal y el SNC está siendo reconocida; ha sido reportada la distribución cerebral de fármacos administrados por la vía intranasal a zonas asociadas directamente a la vía del nervio trigémino, como tronco encefálico y cerebelo (Charlton *et al.*, 2008; Banks *et al.*, 2004).

El nervio trigémino inerva el epitelio respiratorio y olfativo de la cavidad nasal, entrando posteriormente al SNC a nivel del puente (Clerico *et al.*, 2003; Gray, 1978). Curiosamente, una pequeña porción del nervio trigémino termina en los bulbos olfatorios (Cauna, 1982).

El transporte de fármacos administrados por la vía intranasal a lo largo de las vías del nervio trigémino fue demostrado por Thorne *et al.* (2004). Estos autores administraron factor de crecimiento similar a la insulina tipo I marcada con ¹²⁵I (¹²⁵I-IGF-I) por vía intranasal y observaron

altos niveles de radiactividad en las ramas del nervio trigémino, el ganglio trigeminal, protuberancia y bulbos olfatorios, consistente con el transporte de la sustancia radioactiva a lo largo de los nervios trigémino y olfatorio (Thorne *et al.*, 2004).

El nervio trigémino conduce información sensorial desde la cavidad nasal, la cavidad oral, los párpados y la córnea al SNC a través de sus tres ramas: el nervio oftálmico (V1), el maxilar (V2) y el mandibular (V3) (Gray, 1978). Las ramas de la porción oftálmica inervan la mucosa nasal dorso-craneal, mientras que las ramas de la porción maxilar inervan a las paredes laterales de la cavidad. La porción mandibular se extiende a la mandíbula inferior y dientes, sin entrada directa de neuronas a la cavidad nasal.

Las tres porciones del nervio trigémino se unen en el ganglio trigeminal y se extienden centralmente hasta su ingreso al cerebro a nivel de la protuberancia, terminando en los núcleos del nervio trigémino espinal en el tronco encefálico.

Una característica exclusiva del nervio trigémino es que ingresa al cerebro desde el epitelio respiratorio de las fosas nasales a través dos sitios: el foramen lacerum cerca de la protuberancia, y la lámina cribiforme, cerca de los bulbos olfatorios; de esta manera provee dos puntos de entrada para los fármacos administrados por vía intranasal, uno en el cerebro caudal y otro en el rostral (Dhuria *et al.*, 2010).

También es probable que otros nervios que inervan la cara y la cabeza, como el nervio facial u otras estructuras sensoriales en la cavidad nasal, puedan proporcionar puntos de entrada de los agentes terapéuticos hacia el SNC.

2.3. Vías vasculares

Tradicionalmente, la vía de administración intranasal ha sido utilizada para el suministro de fármacos a la circulación sistémica a través de la absorción en los vasos sanguíneos de la mucosa nasal.

El epitelio de la mucosa olfatoria recibe sangre de pequeñas ramas de la arteria oftálmica, mientras que la mucosa respiratoria recibe sangre desde una arteria de gran calibre derivada de la maxilar. La densidad de los vasos sanguíneos es mucho mayor en la mucosa respiratoria que en la olfatoria, haciendo que la región respiratoria sea un sitio ideal para la absorción sistémica de fármacos (DeSesso, 1993).

La vasculatura de la región respiratoria posee una mezcla de endotelios continuos y fenestrados (Grevers & Herrman, 1987) permitiendo que tanto moléculas pequeñas como grandes puedan acceder a la circulación sistémica después de la administración intranasal. La llegada de fármacos al SNC tras su llegada a la circulación sistémica y el transporte posterior a través de la barrera hemoencefálica es posible, especialmente para

moléculas pequeñas y lipofílicas, que ingresan más fácilmente a la sangre y pueden cruzar dicha barrera.

Una vía de ingreso directo al SNC a través de los vasos de la mucosa nasal está relacionada con la transferencia de fármacos desde la circulación venosa nasal a la circulación arterial (carótida) y de ahí al cerebro y la médula espinal; este proceso ha sido denominado “transferencia de contracorriente” (Einer-Jensen & Hunter, 2005).

Por otro lado, se ha reportado un segundo mecanismo de transporte directo al SNC que involucra los canales asociados con los vasos sanguíneos de la mucosa nasal, también llamados canales perivasculares. Los espacios perivasculares son limitados por la capa más externa de los vasos sanguíneos y la membrana basal del tejido circundante (Pollock *et al.*, 1997) y actúan como sistema linfático para el cerebro; a través de ellos sustancias derivadas de las neuronas se eliminan desde el fluido intersticial cerebral a los vasos sanguíneos. Este tránsito ha sido demostrado a través de la utilización de sustancias radiomarcadas, tinta china y beta amiloide (Bradbury *et al.*, 1981; Zhang *et al.*, 1992).

El transporte perivascular es, a diferencia de la difusión, un mecanismo de flujo masivo (Groothuis *et al.*, 2007) que obtiene su energía cinética de las pulsaciones (Rennels *et al.*, 1985). La presencia de la denominada “bomba perivascular de transporte” explica la distribución rápida de los agentes terapéuticos a todo el cerebro (Hadaczek *et al.*, 2006; Schley *et al.*, 2005). De esta manera los fármacos administrados por la vía intranasal pueden ingresar a los espacios perivasculares de la cavidad llegando posteriormente al cerebro con una distribución generalizada.

2.4. Vía del LCR - vasos linfáticos

El drenaje del LCR incluye las vías que conectan el espacio subaracnoideo, los espacios perineurales que acompañan los nervios olfatorios y los linfáticos nasales; todas estas vías han demostrado proporcionar acceso y distribución dentro del SNC a los agentes terapéuticos administrados por vía intranasal. Si bien a la fecha no existen estudios en equinos, en otras especies animales, ovinos, lagomorfos y roedores, estas vías de drenaje representan aproximadamente 50 % del *clearance* del LCR (Boulton *et al.*, 1999; Bradbury *et al.*, 1981; Cserr *et al.*, 1992).

Varios estudios documentan que los marcadores inyectados en el LCR a nivel de los ventrículos cerebrales drenan desde el espacio subaracnoideo a la parte inferior de las bombillas olfativas llegando al sistema linfático nasal y linfónodo cervical. Los fármacos administrados por la vía intranasal utilizan estas vías, moviéndose en dirección opuesta, para acceder y distribuirse dentro del SNC (Kida *et al.*, 1993; Walter *et al.*, 2006).

3. Factores que afectan la absorción sistémica y el transporte de fármacos administrados por la vía intranasal

Como en todo proceso de absorción, independientemente del lugar en el que se lleve a cabo, el primer paso es el pasaje a través de la mucosa.

La absorción nasal de fármacos es afectada por el peso molecular, tamaño y pK del fármaco, así como el pH de la formulación y el volumen administrado (Agarwal & Mishra, 1999; Fisher *et al.*, 1987). Sin embargo, el factor que mejor correlaciona con la absorción intranasal es el peso molecular; las moléculas pequeñas y sin carga son las de mayor velocidad de pasaje. Se reporta que el peso molecular máximo de una molécula para atravesar la mucosa nasal es de 1000 daltons (Wheatley *et al.*, 1988).

La forma de la molécula es también importante. Las moléculas rectangulares o cuadradas tienen menor biodisponibilidad que las de forma circular (McMartin *et al.*, 1987). Adicionalmente, es importante recordar que las partículas deben tener un tamaño superior a los 10 nm para evitar el depósito directo en el pulmón (Jones *et al.*, 1997).

La hidrofiliidad es otro factor que reduce la biodisponibilidad del fármaco (Corbo *et al.*, 1989), al igual que el pH de la cavidad nasal y el pK del fármaco a administrar. Es importante remarcar que butorfanol es un ácido débil, por lo que se encuentra no ionizado en medios ácidos. En este contexto, es importante mantener el pH de las formulaciones en el rango de 4,5 a 6,5 para evitar la irritación nasal (Romeo *et al.*, 1998).

Dentro de los factores locales que pueden alterar la absorción de los fármacos administrados por vía intranasal, se incluyen el *clearance* mucociliar y el metabolismo enzimático local.

El *clearance* mucociliar es uno de los factores locales con mayor influencia en la biodisponibilidad de los fármacos administrados por vía intranasal, especialmente aquellos que atraviesan las membranas lentamente (moléculas de gran tamaño o de baja liposolubilidad) o son administrados en forma de polvos. El tiempo de barrido mucociliar nasal en equinos no ha sido reportada; en humanos es de entre 15 y 30 minutos (Soane *et al.*, 1999). Una estrategia para mejorar la biodisponibilidad de fármacos con malos perfiles fisicoquímicos para administración intranasal es realizar la administración en el límite más externo del vestíbulo nasal (Kublik & Vidgern, 1998).

En relación con la actividad enzimática en la mucosa nasal como factor limitante de la administración de fármacos, es solo aplicable a fármacos con estructura peptídica y a proteínas. Esto es consecuencia de que la actividad enzimática a este nivel se limita a exo- y endopeptidasas (Lee & Yamamoto, 1989; Morimoto *et al.*, 1995).

4. Aplicaciones clínicas de la vía intranasal

A diferencia de lo que sucede en medicina veterinaria, la vía intranasal es ampliamente utilizada en medicina humana.

Esta vía se utiliza para la aplicación de una amplia gama de vacunas, incluyendo las vacunas contra difteria (Alpar *et al.*, 2001), tétanos (Alpar *et al.*, 2001), influenza (Singh *et al.*, 2001), cólera (Yuki *et al.*, 2001) y virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Velin & Kraehenbuhl, 2000). Su uso también ha sido reportado para la administración de péptidos y proteínas como insulina (Benedict *et al.*, 2011), calcitonina (Lochhead & Throne, 2012), hormona del crecimiento (Hedin *et al.*, 1993) y desmopresina (Lopes *et al.*, 2008), entre otros. Su aplicación para lograr una vía directa al SNC (*nose to brain delivery*) está siendo ampliamente desarrollada para antiepilépticos, como carbamazepina (Serralheiro *et al.*, 2014) opioides, como fentanilo, alfentanilo, butorfanol, oxycodona (Grassin-Delyle *et al.*, 2012) y benzodiazepinas, como diazepam (Sharma *et al.*, 2015).

A manera de ejemplo para demostrar la potencialidad de la vía intranasal, en la Tabla 1 se presentan algunas de las formulaciones comerciales en el mercado farmacéutico humano (Grassin-Delyle *et al.*, 2012).

PRINCIPIO ACTIVO	NOMBRE COMERCIAL	INDICACIONES
Buserelina	Suprefact nasal®	Cáncer de próstata
Nafarelina	Synarel®	Endometriosis
		Prevención y control de la polidipsia,
Desmopresina	Minirin®	poliuria y deshidratación en pacientes con diabetes insípida
Calcitonina	Miacalcin®	Osteoporosis post-menopáusica
Dihidroergotamina	Diergo-spray®	Migraña
Sumatriptan	Imigran®	Migraña
Butorfanol	Stadol NS®	Dolor
Fentanilo	Instanyl®, ecFent®	Dolor
Estradiol	Aerodiol®	Terapia de reemplazo hormonal
Nicotina	Nicotrol NS®	Control fumadores
Oxitocina	Syntocinon®	Inducción al parto y estimulación de la lactancia
Cianocobalamina	Nascobal®	Deficiencia de Vit B12
Vacuna de Influenza	FluMist®	Prevención de gripe N1H1

Tabla 1. Formulaciones comerciales de administración intranasal encontradas en el mercado farmacéutico humano (Grassin-Delyle *et al.*, 2012).

Como se mencionó previamente, el uso de la vía intranasal en equinos es muy limitado. Desde hace unos años nuestro grupo de investigación se encuentra abocado al estudio de esta vía de administración en equinos, habiéndose desarrollado diversas formulaciones experimentales de butorfanol para administración intranasal.

A la fecha hemos reportado que la administración intranasal es tolerada por los equinos; no se observan muestras de rechazo ni irritación tras la administración de 3 disparos consecutivos de 200 µl de solución fisiológica o formulación experimental (Ferreira *et al.*, 2015). Asimismo, hemos reportado una biodisponibilidad cercana al 60 % para una formulación intranasal de butorfanol desarrollada en nuestro laboratorio (Ferreira *et al.*, 2018).

Conclusiones

En conclusión, la vía de administración intranasal es una alternativa válida de la vía intravenosa para la administración de fármacos en equinos. Además de sus características de practicidad, ausencia de dolor y abrasión de epitelios, la presencia de un transporte directo al SNC, la convierte en una importante herramienta terapéutica para la administración de fármacos de acción central.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo entre estos últimos las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Bibliografía

Agarwal V, Mishra B. 1999. Recent trends in drug delivery systems: intranasal drug delivery. *Indian Journal of Experimental Biology*. 37(1):6-16.

Alpar HO, Eyles JE, Williamson ED, Somavarapu S. 2001. Intranasal vaccination against plague, tetanus and diphtheria. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 51(1-3):173-201.

Baker H, Spencer RF. 1986. Transneuronal transport of peroxidase-conjugated wheat germ agglutinin (WGA-HRP) from the olfactory epithelium to the brain of the adult rat. *Experimental Brain Research*. 63:461-73. doi: 10.1007/BF00237470

Balin BJ, Broadwell RD, Salzman M, el-Kalliny M. 1986. Avenues for entry of peripherally administered protein to the central nervous system in mouse, rat, and squirrel monkey. *The Journal of Comparative Neurology*. 251(2):260-80. doi: 10.1002/cne.902510209

Banks WA, Doring MJ, Niehoff ML. 2004. Brain uptake of the glucagon-like peptide-1 antagonist

- exendin(9-39) after intranasal administration. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 309 (2):469-75. doi: [10.1124/jpet.103.063222](https://doi.org/10.1124/jpet.103.063222)
- Benedict C, Frey WH 2nd, Schiöth, HB, Schultes B, Born J, Hallschmid M. 2011. Intranasal insulin as a therapeutic option in the treatment of cognitive impairments. *Experimental Gerontology*. 46(2-3): 112-5. doi: [10.1016/j.exger.2010.08.026](https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.08.026)
- Boulton M, Flessner M, Armstrong D, Mohamed R, Hay J, Johnston M. 1999. Contribution of extracranial lymphatics and arachnoid villi to the clearance of a CSF tracer in the rat. *American Journal of Physiology*. 276(3):R818-R23. doi: [10.1152/ajpregu.1999.276.3.R818](https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.276.3.R818)
- Bourganis V, Kammona O, Alexopoulos A, Kiparissides C. 2018. Recent advances in carrier mediated nose-to-brain delivery of pharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 128:337-62. doi: [10.1016/j.ejpb.2018.05.009](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.05.009)
- Bradbury MW, Cserr HF, Westrop RJ. 1981. Drainage of cerebral interstitial fluid into deep cervical lymph of the rabbit. *American Journal of Physiology*. 240(4):F329-F36. doi: [10.1152/ajprenal.1981.240.4.F329](https://doi.org/10.1152/ajprenal.1981.240.4.F329)
- Broadwell RD, Balin BJ. 1985. Endocytic and exocytic pathways of the neuronal secretory process and trans synaptic transfer of wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase in vivo. *The Journal of Comparative Neurology*. 242(4):632-50. doi: [10.1002/cne.902420410](https://doi.org/10.1002/cne.902420410)
- Buck LB. 2000. The chemical senses. En: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. *Principles of neural science*. 4th edition. New York, McGraw-Hill Companies. pp. 625-52.
- Cauna N. 1982. Blood and nerve supply of the nasal lining. En: Proctor DF, Andersen I, editors. *The nose: Upper airway physiology and the atmospheric environment*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press. pp. 45-69.
- Charlton ST, Whetstone J, Fayinka ST, Read KD, Illum L, Davis SS. 2008. Evaluation of direct transport pathways of glycine receptor antagonists and an angiotensin antagonist from the nasal cavity to the central nervous system in the rat model. *Pharmaceutical Research*. 25(7):1531-43. doi: [10.1007/s11095-008-9550-2](https://doi.org/10.1007/s11095-008-9550-2)
- Clerico DM, To WC, Lanza DC. 2003. Anatomy of the human nasal passages. En: Doty RL, editor. *Handbook of olfaction and gustation*. 2nd edition. New York: Marcel Dekker. Inc. pp. 1-16.
- Corbo DC, Huang YC, Chien, YW. 1989. Nasal delivery of progestational steroids in ovariectomized rabbits. II. Effect of penetrant hydrophilicity. *International Journal of Pharmaceutics*. 50(3):253-60. doi: [10.1016/0378-5173\(89\)90128-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90128-2)
- Cserr HF, Harling-Berg CJ, Knopf PM. 1992. Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance. *Brain Pathology*. 2 (4):269-76. doi: [10.1111/j.1750-3639.1992.tb00703.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1992.tb00703.x)
- Dando SJ, Mackay-Sim A, Norton R, Currie BJ, St John JAS, Ekberg, JA, Batzloff M, Ulett GC, Beacham IR. 2014. Pathogens penetrating the central nervous system: infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion. *Clinical Microbiology Reviews*. 27(4): 691-726. doi: [10.1128/CMR.00118-13](https://doi.org/10.1128/CMR.00118-13)
- DeSesso JM. 1993. The relevance to humans of animal models for inhalation studies of cancer in the nose and upper airways. *Qual Assur*. 2(3):213-31.
- Dhanda DS, Frey WH 2nd, Leopold D, Kompella UB. 2005. Approaches for drug deposition in the human olfactory epithelium. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 5:64-72.
- Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH 2nd. 2009. Novel vasoconstrictor formulation to enhance intranasal targeting of neuropeptide therapeutics to the central nervous system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 328(1):312-20. doi: [10.1124/jpet.108.145565](https://doi.org/10.1124/jpet.108.145565)
- Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH 2nd. 2010. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 99(4):1654-73. doi: [10.1002/jps.21924](https://doi.org/10.1002/jps.21924)
- Einer-Jensen N, Hunter RHF. 2005. Counter-current transfer in reproductive biology. *Society for Reproduction and Fertility*. 129(1):9-18. doi: [10.1530/rep.1.00278](https://doi.org/10.1530/rep.1.00278).
- Falcone JA, Salameh, TS, Yi X, Cordy BJ, Mortell WG, Kabanov AV, Banks WA. 2014. Intranasal administration as a route for drug delivery to the brain: Evidence for a unique pathway for albumin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 351(1):54-60. doi: [10.1124/jpet.114.216705](https://doi.org/10.1124/jpet.114.216705)
- Ferreira V, Teme Centurion O, Monina M, Landoni, MF. 2015. Evaluación de la vía intranasal para la administración de opioides en equinos. V Jornadas de Jóvenes Investigadores "Ciencia y Sociedad". Buenos Aires. *Invet* 17(1):63.

- Ferreira V, Zapata G, Landoni MF. 2018. Disposición plasmática del butorfanol tras su administración intranasal e intravenosa en equinos. VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores. Buenos Aires. *Invet* 20(1):120.
- Fisher AN, Brown K, Davis SS, Parr GD, Smith DA. 1987. The effect of molecular size on the nasal absorption of water-soluble compounds in the albino rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 39(5):357-62. doi: [10.1111/j.2042-7158.1987.tb03398.x](https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1987.tb03398.x)
- Frey WH II. 1991. En: WPTO, editor. Neurologic agents for nasal administration to the brain. US: Chiron Corporation.
- Frey WH II. 2002. Bypassing the blood-brain barrier to delivery therapeutic agents to the brain and spinal cord. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2:46-9.
- Gänger S, Schindowski K. 2018. Tailoring formulations for intranasal nose-to-brain delivery: a review on architecture, physicochemical characteristics and mucociliary clearance of the nasal olfactory mucosa. *Pharmaceutics*. 10(3):116-44. doi: [10.3390/pharmaceutics10030116](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030116)
- Grassin-Delye S, Buenestado A, Naline, E, Faisy C, Blouquit-Laye S, Couderc LJ, Le Guen M, Fischler M, Devillier P. 2012. Intranasal drug delivery: an efficient and non-invasive route for systemic administration: focus on opioids. *Pharmacology & Therapeutics*. 134(3):366-79. doi: [10.1016/j.pharmthera.2012.03.003](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.03.003)
- Gray H. 1978. Gray's anatomy. 15th revised edition (Classic Collectors edition). New York, Bounty Books.
- Grevers G, Herrmann U. 1987. Fenestrated endothelia in vessels of the nasal mucosa. An electron-microscopic study in the rabbit. *Archives of Otorhinolaryngology*. 244(1):55-60.
- Groothuis DR, Vavra MW, Schlageter KE, Kang EW, Itskovich AC, Hertzler S, Allen CV, Lipton HL. 2007. Efflux of drugs and solutes from brain: The interactive roles of diffusional transcapillary transport, bulk flow and capillary transporters. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 27(1):43-56. doi: [10.1038/sj.jcbfm.9600315](https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600315)
- Hadaczek P, Yamashita Y, Mirek H, Tamas L, Bohn MC, Noble C, Park JW, Bankiewicz K. 2006. The "perivascular pump" driven by arterial pulsation is a powerful mechanism for the distribution of therapeutic molecules within the brain. *Molecular Therapy*. 14(1):69-78. doi: [10.1016/j.ymthe.2006.02.018](https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.02.018)
- Hanson LR, Frey WH 2nd. 2008. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. *BMC Neuroscience*. 9:S5. doi: [10.1186/1471-2202-9-S3-S5](https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-S3-S5)
- Hare WCD. 1982. Capítulo 19: Sistema respiratorio de los equinos. En: Getty R, Sisson S, Grossman JD. Anatomía de los animales domésticos. Tomo I. 5ta edición. Barcelona, Salvat Editores S.A, pp. 557-72.
- Hashizume R, Ozawa T, Gryaznov SM, Bollen AW, Lamborn KR, Frey WH 2nd, Deen DF. 2008. New therapeutic approach for brain tumors: Intranasal delivery of telomerase inhibitor GRN163. *Neuro-Oncology*. 10(2):112-20. doi: [10.1215/15228517-2007-052](https://doi.org/10.1215/15228517-2007-052)
- Hedin L, Olsson B, Diczfalusy M, Flyg C, Petersson AS, Rosberg S, Albertsson-Wikland K. 1993. Intranasal administration of human growth hormone (hGH) in combination with a membrane permeation enhancer in patients with GH deficiency: a pharmacokinetic study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 76(4):962-7. doi: [10.1210/jcem.76.4.8473411](https://doi.org/10.1210/jcem.76.4.8473411)
- Jansson B, Bjork E. 2002. Visualization of in vivo olfactory uptake and transfer using fluorescein dextran. *Journal of Drug Targeting*. 10(5):379-86 doi: [10.1080/1061186021000001823](https://doi.org/10.1080/1061186021000001823)
- Jones D, Woolfson AD, Brown AF. 1997. Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 151(2):223-33. doi: [10.1016/S0378-5173\(97\)04904-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)04904-1)
- Kida S, Pantazis A, Weller RO. 1993. CSF drains directly from the subarachnoid space into nasal lymphatics in the rat. Anatomy, histology and immunological significance. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 19(6):480-8. doi: [10.1111/j.1365-2990.1993.tb00476.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1993.tb00476.x)
- Kristensson K, Olsson Y. 1971. Uptake of exogenous proteins in mouse olfactory cells. *Acta Neuropathologica*. 19(2):145-54.
- Kublik H, Vidgren MT. 1998. Nasal delivery systems and their effect on deposition and absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 29(1-2):157-77. doi: [10.1016/S0169-409X\(97\)00067-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00067-7)
- Lee VH, Yamamoto A. 1989. Penetration and enzymatic barriers to peptide and protein absorption. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 4(2):171-207. doi: [10.1016/0169-409X\(89\)90018-5](https://doi.org/10.1016/0169-409X(89)90018-5)

- Lochhead JJ, Thorne RG. 2012. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64(7):614-28. doi: [10.1016/j.addr.2011.11.002](https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.002)
- Lochhead JJ, Thorne RG. 2014. Capítulo 14: intranasal drug delivery to the brain. En: Hammarlund-Udenaes M, Lange ECM, Thorne RG & Editors Drug Delivery to the Brain: Physiological Concepts, Methodologies and Approaches. 1st edition. New York. aapspress. Springer. pp. 401-32.
- Lopes T, Dias JS, Marcelino J, Varela J, Ribeiro S, Dias J. 2008. An assessment of the clinical efficacy of intranasal desmopressin spray in the treatment of renal colic. *BJU International*. 87(4):322-5. doi: [10.1046/j.1464-410x.2001.00068.x](https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.2001.00068.x)
- Luzzati V, Benoit E, Charpentier G, Vachette P. 2004. X-ray scattering study of pike olfactory nerve: Elastic, thermodynamic and physiological properties of the axonal membrane. *Journal of Molecular Biology*. 343(1):199-212. doi: [10.1016/j.jmb.2004.08.029](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.029)
- McMartin C, Hutchinson LE, Hyde R, Peters GE. 1987. Analysis of structural requirements for the absorption of drugs and macromolecules from the nasal cavity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 76(7):535-40. doi: [10.1002/jps.2600760709](https://doi.org/10.1002/jps.2600760709)
- Morimoto K, Miyazaki M, Kakemi M. 1995. Effects of proteolytic enzyme inhibitors on nasal absorption of salmon calcitonin in rats. *International Journal of Pharmaceutics*. 113(1):1-8. doi: [10.1016/0378-5173\(94\)00158-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(94)00158-2)
- Nonaka N, Farr SA, Kageyama H, Shioda S, Banks WA. 2008. Delivery of galanin-like peptide to the brain: Targeting with intranasal delivery and cyclodextrins. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 325(2):513-19. doi: [10.1124/jpet.107.132381](https://doi.org/10.1124/jpet.107.132381)
- Perl PD, Good PF. 1987. Uptake of aluminium into central system along nasal-olfactory pathways. *The Lancet*. 329(8540):1028. doi: [10.1016/S0140-6736\(87\)92288-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)92288-4)
- Pollock H, Hutchings M, Weller RO, Zhang ET. 1997. Perivascular spaces in the basal ganglia of the human brain: Their relationship to lacunes. *Journal of Anatomy*. 191:337-46. doi: [10.1046/j.1469-7580.1997.19130337.x](https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1997.19130337.x)
- Rennels ML, Gregory TF, Blaumanis OR, Fujimoto K, Grady PA. 1985. Evidence for a 'paravascular' fluid circulation in the mammalian central nervous system, provided by the rapid distribution of tracer protein throughout the brain from the subarachnoid space. *Brain Research*. 326(1):47-63. doi: [10.1016/0006-8993\(85\)91383-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)91383-6)
- Romeo VD, deMeireles J, Sileno AP, Pimplaskar, HK, Behl CR. 1998. Effects of physicochemical properties and other factors on systemic nasal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 29(1-2):89-116. doi: [10.1016/S0169-409X\(97\)00063-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00063-X)
- Ross TM, Martinez PM, Renner JC, Thorne RG, Hanson LR, Frey WH 2nd. 2004. Intranasal administration of interferon beta bypasses the bloodbrain barrier to target the central nervous system and cervical lymph nodes: A non-invasive treatment strategy for multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 151(1-2):66-77. doi: [10.1016/j.jneuroim.2004.02.011](https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.02.011)
- Schaefer ML, Böttger B, Silver WL, Finger TE. 2002. Trigeminal collaterals in the nasal epithelium and olfactory bulb: A potential route for direct modulation of olfactory information by trigeminal stimuli. *Journal of Comparative Neurology*. 444(3):221-6. doi: [10.1002/cne.10143](https://doi.org/10.1002/cne.10143)
- Schley D, Carare-Nnadi R, Please CP, Perry VH, Weller RO. 2005. Mechanisms to explain the reverse perivascular transport of solutes out of the brain. *Journal of Theoretical Biology*. 238(4):962-74. doi: [10.1016/j.jtbi.2005.07.005](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2005.07.005)
- Serralheiro A, Alves G, Fortuna A, Falcão A. 2014. Intranasal administration of carbamazepine to mice: a direct delivery pathway for brain targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 60:32-9. doi: [10.1016/j.ejps.2014.04.019](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.04.019)
- Sharma S, Lohan S, Murthy, RSR. 2014. Formulation and characterization of intranasal mucoadhesive nanoparticulates and thermo-reversible gel of levodopa for brain delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 40(7): 869-78. doi: [10.3109/03639045.2013.789051](https://doi.org/10.3109/03639045.2013.789051)
- Singh M, Vajdy M, Gardner J, Briones M, O'Hagan D. 2001. Mucosal immunization with HIV-1 gag DNA on cationic microparticles prolongs gene expression and enhances local and systemic immunity. *Vaccine*. 20(3-4):594-602. doi: [10.1016/S0264-410X\(01\)00321-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00321-8)
- Soane RJ, Frier M, Perkins AC, Jones NS, Davis SS, Illum L. 1999. Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans. *International Journal of Pharmaceutics*. 178(1):55-65. doi: [10.1016/S0378-5173\(98\)00367-6](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00367-6)
- Tayebati SK, Nwankwo IE, Amenta F. 2013. Intranasal drug delivery to the central nervous system: present status and future outlook. *Current Pharmaceutical Design*. 19(3):510-26. doi: [10.2174/1381612811306030510](https://doi.org/10.2174/1381612811306030510)
- Thorne RG, Emory CR, Ala TA, Frey WH 2nd. 1995. Quantitative analysis of the olfactory

pathway for drug delivery to the brain. *Brain Research*. 692(1-2):278-82.

doi: [10.1016/0006-8993\(95\)00637-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00637-6)

Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V, Frey WH 2nd. 2004. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*. 127(2):481-96.

doi: [10.1016/j.neuroscience.2004.05.029](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.05.029)

Thorne RG, Frey WH 2nd. 2001. Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: Pharmacokinetic considerations. *Clinical Pharmacokinetics*. 40(12):907-46.

doi: [10.2165/00003088-200140120-00003](https://doi.org/10.2165/00003088-200140120-00003)

Velin D, Kraehenbuhl JP. 2000. Delivery systems and adjuvants for vaccination against HIV. *Pathobiology EXS*. 89:227-37.

Walter BA, Valera VA, Takahashi S, Matsuno K, Ushiki T. 2006. Evidence of antibody production in the rat cervical lymph nodes after antigen administration into the cerebrospinal fluid.

Archives of Histology and Cytology. 69(1):37-47.

doi: [10.1679/aohc.69.37](https://doi.org/10.1679/aohc.69.37)

Wheatley MA, Dent J, Wheeldon EB, Smith PL. 1988. Nasal drug delivery: An in vitro characterization of transepithelial electrical properties and fluxes in the presence or absence of enhancers. *Journal of Controlled Release*. 8(2): 167-77.

doi: [10.1016/0168-3659\(88\)90043-0](https://doi.org/10.1016/0168-3659(88)90043-0)

Yuki Y, Byun Y, Fujita M, Izutani W, Suzuki T, Udaka S, Fujihashi K, McGhee JR, Kiyono H. 2001. Production of a recombinant hybrid molecule of cholera toxin-B-subunit and proteolipid-protein-peptide for the treatment of experimental encephalomyelitis. *Biotechnology and Bioengineering*. 74(1):62-9.

doi: [10.1002/bit.1095](https://doi.org/10.1002/bit.1095)

Zhang ET, Richards HK, Kida S, Weller RO. 1992. Directional and compartmentalised drainage of interstitial fluid and cerebrospinal fluid from the rat brain. *Acta Neuropathologica*. 83(3):233-9.

De reactivo biológico al animal sintiente: el bienestar animal como cambio de paradigma en la investigación biomédica y su impacto en los resultados

From biological reagent to sentient animal: animal welfare as a paradigm shift in biomedical research and its impact on results

MASCHI FABRICIO ALEJANDRO ^{1*}, CARBONE CECILIA¹, FERRARI HÉCTOR RICARDO²

1. Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE), Facultad de Ciencias Veterinarias. 2. Cátedra de Etología. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

* Correo electrónico del autor de contacto: fmaschi@fcv.unlp.edu.ar

Resumen

El uso de animales como reactivos biológicos para investigación científica se ha justificado desde los inicios de la civilización, cuando solo servían para satisfacer las necesidades del hombre. El concepto de reactivo biológico ha cambiado al cobrar relevancia el bienestar animal, una problemática específica de la relación humano-animal referida inicialmente a los animales de producción y que ha impactado en todos los usuarios de animales. Se logró avanzar en el conocimiento de las especies, sus necesidades y en la comprensión de su comportamiento. Con esta redefinición del animal surge un nuevo objeto de estudio para la ciencia: el estado del animal en sus intentos de lidiar con su entorno y de afrontar las demandas del ambiente. Como consecuencia, se han realizado enriquecimientos del ambiente sin suficientes estudios previos llevando a la obtención de resultados erróneos. Por lo tanto, es imperativo trabajar con indicadores específicos de bienestar que permitan diagnosticar y remediar las condiciones de pobre bienestar. Los animales provistos a los investigadores deberían contar con certificaciones sobre la cepa, condiciones de crianza y, además, tipo y modalidad de enriquecimiento e indicadores de bienestar animal antes de iniciar su utilización. En el futuro, el bienestar animal no solo debe estar en la nota ética, sino que debe ser parte inexcusable de la sección metodológica de los estudios experimentales.

Palabras clave

Animales de experimentación, bienestar animal, enriquecimiento ambiental, sintiencia

Abstract

The use of animals for scientific research has been justified since the beginnings of civilization, when they were considered as a biological reagent and only served to meet the needs of humans. This concept changed when ethical considerations towards their use as experimental beings began to have greater relevance. The birth of animal welfare has impacted the entire scientific community and all animal users, allowing a greater understanding of the needs and behavior of different species. From this redefinition of the animal as a biological reagent a new object of study arises: the relationship of the animal with its environment and its attempts to cope with the demands of the environment. Several attempts have been made to enrich the environment of experimental animals in order to improve their welfare but often in a poorly studied manner, and this has produced erroneous scientific results. Therefore, it is imperative to work with specific indicators of well-being that diagnose and remedy poor welfare conditions, and accurately communicate the conditions of the groups from which the statements are made. Thus, animals provided to researchers should be accompanied with certifications about strain, breeding conditions, type of enrichment and animal welfare indicators, prior to their use. In the future, animal welfare should not only be on the ethical note of experimental studies, but also be an indisputable part in the methodological section.

Key words

Animal welfare, environmental enrichment, experimental animals, sentience

Fecha de recepción: 28/11/2018

Fecha de revisión: 04/02/2019

Fecha de aprobación: 20/05/2019

ANALECTA VET 2019; Enero-Junio; 39(1):21-31

Impresa ISSN 03655 14-8 Electrónica ISSN 1514-2590

doi.org/10.24215/15142590e034

Introducción

El uso de animales para investigación, en especial los criados en bioterios que se destinan para esa finalidad exclusivamente, forma parte de un entramado ideológico que se estructura en torno a la noción de que aquellos son un medio para un fin. Idealmente, ese fin es un bien para otros seres, los humanos fundamentalmente. Implica una serie de resignificaciones que se equilibran en la tensión entre considerarlo similar al humano (para que los resultados sean útiles) y diferentes del humano (para que su uso no genere contradicciones éticas y morales) (De Mello, 2012).

El uso de animales en investigaciones es una decisión ética que tiene que ver con las nociones del bien y del mal y, como tal, escapa a lo que pueda construir el quehacer científico en cuanto a afirmaciones. Así, muchos de los lineamientos propuestos por las organizaciones científicas invitan a preguntarse: ¿tiene sentido este uso que doy a los animales? (ASAB, 1986). Históricamente, esa decisión ética se construyó con un punto de inicio, difusamente reconocible, en la época en que los animales eran considerados máquinas; actitud que, desde un principio, encontró opositores (De Mello, 2012).

No es un tema reciente que la sociedad se plantee la cuestión ética en el uso de los animales para investigación. Desde un principio no se contó con la existencia de un criterio hegemónico. Entre 1903 y 1910, a raíz de una vivisección realizada en la Universidad de Londres por William Bayliss del Departamento de Fisiología, un grupo de protectionistas contra el uso de animales iniciaron un movimiento que pasó a la historia como, entre otros nombres, “los motines del perro marrón”. Tuvieron su momento de mayor exposición cuando el 10 de diciembre de 1907, manifestantes a favor del uso de animales, se enfrentaron en el centro de Londres con sufragistas, policías y sindicalistas, provocando disturbios y peleas callejeras extendidas (Mason, 1997).

Como todo proceso histórico, cada etapa es consecuencia de lo sucedido anteriormente. En cierta forma, los resultados científicos se vuelven obsoletos apenas publicados y sientan las bases para desarrollos que, partiendo de ellos, los trasciendan.

Lo mismo ha ocurrido con los animales de experimentación; las propias investigaciones en los que estos fueron utilizados acabaron por transformar nuestra concepción a una imagen diferente del animal máquina. Paradójicamente, a modo de las demostraciones por el absurdo de las matemáticas, considerar a los seres vivos como reactivos biológicos, es parte de lo que nos lleva a negar que sean exclusivamente reactivos. Parte de esa negación, produce en el campo científico el advenimiento de la ciencia del bienestar animal (Cardoso & Almeida, 2014; Maschi, 2017).

El bienestar animal: generalidades y componentes

Esta temática, relativamente nueva, ha impactado de una u otra manera en todos los usuarios de animales para investigación de la comunidad científica, ya sea productores o investigadores que los mantengan bajo experiencia. Esto ha influido directa o indirectamente en las investigaciones porque se ha avanzado mucho en el conocimiento de las especies y sus necesidades. Parte de ese avance, es entender que un animal no es solo su anatomía y su fisiología sino también, y especialmente, su comportamiento. Es a partir de esta redefinición del animal que surge un nuevo objeto de estudio para la ciencia: la relación del animal con su entorno y, a su vez, una nueva dimensión en la que se cuestiona no solo lo que se hace con él, sino también cómo está y siente en relación con lo que se le hace.

Es decir, como está el animal en relación con sus intentos de afrontar las demandas del ambiente y lidiar con él. Estos conceptos componen lo que se denomina bienestar animal (Broom, 2016).

Esta situación dispara una serie de interrogantes: ¿todos comprendemos las necesidades de cada especie en particular?, y si nos referimos a los más utilizados como son los roedores, ¿todas las cepas de ratas o ratones se comportan igual?, ¿tienen todas las mismas necesidades?, ¿se puede estandarizar una forma de manejo para la mejora en su bienestar?, ¿cómo sabemos que hemos logrado esa mejora?, ¿es correcto preocuparse solamente por el bienestar de los animales en producción y no por los que están bajo experimentación? y, por último, lo que adquiere relevancia en este contexto ¿afecta los resultados experimentales? (Maschi, 2017).

¿Por qué preocuparse por el bienestar?; si no tenemos ninguna obligación moral o ética hacia los animales para brindarles bienestar, no hay razón entonces para considerar si este es bueno o malo. Por otro lado, si tenemos obligaciones morales, entonces debemos ser capaces de evaluar el bienestar animal cuando trabajamos con ellos (Singer, 2015).

Aceptamos aquí que tenemos esas obligaciones y daremos un paso más. Al procurar bienestar a los animales de investigación, como en verdad estamos teniéndolos en cuenta como lo que son y no con una visión simplificada (el reactivo, la máquina), mejoraremos nuestros resultados.

El bienestar animal tiene dos componentes: físico y del comportamiento. El primero se manifiesta por un estado excelente de salud y el segundo se manifiesta por el desarrollo comportamental completo, específico de especie o cepa dada, junto con la ausencia de comportamientos atípicos para la especie. El bienestar del comportamiento refleja el bienestar psicológico, de manera

que estos dos términos llegan a ser sinónimos para nuestro uso. Para crear un estado de bienestar, cada animal necesita, entre otras cosas, un ambiente social en el cual puede gozar de un mínimo de contactos básicos y de relaciones sociales positivas. El comportamiento social permite a los animales adaptarse a las condiciones de alojamiento. Enjaular a los animales, solos, por pareja o por grupos, debería ser hecho de manera de crear un ambiente estimulante apropiado para cada especie (Hughes, 1976).

El término bienestar se confunde o aplica como sinónimo de “estar bien” y viceversa, lo cual no es correcto. El “estar bien” se relaciona con la calidad de vida del animal en el corto plazo, mientras que el bienestar está referido al largo plazo. Como ejemplo, para mejorar el bienestar de un animal, puede ser necesario reducir temporalmente su “estar bien” con la práctica de una vacunación. Como resultado de la práctica, el bienestar aumentará debido a la reducción del riesgo para el animal de padecer una enfermedad, resultando así en una vida larga y de mejor calidad (vida digna). El “estar bien” del animal al igual que el bienestar deben ser siempre evaluados por la persona responsable de su cuidado (De Grazia, 1996).

La Organización Mundial de la Salud define salud como el “estado de completo bienestar de un organismo vivo, tanto desde el punto de vista mental como físico y social”, y no solo se refiere a la ausencia de enfermedad (OMS). Sin embargo, la mayoría de los científicos se refiere a la salud animal como una condición inferior al bienestar ya que, por ejemplo, los animales pueden estar perfectamente saludables pero aun así tener una pobre calidad de vida si se encuentran alojados en ambientes incorrectos (Baumans, 2007).

Broom (1986) describe el bienestar animal como “el estado en el cual se encuentra un animal que trata de adaptarse a su ambiente”. De esta definición se desprende que el bienestar de un animal es seriamente afectado por una falla de adaptación, a pesar de cuanto haya hecho ese individuo para lograrlo y qué tan bien o mal le haya ido en ese proceso. Entre sus considerandos, Broom destaca que: a) el bienestar es una característica de un animal y no algo que se le otorga; b) puede variar desde muy pobre a muy bueno; c) debería poder medirse de una manera científica, independientemente de las consideraciones éticas; d) las medidas de cuán difícil le ha resultado a un individuo adaptarse dan una idea de cuán pobre es su bienestar; e) el conocimiento de las preferencias de un animal otorga una información sumamente importante para lograr que tenga un buen bienestar, por lo tanto las mediciones directas de cómo se encuentra se deben utilizar para mejorar el mismo.

Como los animales emplean muchas estrategias para lograr adaptarse al medio, cuando fallan en ese proceso, se producen consecuencias

que pueden ser medidas y que van a indicar que el bienestar es pobre. Por ejemplo, el hecho de que solo un parámetro como el crecimiento sea normal, no significa que el bienestar sea bueno; es por eso que al existir variedades de estrategias y resultados en el proceso de adaptación, deben medirse más de un tipo de indicadores (Broom, 1986).

La Comisión Brambell Rogers (1965) además emitió un informe en el que se describieron las “cinco libertades” de los animales domésticos y que representan la capacidad de los mismos de “darse vuelta, asearse, levantarse, acostarse y estirarse”, fácilmente.

Más tarde, la World Veterinary Association (1989) adoptó sus propias cinco libertades, que se aplican a todas las especies y que están basadas en las del Britain’s Farm Animal Welfare Council (FAWC). Estas definen los estados ideales para los animales e incluyen ser libres: 1) de hambre, sed y malnutrición; 2) de incomodidad física y dolor; 3) de sufrimiento, heridas y enfermedades; 4) de miedo y angustia prolongados; 5) para expresar un comportamiento normal (Turner, 1999).

Existen otros marcos de referencia cuando se habla de bienestar animal; sin embargo, aquí se hará hincapié en “las cinco libertades” por ser el concepto más difundido y porque no es antagonista de los otros desarrollos, que son más bien propuestas que extienden y superan estos lineamientos. En cierta forma, las “cinco libertades” aparecen como el mínimo aceptable (Mellor, 2016).

Este marco general, entendido como un conjunto de cinco grandes lineamientos, es aplicable a todos los animales mantenidos en cautiverio. Las primeras cuatro libertades se refieren a experiencias aversivas. De todos modos, es posible que un animal esté enfermo sin que él lo perciba, aunque podrían estar afectadas sus funciones naturales. Por ejemplo, si una rata preñada se infecta con el virus Kilham, la infección no la afectará directamente, aunque si atraviesa la barrera placentaria, pueden producirse abortos o malformaciones en los fetos (Baumans, 2007).

Asimismo, se debe tener en cuenta que si un animal está sufriendo, lo más probable es que no pueda sobreponerse a una situación difícil (Hawkins, 2002). Con buen alojamiento y buenas prácticas de manejo se minimizan las condiciones que llevan al miedo y angustia entre los individuos. En ambos casos las funciones naturales del animal están comprometidas.

Si bien sería un tema de largo debate cuestionar qué es el “comportamiento normal”, (Segerdahl, 2007), los ambientes estériles en los bioterios contribuyen a expresiones de “comportamientos anormales” en la mayoría de las especies; en cambio, los ambientes que simulan condiciones naturales y/o promueven la expresión de comportamientos típicos de la especie, siempre serán beneficiosos (Hau & Shapiro, 2007; ISAE, 2017).

Se considera que las normas establecidas desde hace 50 años cumplen con los requerimientos de alojamiento óptimo para los animales de experimentación. Muchas de las mejoras en las condiciones de mantenimiento y las normas de manejo fueron establecidas, primariamente, para reducir las variables y optimizar la reproducibilidad de los resultados experimentales (Lang & Vessell, 1976). Durante la última década, los esfuerzos fueron dirigidos a considerar las necesidades sociales y de comportamiento de los animales mantenidos en el laboratorio (Baumans, 2007).

Años atrás, se aceptaba que conejos y roedores de laboratorio tenían relativamente pocos requerimientos, con excepción de las necesidades esenciales de alojamiento, manejo y nutrición. Se hizo énfasis, entonces, sobre el control del ambiente, dejando de lado los otros aspectos. Algunos criterios que se han usado para evaluar objetivamente el bienestar son la ganancia de peso, el comportamiento general y el peso de las glándulas adrenales (Chamove, 1989).

Valoración del estado de bienestar

Habiendo definido el concepto de bienestar y su problemática, es necesario evaluarlo y, según Sorensen (2007), la mejor forma de hacerlo es siguiendo el método científico. La interpretación de mediciones realizadas va a depender de dos tipos de enfoques: científico y filosófico.

Según el enfoque científico, si los valores básicos obtenidos son objetivos, como lo es el buen funcionamiento biológico o la posibilidad de que los animales realicen comportamientos naturales, esto puede ser medido a través de parámetros reproductivos, prevalencia de enfermedades, medición de niveles de cortisol y observación de comportamientos estereotipados. Según el enfoque filosófico, los valores básicos obtenidos son de naturaleza subjetiva y están relacionados con el estado natural interno del animal, tales como sentimientos y preferencias. Solamente será posible evaluarlos a través de ciertos comportamientos del animal, que nos darán una medida indirecta. En la última década, se han desarrollado métodos basados en las expresiones faciales y el desvío cognitivo relacionado con los sentimientos, que permiten inferir algunos estados internos (Langford *et al.*, 2010; Mendl *et al.*, 2009).

La evaluación del estado de bienestar en los animales se realiza a través de los llamados indicadores de bienestar, empleando para ello el monitoreo de comportamientos apropiados y parámetros fisiológicos. De esta manera se puede decir que cada especie o cepa en cuestión tiene “un apropiado bienestar”. Ese nivel hipotético de bienestar ideal podría definirse como el estado de los animales cuando se alcanzan las necesidades nutricionales, de salud, medioambientales, comportamentales y mentales (Mellor & Reid, 1994).

Los tres componentes principales de un estado ideal de bienestar son el estado físico, el psicológico y el fisiológico/bioquímico. El estado físico se caracteriza por un buen nivel de aptitud física, sin incapacidades que puedan producir incomodidad o miedo o que tengan un impacto en dicha condición física y que produzcan temor. Los indicadores observables de la condición física de un animal son, entre otros: la postura del cuerpo, el pelaje, el peso y la presencia y severidad de cojeras. El estado psicológico se caracteriza porque el animal despliega un rango apropiado de comportamientos de acuerdo con lo que es conocido para esa cepa o especie. Los indicadores de que este estado se está deteriorando son, entre otros, el aumento de la agresión hacia sus compañeros de hábitaculo, huidas o retiradas, desarrollo de estereotipias y ciertos cambios en el uso del enriquecimiento. El estado fisiológico se caracteriza porque los niveles de estrés o distrés no sobrepasan a los que podrían ocurrir en el curso de interacciones sociales normales. Los indicadores serían parámetros fisiológicos como frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y niveles de hormonas como los corticosteroides los que no siempre indicarían estrés significativo (Fraser, 2004).

Una buena elección de indicadores de bienestar debe incluir la combinación de los tres estados mencionados, para permitir una correcta evaluación de interpretación del estado de un animal (Hawkins *et al.*, 2011).

Dawkins (1990) propone que el bienestar involucra los sentimientos subjetivos de los animales y Duncan (1998) sostiene que el bienestar está gobernado por los sentimientos, los cuales deberían medirse para asegurar el bienestar animal.

A lo que hacen referencia estos y otros autores es a la *sentience*, traducido al español como “sintiencia”, sensación, sentimiento más allá de la percepción mental (Chandrasekera, 2016).

El reconocimiento de la existencia de los sentimientos en animales es entendido como la capacidad de experimentar emociones tales como alegría, placer, dolor y miedo. La capacidad de sentir estados positivos y negativos es lo que impulsa el movimiento cada vez más importante del bienestar y justifica la existencia de leyes de protección animal (Proctor, 2012).

Los sentimientos en animales son difíciles de medir, pero si se asume que un animal prefiere vivir situaciones placenteras y evitar las negativas o desagradables, se pueden estimar los sentimientos midiendo las preferencias del animal (Sorensen, 2007).

Estos estados afectivos se entienden como una adaptación, orientada a evitar castigos y obtener recompensas. Una de las formas en que las emociones contribuyen al bienestar, y de hecho a la organización del comportamiento, es priorizando acciones. Las conductas que no pueden compararse por sus mecanismos o resultados (como comer, refugiarse, buscar conespecíficos, etc.), sí pueden serlo por las emociones o estados

de ánimo asociados con ellas. Entonces, un comportamiento relacionado con lo social y otro relacionado con lo alimentario, pueden compararse sobre la base del estado de ánimo que producen (Mendl & Paul, 2008; Mendl *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2005).

Cuanto más amplia sea la escala reguladora de los mecanismos homeostáticos en términos conductuales como fisiológicos, mejor estará garantizado el bienestar de los animales. Las condiciones extremas, tales como las bajas temperaturas ambientales, no afectarán al bienestar animal, siempre que sean controlables por medio de algún mecanismo como la construcción de nidos, el metabolismo, el tiriteo, etc. Para saber hasta qué punto el bienestar puede verse afectado por la adaptación a determinadas condiciones, debe conocerse exhaustivamente la especie animal utilizada. Según la especie animal, los factores ambientales tales como el tamaño y estructura de la jaula, luz (intensidad, longitud de onda, fotoperiodo, frecuencia de parpadeo), sonidos, ventilación, etc., tienen idéntica importancia como la presencia o ausencia de sus congéneres, su sexo y la predicción y control del medio ambiente (Morton, 1990).

Es inapropiado el uso del antropomorfismo acrítico en el juicio de la importancia relativa de estos factores, puesto que las condiciones que son adecuadas para conseguir el bienestar humano no tienen por qué serlo también para los animales. Esto es aplicable a la comparación entre las diferentes especies animales y entre las cepas de una misma especie. Hay una serie de investigaciones sobre el uso del antropomorfismo en el momento de evaluar los animales en sus distintos aspectos (antroponegación y antropocentrismo animal céntrico, antropocéntrico y heurístico) que deben ser tenidos en cuenta en el momento de analizar la postura epistemo-metodológica de estas investigaciones (De Waal, 1999).

Una forma de no adjudicar al animal predilecciones humanas, es estudiar las preferencias de un animal por ciertas condiciones ambientales, utilizando para ello una prueba de preferencia. Estos ensayos deben utilizarse con cuidado, ya que solo aportan una idea de una elección o preferencia determinada, en un instante dado, por parte del animal. Una ponderación entre el deseo presente del animal y el conocimiento científico es la que indicará cuales preferencias pueden beneficiar al animal a largo plazo (van de Weerd, 1996).

Otra manera de abordar este tema es a través de un sistema de puntuación para medir los signos de estrés o sufrimiento, basado en parámetros comportamentales y clínicos (Kohn *et al.*, 2007). Existen varios indicadores, tales como la piloerección, la reducción de peso corporal, el incremento de la frecuencia cardíaca, la producción de excretas diarreicas, etc. Cada uno de estos sistemas tiene como objetivo estimar el nivel de sufrimiento basándose en parámetros clínicos, fisiológicos y conductuales. Aunque la mayoría de estos parámetros se puede determinar de forma

objetiva, la interpretación de los mismos como indicadores del bienestar es subjetiva (Young, 2003).

La toma de indicadores, además de permitir la evaluación de la relación individuo-entorno, en términos de bienestar animal, actúa como diagnóstico de la situación para elaborar intervenciones, de las cuales la más utilizada es el enriquecimiento ambiental (Olfert, 1998).

Enriquecimiento ambiental en animales cautivos

El enriquecimiento ambiental, según Newberry (1995), se caracteriza como una mejora en el funcionamiento biológico de los animales cautivos, luego de haber introducido modificaciones en su ambiente. La mejora del funcionamiento biológico incluye el éxito de su vida reproductiva y aumento de su eficacia biológica inclusiva y las consecuencias de esto en el mejoramiento de su salud.

En su mayoría, los animales de experimentación son sociables y se benefician de la compañía de sus congéneres o del ser humano. Las experiencias de un animal durante sus fases de desarrollo determinan su comportamiento social. Las condiciones de alojamiento en una instalación de crianza tendrán un impacto sobre su bienestar futuro. Se deben tener en cuenta las mismas consideraciones sobre las necesidades sociales de los animales, tanto como sobre los factores ambientales (iluminación, calefacción, ventilación, hábitaculos de contención, etc.). En el caso de animales alojados individualmente, la observación diaria provee una forma alternativa de contacto social para el animal y usualmente facilita las manipulaciones, pues el animal se acostumbra a la presencia del humano (Carlson, 2017; CONADEA, 2016).

Para que los enriquecimientos en términos de intervención sean efectivos, deben realizarse teniendo en cuenta la biología de la especie. En todos los casos, es relevante tener en cuenta, como punto de partida, las características de la cepa ancestral silvestre de la que derivan los animales domésticos. Los ratones silvestres muestran una variación poblacional rítmica, aumentando hasta cierto nivel óptimo, seguido de una declinación rápida, para llegar a un nivel óptimo nuevamente (Baumans *et al.*, 2007).

En la mayoría de los laboratorios, después del destete, los ratones se alojan juntos en grupos de un mismo sexo. Aunque esto no es lo que ocurre con la especie silvestre original, los machos formarán jerarquías, proceso durante el cual puede haber peleas, estrés y heridas. Estas variantes de agresión difieren marcadamente entre las distintas cepas de laboratorio (Nevison, 1999).

Cuando los animales entran en contacto, comienza un período inicial durante el cual establecen sus relaciones sociales (rango de predominio, etc.) y se pueden producir interacciones agresivas. Sin embargo, cuando las condiciones son

favorables, la organización social se estabiliza y las interacciones estarán basadas más sobre la evasión o la amenaza que sobre el contacto. Si su rutina diaria se desorganiza, si se limitan recursos tales como los alimentos o los espacios de descanso o si los animales están mal agrupados, la jerarquía es perturbada y aumenta la cantidad de interacciones agresivas (van Loo *et al.*, 2001).

El bienestar del animal está amenazado en el aspecto social cuando: a) el espacio es insuficiente para mantener una distancia adecuada para el comportamiento; b) los espacios de alimentación y de descanso para todos los individuos son insuficientes o la alimentación y el descanso no se pueden realizar concurrentemente; c) los reagrupamientos son tan frecuentes que los animales experimentan repetidamente el proceso de estabilización; d) el tamaño de los grupos no es apropiado para las especies. Estos conceptos cuestionan las prácticas intensivas de confinamiento que impiden a los animales ejercer sus actividades sociales y de comportamiento específicas de especie (Ikemoto & Panksepp, 1992).

Además de su espacio mínimo de descanso, los animales necesitan también lo que se denomina espacio secundario, que les permite libertad de movimiento. Se debe evitar alojar animales individualmente, a menos que sea necesario por razones de salud, de agresión o de investigación. Una excepción importante es el momento del parto, cuando las hembras deben tener sus espacios propios. Los animales alojados solos deben tener algún grado de contacto social con otros de su especie, permitiéndoseles establecer contacto visual. El contacto olfativo y auditivo con otros animales es también deseable (Olfert, *et al.*, 1998).

Beaver (1989) sugiere cinco factores en particular que pueden contribuir al enriquecimiento ambiental: el enriquecimiento del comportamiento, la presencia de congéneres sociales, la existencia de dispositivos físicos, las actividades de búsqueda de alimentos y el control del ambiente. Algunos de estos factores se discuten más adelante.

Baumans (2007) y Berdoy (2003), sostienen que los roedores mantienen una vida parcialmente adaptada a la cautividad, pero aún revelan similitudes con sus contrapartes silvestres. Por esta razón, el medio ambiente del animal de laboratorio debería acomodarse a las necesidades comportamentales y fisiológicas innatas.

Por ejemplo, los roedores son muy susceptibles a los predadores y muestran fuertes respuestas de miedo en situaciones no familiares y cuando no pueden hallar refugio. Muestran tendencia a huir, a morder cuando son manipulados o a quedarse totalmente inmóviles. El animal debería poder sentirse seguro en un ambiente amenazante que pudiera controlar (Poole, 1998).

Según Young (2003), para mejorar el bienestar de los animales y enriquecer el ambiente se emplean diferentes métodos que incluyen desde

la mejora en la convivencia social hasta la presencia de elementos estáticos como los juguetes. También se considera como enriquecimiento ambiental el entrenamiento de los animales (Westlund, 2014).

La implementación de un enriquecimiento ambiental específico debe considerar los siguientes principios: 1) mejorar la calidad del cautiverio de manera que el animal tenga una elección mayor de actividades y controles sobre el ambiente social y espacial; 2) aumentar la diversidad comportamental; 3) reducir la frecuencia de comportamientos anormales; 4) incrementar la utilización positiva del ambiente; 5) aumentar la habilidad del animal para que pueda adaptarse a los desafíos (Newberry, 1995; Stauffacher, 1995; Young, 2003).

Según Poole (1998) los animales tienen necesidades fisiológicas y comportamentales. Entre las fisiológicas se incluyen beber, comer, dormir y refugiarse. Entre las comportamentales se incluyen pautas tales como las de comportamiento social, exploración, forrajeo, acicalado, excavación, construcción de nidos, búsqueda de refugio y roedura, fundamentales para el mantenimiento fisiológico normal y psicológico. Estos comportamientos se consideran innatos y se realizan con independencia de sus efectos.

Está reconocido por varios autores, que la interacción social con los congéneres es un factor de bienestar deseable y esencial para los animales de laboratorio. Los ratones alojados juntos deberían ser compañeros de camada; sin embargo, esto no siempre es posible debido a los diseños experimentales y tamaño de las cajas. Lo importante es que el grupo debe ser estable y armonioso (Love 1994; Morton *et al.*, 1993; Stauffacher, 1997a), aunque esto implique disponer de barreras visuales o refugios para ocultarse y evitar las agresiones (Stauffacher 1997b; van de Weerd & Baumans 1995; van Loo *et al.*, 2002). La presencia de un conoespecífico, para un animal social, es el factor de enriquecimiento más estimulante. Mientras que los objetos de enriquecimiento son elementos estáticos y de interés solo para una actividad específica, un compañero social siempre crea nuevas e impredecibles situaciones ante las cuales el animal debe reaccionar. Este tipo de enriquecimiento incrementa los comportamientos de alerta y exploración, los mantiene ocupados y les provee, además, alguna sensación de seguridad (Stauffacher, 2000). Incluso el contacto con humanos (técnicos y cuidadores), en el manejo diario y en el entrenamiento y sociabilización, beneficia al animal y a los resultados de los experimentos debido a que los estimula cognitivamente y permite una interacción más colaborativa con los investigadores (Baumans, 2007; Shepherdson, 1998; van de Weerd & Baumans, 1995).

De lo expuesto, se deduce la importancia de incorporar como enriquecimiento social el alojamiento de a tríos y ambos sexos en los ratones y, como enriquecimientos físicos, uno del tipo

refugio y otro del tipo juguete para que puedan refugiarse y roer un objeto. El término juguete (una antropomorfización) es una generalización para muchos objetos. Elementos como cadenas, trapos, bloques de madera o de goma, tubos plásticos, pelotas, etc. son empleados para este tipo de enriquecimiento. La motivación subyacente es el juego. Algunos son de más valor funcional para ciertos animales que para otros y puede haber diferencias en los miembros de un grupo respecto de esta valoración (Held & Spinka, 2001; Newberry 1995).

El enriquecimiento físico incluye recintos complejos y estímulos sensoriales y nutricionales. La estructuración del ambiente de la caja es más beneficiosa que la provisión de una gran superficie. Salvo para la actividad locomotora, los animales no usan ese espacio, en cambio sí emplean recursos y estructuras internas del área para comportamientos específicos. La mayoría de los roedores dividen su espacio de vivienda en áreas separadas para alimentarse, descansar y excretar. Tales divisiones también permiten a los animales controlar su ambiente, incluso los niveles de iluminación. Estas divisiones pueden ser facilitadas por estructuras internas en la caja: tubos, estantes, cajas y material para nido, plataformas, etc., las que permiten crear áreas de escondite y ocultamiento (Stauffer, 1997a; Townsend, 1997).

El desarrollo de protocolos para normativizar este tipo de intervenciones está mostrando un fuerte impacto sobre los resultados de las investigaciones (Slater & Cao, 2015).

Discusión y conclusiones

Hasta aquí, solo hemos introducido las modificaciones que este enfoque produce en nuestra visión del animal utilizado en investigación. Cuando a partir de esta visión se rediseñan las experiencias, ¿se produce un cambio?, ¿o solo es lo mismo de siempre pero con un lenguaje más filosófico y políticamente correcto?

Estas no son solo preguntas de relevancia teórica. Si diseñar las investigaciones teniendo en cuenta el bienestar animal produce distintos resultados, entonces todos los resultados obtenidos a partir del reactivo biológico pierden generalidad, es decir solo serán válidos para las condiciones de bienestar en que se obtuvieron. Si estas condiciones de bienestar son tales que aplican a cualquier conjunto de variables ambientales, nada cambia, aunque, *a priori*, no se puede presuponer que lo sean.

No importa qué tan probable sea esta discrepancia entre las investigaciones que tuvieron en cuenta el bienestar animal y las que no. El impacto del cambio de punto de vista es sumamente relevante, al menos de dos formas. Por un lado, nos lleva a formular las hipótesis no para el animal-reactivo, uniforme, controlado por las condi-

ciones del ambiente, sino para uno proactivo, con conductas intrínsecamente motivadas con una dinámica histórica y con sintiencia. Por otro lado, deberíamos realizar investigaciones específicas (o agregar objetivos a las no específicas) sobre cómo influye en los resultados este cambio de paradigma.

Por ejemplo, cuando se comparan los comportamientos de cepas de ratones de experimentación endocriados y exocriados, sometidos a un ensayo de campo abierto en el que se pueden evaluar diferentes conductas, y que han sido criados en un ambiente con distintos tipos de enriquecimiento ambiental, versus una crianza estándar (sin enriquecimiento), se observa que la variación de las conductas de una y otra cepa para los distintos comportamientos, es menor en los grupos criados con enriquecimiento que en los que no lo tienen. Esto nos permite sugerir que el enriquecimiento no suma una variable más que pudiera alterar los resultados de un ensayo. Además, las respuestas son diferentes según el tipo de enriquecimiento realizado. En los grupos con enriquecimiento del ambiente se evidencia menor frecuencia de manifestación de algunas conductas, comparado con los grupos control, resultando en una mejor adaptación a la nueva situación (Maschi, 2017).

Los ratones criados con distintos enriquecimientos actúan produciendo pautas de comportamiento diferentes, dependiendo si pertenecen a una cepa endocriada o a una línea exogámica; en algunos, provocan que se manifiesten, con mayor frecuencia, algunas conductas mientras que, en otros, disminuyen (Lang & Vessell, 1976; Maschi, 2017).

Por lo tanto, antes de implementar un programa de enriquecimiento ambiental, deben evaluarse las diferentes posibilidades de modificación del microambiente para cada cepa o stock en particular, dado que, si bien el enriquecimiento genera conductas y beneficia el bienestar de los animales, los comportamientos resultantes son diferentes para cada modelo de ratón.

Surge entonces la necesidad de elaborar indicadores específicos del bienestar para animales usados en investigación, que permitan por un lado identificar y remediar las condiciones de pobre bienestar, y por otro, comunicar con precisión las condiciones de los grupos a partir de los cuales se hacen las investigaciones.

Los animales que se proveen a los investigadores deberán no solo ser acompañados con certificaciones sobre la cepa y condiciones de crianza, sino también sobre el tipo y modalidad de enriquecimiento y los indicadores de bienestar animal al momento de iniciar su utilización.

Se puede aseverar que está cambiando la definición de animal: ya no solo es una anatomía y una fisiología sino también, y tal vez con mayor importancia, un comportamiento y una sintiencia. Esto equivale a decir que, en el futuro, el bienestar

animal no solo debe estar en la nota ética, sino que debe ser definitivamente parte inexcusable de la sección metodológica de los estudios experimentales.

Agradecimientos

A todo el personal del área de producción del Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE). Este trabajo forma parte de la tesis de doctorado de Fabricio A. Maschi (Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 2017) y parcialmente subsidiado con recursos propios del LAE.

Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo entre estos últimos las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Bibliografía

ASAB (Association for the Study of Animal Behaviour). 1986. Guidelines for the use of animals in research. *Animal Behaviour*. 34(1):315-18. doi: 10.1016/0003-3472(86)90056-4

Baumans V, Coke C, Green J, Moreau E, Morton D, Patterson-Kane M, Reinhardt A, Reinhardt V, Van Loo P. 2007. Making -lives easier for animals in research labs. Discussions by the Laboratory Animal Refinement & Enrichment Forum. Washington DC, Animal Welfare Institute (AWI). pp. 105. Disponible en https://www.parsemus.org/wp-content/uploads/2012/11/Making_Lives_Easier1.pdf [Accedido 22/05/2019]

Baumans V. The welfare of laboratory mice. En: Kaliste E. 2007. The welfare of laboratory animals. Dordrecht, Springer, pp. 119-52. Disponible en: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4020-2271-5.pdf> [Accedido 22/05/2019]

Beaver BV. 1989. Environmental enrichment for laboratory animals. *Institute Laboratory Animal Resources (ILAR) News*. 31 (2):5-11. doi: 10.1093/ilar.31.2.5

Berdoy M. 2003. Ratlife. [En línea]. Disponible en: <http://www.ratlife.org> [Accedido 29/09/2018]

Brambell Rogers FW. 1965. Report of the technical committee to inquire into the welfare of animal slept under intensive livestock husbandry systems. London, Her Majesty's Stationery Office.

Broom D. 1986. Indicators of poor welfare. *British Veterinary Journal*. 142(6):524-26. doi: 10.1016/0007-1935(86)90109-0

Broom D. 2016. Sustentabilidad y sintiencia en relación con el bienestar animal. Conferencia con motivo de recibir el Doctorado Honoris causa, Universidad de Buenos Aires (UBA). *Revista InfoVet*. Número especial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

Carlson BA. 2017. Early life experiences have complex and long-lasting effects on behavior. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*. 114(44): 11571-3. doi: 10.1073/pnas.1716037114

Cardoso CVP, Almeida AECC. 2014. Laboratory animal: biological reagent or living being? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 47(1):19-23. doi: 10.1590/1414-431X20133365

Chamove AS. 1989. Environmental enrichment: A review. *Animal Technology*, 40(3):155-78. Reproduced with permission of the Institute of Animal Technology in Animal Welfare Institute. Disponible en: <https://awionline.org/content/environmental-enrichment-review> [Accedido 22/05/2019]

Chandrasekera Ch. 2016. From sentience to science: Limits of anthropocentric cognition. *Animal Sentience*. 5(2). Disponible en: <https://animalstudiesrepository.org/animsent/vol1/iss5/2/> [Accedido 22/05/2019]

CONADEA (Comisión nacional de experimentación animal). 2016. Ley de protección para los animales de experimentación utilizados con fines científicos y educativos (Proyecto 6758-D-2016) [En línea] Disponible en: <https://www.diputados.gov.ar/proyectos/proyecto.jsp?exp=6758-D-2016> [Accedido 12/11/2018].

Dawkins MS. 1990. From an animal's point of view: motivation, fitness and animal welfare. *Behavioral and Brain Sciences*. 13(1):1-9. doi: 10.1017/S0140525X00077104

De Grazia D. 1996. Taking animals seriously: Mental life and moral status. New York, Cambridge University Press. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10822/751779> [Accedido 12/11/2018].

De Mello M. 2012. Animals and society: an introduction to human-animal studies. New York, Colombia University Press.

De Waal FBM. 1999. Anthropomorphism and anthropodenial: consistency in our thinking about humans and other animals. *Philosophical Topics*. 27 (1):255-80.

- Duncan IJH. 1998. Behaviour and behaviour needs. *Poultry Science*. 77(12):1766-72. doi: [10.1093/ps/77.12.1766](https://doi.org/10.1093/ps/77.12.1766)
- Fraser D. 2004. Applying science to animal welfare standards. Global conference on animal welfare: an OIE initiative. Paris, pp. 121-32.
- Hau J, Shapiro SJ. The welfare of non human primates. En: Kaliste E. 2007. The welfare of laboratory animals. Dordrecht, Springer, pp. 291-314. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4020-2271-5_13 [Accedido 12/11/2018].
- Hawkins P. 2002. Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK, with recommendations. *Laboratory Animals*. 36(4): 378-95. doi: [10.1258/002367702320389044](https://doi.org/10.1258/002367702320389044)
- Hawkins P, Morton DB, Burman O, Dennison N, Honess P, Jennings M, Lane S, Middleton V, Roughan JV, Wells S, Westwood K. 2011. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: 11th report of the BVA/AFW/FRAME/RSPCA/UFWA Joint Working Group on Refinement Laboratory Animals. 45(1):1-13. doi: [10.1258/la.2010.010031](https://doi.org/10.1258/la.2010.010031)
- Held SDE, Spinka M. 2011. Animal play and animal welfare. *Animal Behaviour*. 81(5):891-9. doi: [10.1016/j.anbehav.2011.01.007](https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.01.007)
- Hughes BO. 1976. Behaviour as an indicator of welfare. Proceeding of the fifth european poultry conference. Malta, pp. 1005-18.
- Ikemoto S, Panksepp J. 1992. The effects of early social isolation on the motivation for social play in juvenile rats. *Developmental Psychobiology*. 25(4): 261-74. doi: [10.1002/dev.420250404](https://doi.org/10.1002/dev.420250404)
- ISAE (International Society for Applied Ethology). 2017. Guidelines for ethical treatment of animals in applied animal behaviour and welfare research. [En línea] Disponible en: https://www.applied-ethology.org/Ethical_Guidelines.html [Accedido 24/10/2018]
- Kohn DF, Martin ME, Foley PL, Morris TH, Swindle MM, Voglet GA, Wicson SK. 2007. Guidelines for the assessment and management of pain in rodents and rabbits. *Journal of the American Association for Laboratory Animals Science* 46-(2):97-108.
- Lang CM, Vessell ES. 1976. Environmental and genetics factors affecting laboratory animals: impact on biomedical research. Introduction. *Federal Proceedings*. 35(5):1123- 4.
- Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, La Croix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RG, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS. 2010. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods* 7 (6):447-9. doi: [10.1038/nmeth.1455](https://doi.org/10.1038/nmeth.1455)
- Love JA. 1994. Group housing: Meeting the physical and social needs of the laboratory rabbit. *Laboratory Animal Science*. 44(1):5-11.
- Maschi F. 2017. El efecto del enriquecimiento ambiental sobre la variabilidad de parámetros fisiológicos y conductuales en ratones de laboratorio. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/63094> [Accedido 22/05/2019].
- Mason, P. 1997. The brown dog affair: the story of a monument that divided the nation. Londres, Two Sevens Publishing. Mellor DJ, Reid CSW. Concepts of animal well-being and predicting the impact of procedures on experimental animals. En: Baker RM, Jenkin G, Mellor DJ. 1994. Proceedings of the improving the well-being of animals in the research environment. Glen Osmond, Australia, Australian & New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching (ANZCCART), pp.3-18.
- Mellor DJ. 2016. Updating animal welfare thinking: moving beyond the “five freedoms” towards “a life worth living”. *Animals* 6(3):21. doi: [10.3390/ani6030021](https://doi.org/10.3390/ani6030021)
- Mendl M, Paul ES. 2008. Do animals live in the present?: Current evidence and implications for welfare. *Applied Animal Behaviour Science*. 113(4): 357-82. doi: [10.1016/j.applanim.2008.01.013](https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.01.013)
- Mendl M, Burman OHP, Parker RMA, Paul ES. 2009. Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: emerging evidence and underlying mechanisms. *Applied Animal Behaviour Science*. 118(3-4):161-81. doi: [10.1016/j.applanim.2009.02.023](https://doi.org/10.1016/j.applanim.2009.02.023)
- Mendl M, Burman OHP, Paul ES. 2010. An integrative and functional frame work for the study of animal emotion and mood. Proceeding of the Royal Society B. doi: [10.1098/rspb.2010.0303](https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0303)
- Morton DB. 1990. Adverse effects in animals and their relevance to refining scientific procedures. *Alternatives to Laboratory Animals (ATLA)*. 18:29-39.
- Morton DB, Jennings M, Batchelor GR, Bell D, Birke L, Davies K, Eveleigh JR, Gunn D, Heath M,

- Howard B, Koder P, Phillips J, Poole T, Sainsbury AW, Sales GD, Smith DJA, Stauffacher M, Turner RJ. 1993. Refinements in rabbit husbandry. Second report of the BVA/AFW/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory Animals*. 27 (4):301-29
- Nevison CM, Hurst JL, Barnard CJ. 1999. Why do male ICR(CD-1) mice perform bar-related (stereotypic) behaviour?. *Behavioural Processes*. 47(2):95-111.
[doi: 10.1016/S0376-6357\(99\)00053-4](https://doi.org/10.1016/S0376-6357(99)00053-4)
- Newberry RC. 1995. Environmental enrichment: increasing the biological relevance of captive environments. *Applied Animal Behaviour Science*. 44(2-4):229-43.
[doi: 10.1016/0168-1591\(95\)00616-Z](https://doi.org/10.1016/0168-1591(95)00616-Z)
- Olfert ED, Cross BM, Mc William AA. 1998. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación (Estol L, Dugas R, Traducción en español), Ontario, Canadian Council on Animal Care (CCAC). Disponible en:
<http://www.fcv.unl.edu.ar/comite/ManualsobreelcuidadoyusodeanimalesdeexperimentacionConsejo%20Canadiense.pdf>
[Accedido 22/05/2019].
- OMS (Organización Mundial de la Salud). [En línea]. Disponible en: <http://www.who.int>
[Accedido 29/9/2018].
- Paul ES, Harding EJ, Mendl M. 2005. Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 29(3):469-91.
[doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.01.002](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.01.002)
- Poole T. 1998. Meeting a mammal's psychological needs: basic principles. En: *Second nature: environmental enrichment for captive animals*. Eds. Sheperdson D, Mellen J, Hutchins M. Washington, Smithsonian Institution Press. pp. 83-96.
- Proctor H. 2012. Animal sentience: where are we and where are we heading? *Animals*. 2(4):628-39.
[doi: 10.3390/ani2040628](https://doi.org/10.3390/ani2040628)
- Segerdahl P. 2007. Can natural behavior be cultivated? The farm as local human/animal culture. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*. 20(2):167-93.
- Shepherdson DJ. Tracing the path of environmental enrichment in zoos. En: Shepherdson DJ, Mellen JD, Hutchins M. 1998. *Second nature: environmental enrichment for captive animals*. Washington DC, Smithsonian Institution Press, pp. 1-12.
- Singer, P. 2015. *Animal liberation: The definitive classic of the animal movement*. New York, Open Road Media.
- Slater AM, Cao L, 2015. A protocol for housing mice in an enriched environment. *Journal of Visualized Experiments*. 100:e52874.
[doi: 10.3791/52874](https://doi.org/10.3791/52874)
- Sorensen D. *Animal welfare: an introduction*. En: Kaliste E. 2007. *The welfare of laboratory animals*. Dordrecht, Kluwer Academic Publisher, pp. 3-14.
- Stauffacher M. 1995. Environmental enrichment, fact and fiction. En: *Environmental enrichment information resources for laboratory animals*. Animal Welfare Information Center (AWIC) Resource Series. 2:145-9.
- Stauffacher M. Housing requirements: What ethology can tell us. En: van Zutphen LFM, Balls M, eds. *Animal alternatives, welfare and ethics*. 1997a. Amsterdam, Elsevier Science BV. pp. 179-86.
- Stauffacher M. Comparative studies on housing conditions. En: O'Donoghue PN, ed. 1997b *Harmonization of laboratory animal husbandry*. London, Royal Society of Medicine Press, pp. 5-9.
- Stauffacher M. Refinement in rabbit housing and husbandry. En: Balls M, van Zeller AM, Halder M, eds. 2000. *Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation, developments in animal and veterinary sciences*. Amsterdam, Elsevier Science BV. pp. 1269-77.
- Townsend P. 1997. Use of in-cage shelters by laboratory rats. *Animal Welfare*. 6(2):95-103.
- Turner J. 1999. *Factory farming and the environment: a report for compassion in world farming trust*. Petersfield, Hampshire, Compassion in World Farming Trust.
- van de Weerd HA, Baumans V. Environmental enrichment in rodents. En: *Environmental enrichment resources for laboratory animals*. 1995. Animal Welfare Information Center (AWIC) Resource Series. 6(2):95-103.
- van Loo PLP, Kruitwagen CLJJ, Koolhaas JM, van de Weerd HA, van Zutphen LFM, Baumans V. 2002. Influence of cage enrichment on aggressive behaviour and physiological parameters in male mice. *Applied Animal Behaviour Science*. 76(1):65-81. [doi: 10.1016/S0168-1591\(01\)00200-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(01)00200-3)
- van Loo PLP, Mol JA, Koolhaas JM, van Zutphenbf, Baumans V. 2001. Modulation of aggression in male mice: influence of group size and cage size. *Physiology and Behaviour*. 72(5):675-83.

Westlund K. 2014. Training is enrichment and beyond. *Applied Animal Behaviour Science*. 152:1-6. doi: [10.1016/j.applanim.2013.12.009](https://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.12.009)

World Veterinary Association. 1989. World Veterinary Association policy statement on animal welfare, well-being, and ethology. *Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) Journal*. 31(4): 29-30. doi: [10.1093/ilar.31.4.29](https://doi.org/10.1093/ilar.31.4.29)

Young RJ. Environmental enrichment for captive animals. 2003. Universities Federation for Animal Welfare (UFAW). Ames, Iowa, Blackwell Publishing Professional.

Descripción de un caso de mieloencefalitis equina por protozoos (EPM) en Argentina

Case report of equine protozoal myeloencephalitis (EPM) in Argentina

MORÉ GASTÓN ^{1,2,*}, MONINA MARTA³, GIROTTI GABRIELA³, IDIART JULIO⁴, VENTURINI LUCILA³, VENTURINI MARÍA CECILIA¹

1. Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Calles 60 y 118, La Plata, Argentina.
2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), CCT - La Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina.
3. Profesional independiente, provincia de Buenos Aires, Argentina.
4. Profesor emérito, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Calles 60 y 118, La Plata, Argentina.

* Correo electrónico de la autora de contacto: gastonmore@fcv.unlp.edu.ar

Resumen

La mieloencefalitis equina por protozoos (EPM) es causada por *Sarcocystis neurona* y genera importantes pérdidas económicas. En Argentina, se han detectado anticuerpos contra este protozoo, pero no se han reportado casos clínicos. Una yegua de 12 años, de la provincia de Buenos Aires presentó marcha asincrónica y arpeo bilateral. El animal fue tratado con fenitoína, vitamina B1, AINEs y tenectomía. El cuadro clínico fue progresivo con depresión, parálisis facial, atrofia de los músculos del dorso, lomo y miembros pelvianos, dismetría e inestabilidad de la marcha, temblores generalizados y tetraparesia, por lo que se decidió la eutanasia. Se observaron lesiones microscópicas en el tálamo, el metencéfalo y la médula espinal, y consistieron en pequeños focos múltiples hemorrágicos y focos de inflamación crónica. La inmunohistoquímica realizada en muestras de cerebro y médula espinal reveló la presencia de merontes y merozoitos de *S. neurona*. Mediante PCR-RFLP se observó un patrón de restricción específico de *S. neurona* en muestras de cerebro. La detección de anticuerpos contra *S. neurona* en caballos, la abundancia de comadreas y la confirmación específica en este caso, sugieren que la enfermedad puede estar extendida en nuestro medio. Esta es la primera descripción de un caso de EPM en Argentina, confirmado mediante estudios histopatológicos, inmunohistoquímicos y moleculares.

Palabras clave

Sarcocystis neurona, EPM, diagnosis, Argentina

Abstract

Equine protozoal myeloencephalitis (EPM) is mainly caused by *Sarcocystis neurona* and generates significant economic losses. In Argentina, antibodies to this protozoan have been detected but no clinical cases have been reported. A 12-year-old mare, from Buenos Aires Province, presented asynchronous walking and bilateral stringhalt. The animal was treated with phenytoin, vitamin B1, non-steroid antiinflammatory drugs and subsequent tenectomy. Clinical outcome progressed to depression, facial paralysis, atrophy of the muscles of the back, loin and pelvic limbs, dysmetria and gait instability, generalized tremors and tetraparesis. Euthanasia was decided based on clinical progression and lack of response to treatment. Microscopic lesions were observed in thalamus, metencephalon and spinal cord, and consisted in small hemorrhagic multiple foci and small foci of chronic inflammation. Immunohistochemical analysis revealed the presence of intracellular *S. neurona* meronts and free merozoites in brain and spinal cord samples. The PCR-RFLP analysis showed a specific *S. neurona* restriction pattern in brain samples. Previous detection of antibodies to *S. neurona* in horses, the abundance of opossums in the region and the specific confirmation in this case, suggest that the disease may be widespread in Argentina. This is the first EPM case report in Argentina, confirmed by histopathologic, immunohistochemical and molecular studies.

Key words

Sarcocystis neurona, EPM, diagnosis, Argentina

Fecha de recepción: 27/02/2019

Fecha de revisión: 04/06/2019

Fecha de aprobación: 05/06/2019

ANALECTA VET 2019; Enero-Junio; 39(1):32-36

Impresa ISSN 03655 14-8 Electrónica ISSN 1514-2590

doi.org/10.24215/15142590e035

Introducción

La mieloencefalitis equina por protozoos (sigla en inglés EPM = *equine protozoal myeloencephalitis*) es una enfermedad causada, principalmente, por *Sarcocystis neurona*, que genera pérdidas económicas significativas en la producción equina (Dubey et al., 2001). Los protozoarios apicompleja del género *Sarcocystis* se caracterizan por presentar ciclos indirectos del tipo predador-presa, con formación de quistes musculares en los hospedadores intermediarios y multiplicación sexual y producción de esporocistos infectantes en el intestino de los hospedadores definitivos (Dubey et al., 2001). La distribución de EPM causada por *S. neurona* está restringida al continente americano, siguiendo la distribución de los huéspedes definitivos, las comadreas *Didelphis albiventris* y *Didelphis virginiana* (Dubey et al., 2000; Fenger et al., 1995). *Neospora caninum* y *Neospora hughesi* son otros protozoarios formadores de quistes tisulares, reportados ocasionalmente como agentes causantes de EPM (Dubey et al., 2001; Hamir et al., 1998).

La EPM se caracteriza por presentar signos neurológicos relacionados con lesiones multifocales del sistema nervioso central, siendo la atrofia muscular y las dificultades en la marcha los signos más relevantes. Los métodos serológicos (principalmente inmunoblot y ELISA) son los recomendados para el diagnóstico *in vivo*, mientras que la histopatología, la inmunohistoquímica (IHQ) y la reacción en cadena de la polimerasa seguida de análisis de fragmentos de restricción (PCR-RFLP) son algunos de los métodos recomendados para el diagnóstico *post mortem* (Dubey et al., 2001; Tanhauser et al., 1999; Yeargan & Howe 2011). En Argentina, se detectaron anticuerpos contra *S. neurona* en el 26 % de 640 equinos muestreados, observándose una seroprevalencia mayor en equinos con signos neurológicos que en animales asintomáticos (39,2 % *versus* 22,1 %); sin embargo, no se han descrito y confirmado casos clínicos mediante estudios *post mortem* (Moré et al., 2014). En estudios realizados sobre muestras de equinos asintomáticos, no se han detectado anticuerpos contra especies de *Neospora* o se detectaron en niveles bajos (Dubey et al., 1999; Rojas et al., 2016).

La comadreja overa (*D. albiventris*) tiene una amplia distribución en la mayoría de las zonas rurales y áreas suburbanas de nuestro país. Sin embargo, los intentos de aislar *S. neurona* de materia fecal o intestino de comadreas de Argentina dieron como resultado la identificación de otras especies de *Sarcocystis* (Dubey et al., 2000; Dubey et al., 1999).

El objetivo de esta comunicación fue describir un caso de EPM causado por *S. neurona* en un equino argentino, confirmado mediante métodos histopatológicos, inmunohistoquímicos y moleculares.

Presentación del caso

Una yegua de 12 años, cruce, nacida y criada en un haras del partido de Cañuelas, provincia de Buenos Aires, Argentina, presentó marcha asincrónica progresiva, por lo que los médicos veterinarios del establecimiento instauraron un tratamiento sintomático con fenilbutazona (0,1 mg/Kg) y 3 g/día de vitamina B1, durante 15 días, sin resultados positivos. Posteriormente, la yegua mostró arpeo bilateral, dismetría e inestabilidad en la marcha, por lo que se decidió administrar la droga anticonvulsiva fenitoína (15 g/día) durante 75 días. También se efectuó la tenectomía del músculo extensor digital lateral de los miembros pelvianos, como tratamiento paliativo ante la sospecha de una intoxicación por ingestión de achicoria amarilla o diente de león (*Hypochoeris radicata*) (Torre, 2005), lo que produjo una mejoría leve en la marcha. A pesar del tratamiento, el cuadro clínico fue progresivo con depresión, respuesta deficiente a los estímulos, parálisis facial (ptosis auricular, palpebral, nasal y labial) y atrofia del músculo masetero. Además, presentó atrofia grave de los músculos del dorso, lomo y miembros pelvianos, temblores generalizados, arrastre severo de los cascos y tetraparesia. Se formuló un diagnóstico clínico de mieloencefalitis multifocal. Debido a la severidad e irreversibilidad del cuadro clínico y a la falta de respuesta a los tratamientos, se decidió la eutanasia (sedación: acepromacina 0,05 mg/kpv y xilacina 1,1 mg/kpv; anestesia: ketamina 3,5 mg/kpv y por último 100 ml de clorhidrato de procaína al 60 % endovenoso rápido), cinco meses después del inicio de los signos clínicos.

En la necropsia no se observaron lesiones en el sistema nervioso central ni en otros órganos. Se recolectaron muestras representativas de cerebro y médula espinal y se fijaron en formol tamponado al 10 % para estudios histopatológicos y se congelaron a -20 °C para estudios moleculares.

Las muestras para histopatología se procesaron mediante técnicas de rutina y las secciones de tejido se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las lesiones, en el tálamo y el metencéfalo, consistieron en múltiples y pequeños focos hemorrágicos y pequeños focos de inflamación crónica conformados, principalmente, por histiocitos y ocasionales células multinucleadas y células espumosas (*gitter cells*). En la médula espinal se observaron necrosis neuronal, satelitosis, infiltrados mononucleares perivasculares, tumefacción endotelial y áreas dispersas de degeneración axonal.

La reacción de inmunohistoquímica se llevó a cabo con una técnica comercial basada en la unión de estreptavidina y biotina (LSAB, Dako Cytomation, Carpintería, USA) utilizando un suero policlonal anti-*S. neurona* producido en conejo como anticuerpo primario, proporcionado, gentilmente, por el Dr. J. P. Dubey (*Animal Parasitic Disease Laboratory, U.S. Department of*

Agriculture, Beltsville, USA). Mediante este estudio se reveló la presencia de merontes intracelulares de *S. neurona* y merozoitos libres en muestras de cerebro y médula espinal (Fig. 1).

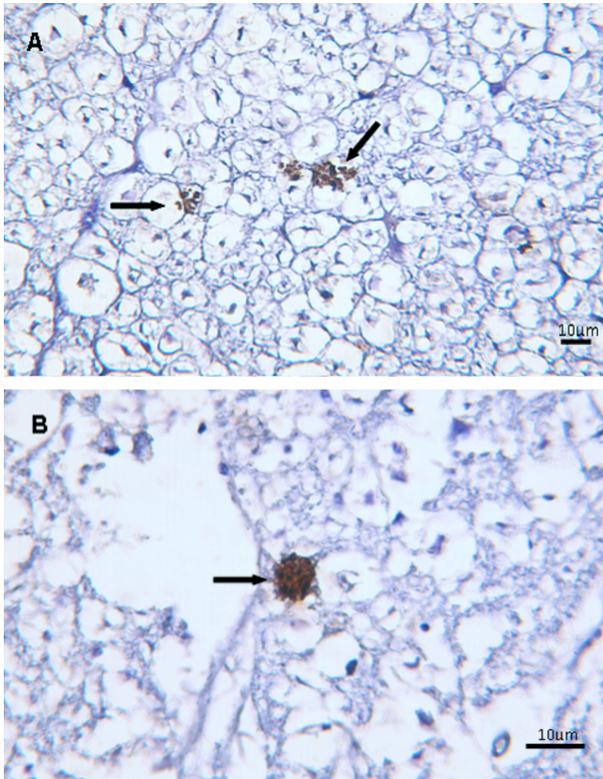


Figura 1. Fotomicrografías que muestran el resultado positivo de la inmunohistoquímica (LSAB, Dako Cytomation) para *S. neurona* en muestras de médula espinal (A) y cerebro (B). Se marcan específicamente (color pardo) merozoitos y merontes de *S. neurona* (flechas).

El ADN se extrajo a partir de 50 mg de cada tejido congelado utilizando un kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega), procediendo de acuerdo con las instrucciones del fabricante e incubando la digestión con proteinasa K a 55 °C durante toda la noche. Se amplificó el ADN mediante dos técnicas de PCR y se procedió al corte del amplificado con enzimas de restricción acorde protocolos descriptos previamente (Tanhauser *et al.*, 1999). Se observó un patrón de restricción específico de *S. neurona* en muestras de cerebro mediante PCR-RFLP utilizando los *primers* JNB33-JNB54 digeridos con *HinfI* y *DraI* (37 °C, 1 h), y los *primers* JNB25-JD396 digeridos con *HinfI* y *HindIII* (37 °C, 1 h 30 min) (Fig. 2). El ADN del control positivo fue proporcionado gentilmente por el Dr. D. Howe (Department of Veterinary Science, Gluck Equine Research Center, University of Kentucky, USA).

Sobre la base de todos los resultados antes expuestos, se formuló un diagnóstico de mieloencefalitis producida por *Sarcocystis neurona*.

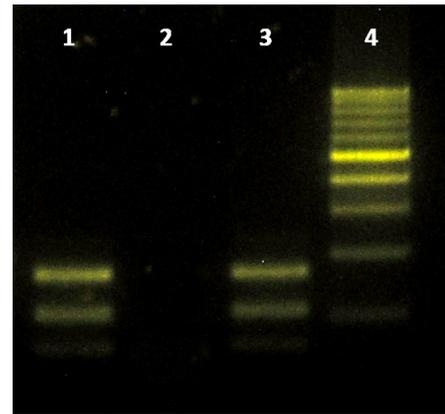


Figura 2. Patrón de restricción del fragmento amplificado mediante los *primers* JNB25-JD396 mediante la enzima *HinfI*. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, tinción con SYBRsafe y observación en transiluminador de luz azul (Invitrogen, USA). Referencias: 1= SNC del equino; 2= control negativo; 3= ADN *S. neurona* (control positivo); 4= Marcador de peso molecular, Cienmarker (Biodinamias, Argentina).

Discusión y conclusiones

La presente comunicación describe un caso clínico con una progresión de los signos y con lesiones similares a las informadas previamente en otros casos de EPM (Dubey *et al.*, 2001). Además, se confirmó la presencia de *S. neurona* en el tejido nervioso afectado mediante métodos inmunohistoquímicos y moleculares. Los tratamientos aplicados por los veterinarios actuantes en este caso fueron los usuales en el manejo general de los trastornos neurológicos, pero no mostraron ningún efecto sobre la infección por *S. neurona*. Mackay (2006) informó que el tratamiento específico con sulfadiazina-pirimetamina o ponazuril podría producir una mejoría en el 60 % de los casos. Por lo tanto, la aplicación de estos medicamentos podría tenerse en cuenta para tratar las etapas tempranas de trastornos neurológicos en casos similares. Estos medicamentos también podrían ayudar en la orientación del diagnóstico de EPM basado en la respuesta al tratamiento (Dubey *et al.*, 2001).

La falta de lesiones macroscópicas en el presente caso podría deberse a una etapa crónica de EPM, lo que estaría de acuerdo con el curso clínico y confirmado por el estudio histopatológico. La mayoría de los casos de EPM reportados se corresponden con enfermedad aguda, mostrando hemorragia severa y lesiones principalmente en la médula espinal y en las meninges (Boy *et al.*, 1990; Dubey *et al.*, 2001). En el presente estudio, las lesiones microscópicas consistieron en pequeños y múltiples focos de hemorragias e inflamación crónica en el tálamo, la metencéfalo y la médula espinal. Además, la presencia de *S. neurona* en estos tejidos se identificó mediante inmunohistoquímica y PCR-RFLP, lo que se indica

para confirmar la etiología de EPM (Boy *et al.*, 1990; Dubey *et al.*, 2001; Hamir *et al.*, 1993). Lamentablemente, no se conservaron muestras de suero de este animal para realizar estudios serológicos que complementaran el diagnóstico.

Diferentes cepas o aislamientos de *S. neurona* evidencian diferentes antígenos de superficie que podrían ser causas de diferencias en el desarrollo de los casos clínicos, como así también influir en el diagnóstico serológico y molecular (Howe *et al.*, 2008). Teniendo esto en cuenta, se llevará a cabo una caracterización molecular adicional de *S. neurona* en las muestras de este caso, así como de otras que contengan ADN de *S. neurona*, para identificar las variantes genóticas circulantes y ampliar la comprensión de aspectos epidemiológicos de la EPM en Argentina.

La detección previa de anticuerpos contra *S. neurona* en caballos, la abundancia de comadrejas (*Didelphis albiventris*) en el medio y la confirmación específica en este caso, sugieren que la enfermedad puede estar muy extendida en Argentina. Esta es la primera descripción de un caso de EPM en Argentina, confirmado mediante estudios histopatológicos, inmunohistoquímicos y moleculares. La confirmación del diagnóstico de esta enfermedad en nuestro medio sirve de alerta a los veterinarios para que incluyan a la EPM entre los diagnósticos diferenciales ante trastornos neurológicos en equinos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. J. P. Dubey y al Dr. D. Howe por proporcionar el anticuerpo primario anti *S. neurona* y el ADN control de *S. neurona*, respectivamente.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo entre estos últimos las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

Bibliografía

Boy MG, Galligan DT, Divers TJ. 1990. Protozoal encephalomyelitis in horses: 82 cases (1972-1986). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 196:632-4.

Dubey JP, Lindsay DS, Saville WJ, Reed SM, Granstrom DE, Speer CA. 2001. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Veterinary Parasitology*. 95:89-131.
doi: [10.1016/S0304-4017\(00\)00384-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00384-8)

Dubey JP, Speer CA, Bowman DD, Horton KM, Venturini MC, Venturini L. 2000. Experimental transmission of *Sarcocystis speeri* Dubey and Lindsay, 1999 from the South American opossum (*Didelphis albiventris*) to the North American opossum (*Didelphis virginiana*). *Journal of Parasitology*. 86:624-7. doi: [10.1645/OO22-3395\(2000\)086\[0624:ETOSSD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/OO22-3395(2000)086[0624:ETOSSD]2.0.CO;2)

Dubey JP, Venturini L, Venturini C, Basso W, Unzaga J. 1999. Isolation of *Sarcocystis falcatula* from the South American opossum (*Didelphis albiventris*) from Argentina. *Veterinary Parasitology*. 86:239-44.
doi: [10.1016/S0304-4017\(99\)00145-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00145-4)

Dubey JP, Venturini MC, Venturini L, McKinney J, Pecoraro M. 1999. Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. *Veterinary Parasitology*. 86:59-62.
doi: [10.1016/S0304-4017\(99\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00127-2)

Fenger CK, Granstrom DE, Langemeier JL, Stamper S, Donahue JM, Patterson JS, Gajadhar AA, Marteniuk JV, Xiaomin Z, Dubey JP. 1995. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *Sarcocystis neurona*. *Journal of Parasitology*. 81:916-9.
doi: [10.2307/3284040](https://doi.org/10.2307/3284040)

Hamir AN, Moser G, Galligan DT, Davis SW, Granstrom DE, Dubey JP. 1993. Immunohistochemical study to demonstrate *Sarcocystis neurona* in equine protozoal myeloencephalitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 5:418-22.
doi: [10.1177/104063879300500320](https://doi.org/10.1177/104063879300500320)

Hamir AN, Tornquist SJ, Gerros TC, Topper MJ, Dubey JP. 1998. *Neospora caninum*-associated equine protozoal myeloencephalitis. *Veterinary Parasitology*. 79:269-74.
doi: [10.1016/S0304-4017\(98\)00178-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00178-2)

Howe DK, Gaji RY, Marsh AE, Patil BA, Saville WJ, Lindsay DS, Dubey JP, Granstrom DE. 2008. Strains of *Sarcocystis neurona* exhibit differences in their surface antigens, including the absence of the major surface antigen SnSAG1. *International Journal for Parasitology*. 38:623-31.
doi: [10.1016/j.ijpara.2007.09.007](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.007)

Mackay R. 2006. Equine protozoal myeloencephalitis: treatment, prognosis, and prevention. *clinical techniques in equine practice*. 5:9-16.
doi: [10.1053/j.ctep.2006.01.003](https://doi.org/10.1053/j.ctep.2006.01.003)

Moré G, Vissani A, Pardini L, Monina M, Muriel M, Howe D, Barrandeguy M, Venturini MC. 2014. Seroprevalence of *Sarcocystis neurona* and its association with neurological disorders in Argentinean horses. *Journal of Equine Veterinary*

Science. 34:1051-4.

doi: [10.1016/j.jevs.2014.06.002](https://doi.org/10.1016/j.jevs.2014.06.002)

Rojas MC, Moré G, Campero LM, Fort M, Giménez H, Venturini MC. 2016. Detection of *Neospora* spp. antibodies in horses from La Pampa, Argentina. 10th International Equine Infectious Diseases Conference (IEIDC X). Buenos Aires, Argentina. Journal of Equine Veterinary Science 39: S50. doi: [10.1016/j.jevs.2016.02.110](https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.02.110)

Tanhauser SM, Yowell CA, Cutler TJ, Greiner EC, Mackay RJ, Dame JB. 1999. Multiple DNA markers differentiate *Sarcocystis neurona* and

Sarcocystis falcatula. The Journal of Parasitology. 85:221-8. doi: [10.2307/3285623](https://doi.org/10.2307/3285623)

Torre F. 2005. Clinical diagnosis and results of surgical treatment of 13 cases of acquired bilateral stringhalt (1991–2003). Equine Veterinary Journal. 37:181-3. doi: [10.2746/0425164054223877](https://doi.org/10.2746/0425164054223877)

Yeargan MR, Howe DK. 2011. Improved detection of equine antibodies against *Sarcocystis neurona* using polyvalent ELISAs based on the parasite SnSAG surface antigens. Veterinary Parasitology. 176:16-22. doi: [10.1016/j.vetpar.2010.10.034](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.034)

INFORMACION PARA AUTORES/AS

Política editorial y generalidades

Las opiniones expresadas en los artículos publicados en ANALECTA VETERINARIA no reflejan, necesariamente, las opiniones de este medio. ANALECTA VETERINARIA autoriza la reproducción de sus artículos con fines académicos, con la única condición de la mención de la fuente, cuando corresponda. El uso de nombres comerciales destinados a la identificación de productos, en el contexto de los artículos presentados, no implica respaldo directo o indirecto ni promoción de dichos productos por parte de la revista.

Los autores/as ceden a ANALECTA VETERINARIA los derechos de autoría de manera no exclusiva, se hacen responsables de los datos y el contenido, dejan constancia de haber participado activamente en el proceso de la investigación y/o la elaboración del trabajo, declaran la existencia, o no, de conflicto de intereses, mencionan los soportes financieros y explicitan la aprobación por los comités institucionales y autoridades regulatorias que correspondan a cada caso. Es su responsabilidad exclusiva contar con autorización para citar datos no publicados. No se asume responsabilidad editorial por la exactitud de las referencias. Eventualmente, el Consejo Editorial podrá requerir información probatoria.

Idiomas

ANALECTA VETERINARIA acepta artículos en idioma español o en inglés. Los títulos, resúmenes y palabras clave de los artículos se publicarán en ambos idiomas.

Originalidad

La información contenida en el trabajo debe ser original (no publicada). No podrá estar en proceso de evaluación en más de una revista u otro medio de comunicación. El plagio (igual o muy similar información publicada con otra autoría en otro medio) y la publicación duplicada (información ya publicada por cualquier remitente) se consideran faltas éticas graves, que invalidan su publicación en ANALECTA VETERINARIA.

Normas de ética

Con respecto a la definición de la autoría, las responsabilidades de los editores y las causas que obran como posible conflicto de intereses, ANALECTA VETERINARIA adhiere a las recomendaciones del International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org>).

En relación con otros aspectos, como el formato y el estilo de preparación del original, ANALECTA VETERINARIA establece un conjunto de normas que se detallan en “Instrucciones para la preparación del trabajo”. Todas las dudas que se susciten podrán ser consultadas por correo electrónico a: analecta@fcv.unlp.edu.ar

El Consejo Editorial de ANALECTA VETERINARIA tiene en consideración el tratamiento ético de los animales de experimentación y se reserva el derecho de no publicar trabajos que no cumplan esta premisa. El envío de cada artículo incluirá la certificación de aprobación, por parte del comité de ética de su unidad académica, de los procedimientos realizados para ese trabajo. De no ser posible, se consignará según qué normas éticas nacionales o internacionales se realizaron sus trabajos.

Tipos de trabajos para publicación

Se aceptan envíos de: trabajos de investigación, trabajos de investigación en educación, comunicaciones cortas, descripciones de casos, informes técnicos, artículos de revisión y (solamente por parte de organizadores) resúmenes de presentaciones en reuniones científicas (ver 1.3). El Consejo Editorial decidirá la prioridad de publicación de cada trabajo y la proporción de cada tipo, privilegiando aquellos de investigación.

Instrucciones para la preparación del trabajo

Características generales

El idioma del trabajo puede ser el español o el inglés. Se prefiere que los trabajos escritos en inglés sigan la gramática propia del inglés británico. Se aceptan otras variantes del idioma inglés, siempre que se respeten de manera uniforme en todo el trabajo.

Las unidades de medida se expresarán según el Sistema Internacional de Medidas (<http://www.cem.es/sites/default/files/siu8edes.pdf>). Las abreviaturas deberán ser aclaradas la primera vez que el término o expresión se mencione, pero no será necesaria su utilización si este se menciona menos de cinco veces. Si el trabajo requiere el uso de numerosas abreviaturas (más de diez) deberá generarse una lista, que se incluirá luego de los resúmenes. Ciertas siglas, acrónimos y abreviaturas (ATP, ADN, ELISA, OMS, PBS, Dr., n°, entre otras) no requieren aclaración.

Para la denominación de sustancias, agentes biológicos de enfermedad, términos anatómicos,

etc., se seguirán las recomendaciones de las nóminas y consensos vigentes para la especialidad correspondiente. Los productos comerciales deberán ser identificados mediante el símbolo de marca registrada (®) consignando, además, los nombres genéricos de los componentes principales. Si la mención se efectúa en el apartado “Materiales y métodos”, deberán consignarse, además, el nombre y la dirección del fabricante (ciudad, país). Los nombres científicos de categoría genérica o inferior se escribirán en cursivas.

Original para publicación (generalidades)

El original para publicación comprende un documento principal y otros archivos:

1- **Documento principal:** se trata de un archivo que contiene la página de presentación, las secciones del trabajo (que varían según su tipo), los agradecimientos, la declaración de conflicto de intereses, las bibliografía y las leyendas para las figuras. Este documento podrá tener algunos de los siguientes formatos: **doc**, **docx** o **rtf**.

2- **Otros archivos:** tablas, figuras, material complementario.

1- Documento principal

1.1. Formato general del documento (común a todo tipo de trabajos)

El documento se configurará en formato de hoja A4, con márgenes de 3 cm como mínimo por lado y 1,5 de interlineado. El texto deberá alinearse en los márgenes izquierdo y derecho (texto justificado). Se utilizará el tipo de fuente Times New Roman de 12 puntos. Las páginas deberán estar numeradas, utilizando números arábigos en su ángulo inferior derecho. Asimismo, las líneas deberán estar numeradas a lo largo de todo el documento de manera consecutiva, comenzando en la primera página o página de presentación. El uso de guiones automáticos de separación de palabras en sílabas estará permitido exclusivamente para los resúmenes de presentaciones en reuniones científicas.

1.2. Otras características comunes a todo tipo de trabajos

1.2.1. Primera página

La primera página contendrá el título del trabajo en dos idiomas, los nombres de autores/as, su respectiva filiación/lugar de trabajo, los datos completos de quien remite el trabajo y constituya el contacto y el título abreviado del trabajo. Se deberán consignar, en lo posible, direcciones de correo oficial

(institucional). De ser necesario, esta página podrá sobrepasar la extensión de la hoja A4. A continuación, se dan mayores precisiones acerca de cada ítem.

- **Título del trabajo.** Se escribirá con la inicial en mayúscula (tipo oración) y en negrita, centrado, con fuente Times New Roman y tamaño de fuente 14 puntos. Será conciso, pero suficientemente informativo. Es deseable la inclusión de alguna conclusión del trabajo en su título. No deberá contener abreviaturas sin aclarar, y solo contendrá siglas, acrónimos o acortamientos ampliamente divulgados (ej: ADN, sida, OMS). Se dejará un espacio de interlineado y luego se consignará el título en inglés (o en español, si el artículo estuviera escrito en inglés), con las mismas características tipográficas.

- **Identificación de autores/as.** Dejando un espacio después del título en el segundo idioma, se escribirá primero el/los apellido/s, una coma, y luego todos los nombres completos. Se continuará de esta manera, separándolos mediante punto y coma (;). Se colocarán números con formato de superíndice para indicar la filiación institucional. A continuación del superíndice, alentamos la inclusión del código de identificación ORCID (del inglés: *Open Researcher and Contributor ID*), que en el artículo definitivo constituirá un ícono con hipervínculo (ver ejemplo de primera página más adelante). El autor o la autora de contacto serán identificados con un asterisco.

- **Filiación institucional/Lugar de trabajo.** Se consignará a renglón seguido. En primer término, se deberá indicar la unidad de investigación (Cátedra, grupo de trabajo, Laboratorio, Instituto). Luego, la Facultad u otra institución de la que depende, la Universidad u organismo superior.

Quienes consignent su pertenencia a alguna agencia de investigación deberán hacer constar, además, en dependencias de qué institución trabajan, por ejemplo: “...Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Facultad de Ciencias Veterinarias...”.

En caso de tratarse de un profesional de actividad en el ámbito privado se consignará “profesional independiente”, localidad y país de trabajo.

Si todos los lugares de trabajo se encuentran en un mismo país, este puede consignarse al final de las filiaciones laborales. De lo contrario, los diferentes países deberán constar en cada lugar de trabajo.

A renglón seguido constará la dirección de correo electrónico de contacto (para formato, ver ejemplo).

Aun las siglas de instituciones reconocidas en el ámbito de las ciencias veterinarias deben ser aclaradas, ya que pueden resultar desconocidas para habitantes de otros países.

- **Título abreviado.** Se escribirá en el mismo idioma que el trabajo, luego del correo electrónico de con-

tacto, dejando un espacio. Consistirá en un título corto y representativo, de 45 caracteres o menos, incluyendo espacios.

- *Datos personales.* Por debajo del título abreviado se consignarán la dirección postal laboral completa y el teléfono del autor/a de contacto. Solo la dirección de correo electrónico será visible en la versión publicada.

Las direcciones de correo electrónico del resto de los/las autores/as deberán ser incorporadas en la sección de metadatos durante el proceso de envío en línea, pero no serán publicadas.

Ejemplo de primera página

Título completo en el idioma del trabajo

Título en el segundo idioma

Apellido(1), Nombres¹; Apellido(2), Nombres¹;
Apellido(3), Nombres², orcid.org/0000-0002-xxxx-xxxx;
Apellido(4), Nombres³; Apellido(5), Nombres⁴;
Apellido(6), Nombres^{1*}

1. Cátedra, Departamento, Facultad, Universidad, País. 2. Laboratorio, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Facultad, Universidad. Argentina. 3. Profesional independiente. Ciudad, País. 4. Laboratorio, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

*Correo electrónico del/la autor/a de contacto: identificación@mail.edu

Título abreviado

Datos del/la autor/a de contacto (*)

Dirección postal laboral completa y teléfono de contacto

1.2.2. Páginas segunda y tercera: contendrán los resúmenes y las palabras clave.

La segunda página contendrá el resumen del trabajo en el idioma en que fue redactado, bajo el subtítulo Resumen y, por debajo, dejando un espacio, se incluirán las palabras clave en el mismo idioma, bajo el subtítulo Palabras clave. En la siguiente página (tercera), se redactará el resumen en el segundo idioma (en inglés se subtitulará como Abstract). Dejado un espacio, se consignarán las palabras clave con el subtítulo: Key words.

- *Características de los resúmenes.* En ellos se incluirán los objetivos, principales resultados y conclusiones, desarrollados en 200 palabras o menos. Se sugiere evitar acrónimos, siglas y abreviaturas. No estarán divididos en secciones ni contendrán citas bibliográficas.

- *Palabras clave.* Son palabras o expresiones adicionales que facilitan la recuperación del documento a partir de bases de datos bibliográficos. Para una mayor utilidad en la búsqueda dentro de los sistemas de indización, se sugiere la utilización de términos no incluidos en el título. Se aceptarán entre 3 y 5 palabras separadas mediante comas.

1.2.3. Páginas sucesivas

Contendrán el texto, los agradecimientos, la declaración de conflicto de intereses, la bibliografía y las leyendas para las figuras.

- *Texto.* Organizado en secciones, según el tipo de trabajo. Estas estarán encabezadas por subtítulos en mayúsculas/minúsculas (tipo oración), sin punto final. El texto contendrá las entradas para todas las tablas, figuras, referencias bibliográficas y material complementario. A continuación del texto se enunciarán los agradecimientos, la declaración de conflicto de intereses y la lista de referencias bibliográficas (bajo el subtítulo Bibliografía).

- *Agradecimientos.* Se podrá agradecer a personas que hayan realizado aportes significativos que no constituyen autoría. En este apartado deberá consignarse, además, la fuente de financiamiento del trabajo e incluir los códigos de identificación de proyectos subsidiados.

- *Declaración de conflicto de intereses.* Existe un conflicto de intereses cuando el juicio profesional con respecto a un interés primario (el bienestar del paciente, la validez de la investigación) puede ser influenciado por un interés secundario (como el beneficio económico). Bajo este título:

a- podrán consignarse las relaciones financieras o personales con organizaciones o personas que pueden influenciar o sesgar los resultados del trabajo

b- se podrá declarar que no existe conflicto de intereses.

Ejemplo:

No existe conflicto de intereses, incluyendo entre estos últimos las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

- *Bibliografía.* ANALECTA VETERINARIA utiliza el formato de referencias basado en el estilo Harvard,

del tipo “autor-año” en el texto y por orden alfabético en la lista de referencias.

Todos los artículos u otras fuentes utilizadas como referencias deberán ser accesibles en línea o mediante buscadores bibliográficos. En caso contrario, podrá ser requerido el envío del documento a pedido de los evaluadores o del Consejo Editorial. Las fuentes basadas en comunicaciones presentadas en reuniones científicas, comunicaciones personales, manuales de procedimientos, protocolos de instituciones y tesis deberán reducirse al mínimo y solamente se justificará su incorporación en caso de que no se registre una fuente publicada en otro medio.

Formato de las citas en el texto

Se consignará, entre paréntesis, en color de fuente azul (incluidos los paréntesis): el apellido del/la primer/a autor/a (seguido de la expresión *et al.*, si se trata de más de dos autores/as) y el año de publicación, separado por una coma, según el ejemplo. Si el artículo tiene solamente dos autores/as, se consignarán ambos, separados por el signo: &. Si la construcción así lo requiriese, podrá ubicarse la cita a mitad de la oración.

... puede persistir el infiltrado de linfocitos (Deeg *et al.*, 2002).

... similares a los músculos maseteros del ciervo axis (Mateo & Sánchez, 2016).

Los autores también podrían haber elegido expresar:

“Según Deeg *et al.*, (2002), puede persistir el infiltrado de linfocitos.

Si la misma afirmación se sustenta en más de una cita bibliográfica, estas deberán estar separadas por medio de un punto y coma (;). La incorporación de las citas entre paréntesis será alfabética (ver ejemplo a continuación). Si se incluyeran dos o más referencias del/la mismo/a primer/a autor/a, las fechas de publicación deberán estar separadas por comas, en orden cronológico ascendente.

... en las células apoptóticas se produce la externalización de la fosfatidilserina de la membrana (Fadok *et al.*, 1992; Savill, 1993, 1997; Willie, 1997).

Si se incluyeran dos o más referencias del/la mismo/a primer/a autor/a y del mismo año, se identificarán con letras:

... inducido por las células macrofágicas (Jones *et al.*, 2009a, 2009b).

Estas mismas letras deberán ser consignadas, posteriormente, en la lista de referencias.

Las referencias a comunicaciones personales se indicarán entre paréntesis del siguiente modo: (comunicación personal, autor/a, año), pudiendo omitirse el autor si está consignado en el texto.

Formato de las referencias en la Bibliografía (lista de referencias)

El orden será alfabético y cada cita deberá incluir la totalidad de autores/as.

Artículos en publicaciones periódicas

Se citará la nómina completa de autores/as y sus iniciales, separados/as por comas. Luego se consignará el año entre puntos. A continuación, el título del trabajo con mayúsculas y minúsculas (tipo oración), sin comillas ni negritas. A continuación, el título completo de la revista seguido de un punto. Luego, el volumen, número de la revista (entre paréntesis), seguido de dos puntos y las páginas del artículo separadas por un guión, en ese orden, sin espacios luego de los signos de puntuación. En el caso de estar disponible, se incorporará el Digital Object Identifier (DOI) al final de la referencia, según el formato que se muestra a continuación:

Rensetti D, Marin M, Quintana S, Morán P, Verna A, Odeón A, Pérez S. 2016. Involvement of tolllike receptors 3 and 7/8 in the neuropathogenesis of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Research in Veterinary Science*. 107:1-7. doi:10.1016/j.rvsc.2016.04.009

Buldain D, Buchamer A, Marchetti L, Aliverti F, Borja C, Mestorino N. 2017. Efecto antimicrobiano de la combinación de cloxacilina con aceite esencial de *Melaleuca armillaris* frente a *Staphylococcus aureus*. *Analecta Veterinaria*. 37(2):33-9. doi:10.24215/15142590e014

Si se trata de una publicación anticipada disponible en línea, que no forma parte de un volumen, esta situación deberá consignarse.

Libros

Se citarán los/las autores/as, el año de publicación, el título y la edición (si no es la primera). Luego, la ciudad de la publicación y el nombre de la editorial, separados por coma.

Gilbert SF. 2006. *Biología del desarrollo*. 7° Ed. reimpr. Buenos Aires, Médica Panamericana.

Capítulos de libros

La cita constará de: autores/as del capítulo y título del capítulo. En: autores/as del libro. Año de publicación. Título del libro, edición (si no es la

primera). Luego, la ciudad de publicación, nombre de la editorial y páginas inicial y final del capítulo.

García V, Ochoa L, Quiroga MF, Pasquinelli V. Aspectos celulares y moleculares de la respuesta inmune frente a las micobacterias. En: Rabinovich GA. 2004. Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina. Un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica. Buenos Aires, Médica Panamericana, pp. 217-27.

Lewin B. Chapter 4: Clusters and repeats. En: Lewin B. 2003. Genes VIII. Upper Saddle River, Pearson Education Inc., pp. 85-133.

Resúmenes de presentaciones en reuniones científicas

Se utilizará un formato similar al de los artículos en revistas, consignando, luego del título del trabajo, el nombre de la reunión. Luego, ciudad, país y página.

Pardini L, Bacigalupe D, Moré G, Rambeaud M, Basso W, Perfumo CJ, Hermann DC, Schares G, Venturini MC. 2011. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains in slaughtered pigs from Argentina. The 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Buenos Aires, Argentina, p. 336.

Tesis de maestría o doctorado y trabajos finales de especialización

Se indicará autor/a y año. Luego, el título de la tesis/trabajo. A continuación, el indicador "Tesis de" o "Trabajo de" seguido de la carrera e institución que otorga el título. Posteriormente, se indicará la localización del recurso (URL) desde el que la tesis o trabajo final pueden ser recuperados, en caso de estar depositados en un repositorio institucional.

Huber B. 2012. Estudio farmacocinético de tilosina en abejas melíferas. Variables con impacto en el nivel de residuos en miel. Tesis de Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/1592>.

Muriel M. 2016. Determinación de la cinética del daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica en equinos sometidos a esfuerzo físico de alta intensidad. Tesis de Doctorado en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/59227>.

Libros electrónicos de acceso libre en internet

Autores/as. Año de publicación. Título como figura en el buscador correspondiente [libro electrónico/ebook]. DOI (si estuviera disponible). Lugar de publicación (si se conoce), editor. Disponible en: (URL) [fecha de acceso].

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. 2012. Rang y Dale Farmacología. Séptima Edición [libro electrónico]. Amsterdam, Elsevier. Disponible en: <https://goo.gl/NFIeWT> [Consultado 01/06/2017].

Frank SA. 2002. Immunology and Evolution of Infectious Disease [ebook]. Princeton, Princeton University Press. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2394/> [Consultado 01/06/2017].

Página web/Website

Autores/as. Año de publicación. Título de la página. [En línea] Disponible en: (URL). [Consultado (fecha de consulta)].

Abramowitz M, Davidson MW. 2018. Anatomy of the Microscope: Introduction. [En línea] Disponible en: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/introduction/> [Consultado 20/11/2018].

Organización Mundial de la Salud (OIE). 2018. Encefalopatía espongiforme bovina (EEB). [En línea] Disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/encefalopatia-espongiforme-bovina/> [Consultado 20/11/2018]

En caso de dudas acerca de cómo citar otro tipo de material (estándares internacionales, leyes, publicaciones parciales en libros electrónicos de reuniones científicas, patentes, informes de organizaciones, etc.) comunicarse con el consejo editorial, iniciando un hilo de discusión en el portal de la revista.

- *leyenda para las figuras*. Forman parte del documento principal, pero se redactarán en hoja aparte.

1.3. Características particulares de cada trabajo

En ANALECTA VETERINARIA se publican trabajos en 8 secciones. Estas son:

- **Nota editorial.** Se trata de la presentación del número o del volumen. Es publicada por el Director de la revista, en ocasiones particulares.

- **Trabajos de investigación.** Son informes completos de investigaciones originales o de meta análisis. Constan de los siguientes apartados (4): Introducción, Materiales y métodos, Resultados, y Discusión y conclusiones.

- **Artículos de investigación en enseñanza.** Se trata de trabajos que constituyan un aporte para la enseñanza de las Ciencias Veterinarias (trabajos de investigación propiamente dicha, intervenciones, etc.), que sean superadores de la mera presentación de resultados cuantitativos e incluyan el correspondiente análisis. Constan de los siguientes apartados (5): Introducción (en el que deberán consignarse el motivo de interés, el estado actual de la cuestión, los fundamentos teóricos en que se enmarca y los objetivos y podrán incluirse hipótesis de trabajo), Métodos, Resultados (presentación y análisis), Discusión y conclusiones, y Proyección de la investigación.

- **Comunicaciones cortas.** Se trata de informes originales que se caracterizan por ser acotados en extensión o envergadura o que, en razón de su novedad, requieren comunicación inmediata como anticipo de otra más exhaustiva. Constan de las mismas secciones que los trabajos de investigación. No podrán superar las 5 páginas de texto (en formato de hoja A4, excluyendo la primera página y la página de resúmenes) ni las 3 figuras. Tendrán, como máximo, 15 referencias bibliográficas.

- **Artículos de revisión.** Son revisiones narrativas orientadas a la actualización de un tema relevante y que incluyen la discusión crítica del estado del conocimiento. Constan de una breve Introducción (en la que se explica el interés del tema o el motivo de la revisión), Subtítulos (los que resulten apropiados al tema en cuestión) y Discusión y conclusiones. Tendrán, como mínimo, 40 referencias bibliográficas.

- **Descripciones de casos.** Consisten en la descripción de casos con aspectos inusuales que provean información significativa y original. Este concepto incluye la presentación o progreso poco habitual de una enfermedad, efectos colaterales o adversos no informados durante tratamientos o planes de vacunación, entre otros. Constan de Introducción, Presentación del caso (con los subtítulos que requiera el tipo de caso) y Discusión y conclusiones. Deberá incluir hallazgos relevantes, tanto positivos como negativos, que surjan de los exámenes realizados, la interpretación de los resultados y su discusión con referencias a los artículos citados. Si se trata de un solo caso, la historia clínica será completa, si son varios, solo se consignarán los datos más relevantes de cada uno. Tendrán como máximo 15 referencias bibliográficas.

- **Informes técnicos.** Son descripciones y análisis de técnicas novedosas en los ámbitos de la investigación, del diagnóstico o del tratamiento quirúrgico. Constan de Introducción, Descripción metodológica, y Discusión y conclusiones. En este y otros tipos de trabajo que así lo requieran, la descripción metodológica puede enriquecerse mediante videos de alta calidad de información. Tendrán, como máximo, 15 referencias bibliográficas.

- **Resúmenes de presentaciones en reuniones científicas.** El envío estará a cargo de los/las organizadores/as de reuniones científicas ocurridas en el ámbito de la Universidad Nacional de La Plata, previo acuerdo con el Consejo Editorial de la revista. Dichos resúmenes se publicarán en un Suplemento. Para establecer el formato de los resúmenes de presentaciones en reuniones científicas, se invita a quienes organicen tales reuniones a ponerse en contacto para conocer los aspectos formales requeridos, a través del correo electrónico (analecta@fcv.unlp.edu.ar).

2. Otros archivos

2.1 Figuras

Se consideran figuras que ilustran el trabajo tanto a las fotografías como a los dibujos lineales y esquemas. Deberán ser numeradas correlativamente con números arábigos y citadas en el texto en el orden que corresponda. En caso de tratarse de fotografías, estas no podrán incluir rostros de personas que no sean autores/as, o animales con marcas específicas que permitan reconocerlos, excepto que se posea consentimiento por escrito de sus propietarios/as. Es responsabilidad de los/as autores/as obtener permiso de quienes posean la propiedad intelectual para reproducir figuras o tablas que han sido publicadas en otro sitio. Las ilustraciones deben tener un contraste adecuado. Deberán ser enviadas separadas del texto y en **formato TIFF**.

Las figuras correspondientes a imágenes microscópicas capturadas a partir de cámaras de video o fotográficas montadas sobre el microscopio y aquellas escaneadas a partir de fotografías, deberán tener una resolución final mínima de **300 dpi**. Estas imágenes deberán contener una barra de calibración que indique la magnificación final observada. No se aceptarán unidades de magnificación resultantes de la multiplicación entre el objetivo y el ocular (por ejemplo: 400X).

Las figuras correspondientes a dibujos lineales y esquemas deberán tener una resolución final de **600 a 1200 dpi**. El tamaño de letras y números incluidos en las figuras deberá ser el adecuado para que conserve la legibilidad, aún luego de la reducción de tamaño. Las leyendas para las figuras deberán constituir una descripción precisa del contenido de las figuras y mencionar las técnicas cuyos resultados allí se muestran. Todos los textos

que contengan las figuras (incluidas las leyendas) deberán resultar accesibles para la corrección.

2.2 Tablas

Las tablas se diseñarán usando la función correspondiente del procesador de texto o de las planillas de cálculo. Deben ser de **estructura sencilla** (líneas horizontales inicial y final de tabla y línea de encabezados de columna), sin sombreados y sin divisiones entre las filas o las columnas. Todo el texto que contenga las tablas (incluidos los títulos) debe ser accesible para la corrección.

Se enviarán en hoja aparte, en un archivo con el título y las referencias correspondientes, que deberán seguir los mismos criterios tipográficos que para el resto del trabajo presentado.

2.3 Material complementario

Podrán remitirse otro tipo de archivos, como videos o hipervínculos, cuya pertinencia y calidad será evaluada por el Consejo Editorial. Este material no será considerado si no se envía según el formato que aquí se detalla: peso máximo de 20 MB cada uno y formato reproducible mediante herramientas y programas gratuitos (PDF, SWF, MP4, MOV, XLS, XLSX). Los datos del material complementario (nombre del archivo, formato y extensión, título de los datos presentados y descripción de los datos) constarán en el apartado "Leyendas para las figuras".

Envío del trabajo, proceso de revisión y comunicación con los autores

ANALECTA VETERINARIA recibe trabajos para su publicación de manera continua. Es responsabilidad de quien remita el trabajo asegurar que la totalidad de los/las autores/as lo han leído y aprobado y están de acuerdo con el envío a ANALECTA VETERINARIA.

El envío y todas las comunicaciones posteriores se realizará en línea en:

<https://revistas.unlp.edu.ar/analecta/index>

Se consignarán el idioma del envío y la sección a la que corresponde y se leerán, cumplirán y tildarán los REQUISITOS DE ENVÍO. Entre ellos, se establece la obligatoriedad de acompañar el envío con una breve nota de presentación en la caja "Comentarios para el editor/a" en la que se menciona el interés que reviste su publicación. En la nota de presentación se incluirán nombres de potenciales evaluadores/as, que en ningún caso

podrán haber sido coautores/as de ningún/a autor/a, al menos en los últimos cinco años, ni miembros actuales de la misma institución. Estos datos son recibidos en calidad de sugerencia y no generan ningún compromiso para el Consejo Editorial

Es un requisito que los/las autores/as provean, en los casilleros correspondientes a los metadatos del envío, todos sus nombres completos y las direcciones de correo electrónico institucional. Quienes ejerzan la profesión de manera independiente o privada consignarán una dirección activa de correo electrónico.

Revisión

El Consejo Editorial evaluará la pertinencia del trabajo, según se adecue o no a las áreas del conocimiento que alcanza la revista. En caso de corresponder, el Consejo Editorial verificará que se cumplan las siguientes premisas:

- calidad de contenido para ser remitido a evaluación externa
- estructura gramatical del idioma del trabajo
- adecuación a las normas editoriales (incluida la bibliografía).

Los trabajos que no cumplan con las normas editoriales serán devueltos para ser reordenados de acuerdo con ellas, con fecha de recepción perentoria. En caso de no reenviarse en el plazo pautado, el sistema emitirá respuesta de "rechazo", lo que no obsta para la realización de un nuevo envío.

Los artículos serán sometidos a una revisión por pares con modalidad doble ciego (los nombres de todas las personas involucradas como autoras o evaluadoras se conservarán en el anonimato). El Consejo Editorial seleccionará para esa función a, por lo menos, dos especialistas externos/as.

Cuando se encuentren disponibles los resultados de la evaluación, se iniciará un hilo de discusión en el sitio del envío. Se deberán responder los comentarios y las sugerencias de los/as evaluadores/as, punto por punto, en un documento aparte (además de la nueva versión del trabajo), titulado: "Respuestas al Consejo Editorial", que pueda leerse e interpretarse de manera independiente de la nueva versión del trabajo. Los trabajos que sean reenviados más de una vez, o después de cuatro meses desde la decisión inicial, serán considerados como un nuevo envío. Todos los cambios realizados en el nuevo envío deberán resaltarse en amarillo para una mejor y más rápida identificación.

El Consejo Editorial decidirá e informará si el trabajo ha sido: aceptado sin modificaciones, aceptado con modificaciones menores, aceptado con modificaciones mayores o rechazado.

Una vez realizada la corrección editorial del trabajo aceptado, este pasará a la etapa de Producción (diseño de la maqueta de publicación). Los/las autores/as recibirán una última prueba en formato [.pdf] (prueba de galera) y dispondrán de un breve plazo que les será comunicado, para enviar modificaciones. En caso de no enviarlas en el plazo establecido, la prueba se considerará aprobada para su publicación.

Los artículos se pondrán a disposición del público para que haga de ellos un uso justo y respetuoso de los derechos de autor, cumpliendo las condiciones de la licencia de uso **Creative Commons CC-BY-NC-ND**. Este tipo de licencia permite a otras personas descargar la obra y compartirla, siempre y cuando se otorgue crédito por la autoría, pero no permite cambiarlas de forma alguna ni usarlas comercialmente.

INFORMATION FOR AUTHORS

Editorial policy and general terms

The opinions expressed in the articles published in ANALECTA VETERINARIA do not necessarily reflect the opinions of the journal. ANALECTA VETERINARIA authorizes the reproduction of its articles for academic purposes with the sole condition of mentioning the source. The use of commercial names cited for the identification of products in the context of the presented articles does not direct or indirectly imply endorsement or promotion of said products by the journal.

The authors grant ANALECTA VETERINARIA the rights of authorship in a non-exclusive manner. They are responsible for the data and contents being published, and claim having actively participated in the research process and/or the preparation of the work. The authors also declare the existence or not of conflict of interests, mention the financial supports and specify the approval by the institutional committees and regulatory authorities that correspond to each case. It is their sole responsibility to have authorization rights to cite unpublished data. No editorial responsibility is assumed for the accuracy of the references. Eventually, the Editorial Board may require probative information.

Language

ANALECTA VETERINARIA accepts articles in Spanish or English. Titles, abstracts and keywords of the articles will be published in both languages.

Originality

The information contained in the articles must be original (not published). It cannot be in the process of evaluation in more than one journal or other means of communication. Plagiarism (equal or very similar information published with another author in another medium) and duplicate publication (information already published by any sender) are considered serious ethical errors which invalidate their publication in ANALECTA VETERINARIA.

Standards of ethics

Regarding the definition of authorship, the responsibilities of the editors and the causes that act as a possible conflict of interests, ANALECTA VETERINARIA adheres to the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org>).

In relation to other aspects, such as the format and style of preparation of the original,

Analecta Veterinaria establishes a set of rules that are detailed in "Instructions for the preparation of the article". All the doubts that may arise can be consulted by electronic mail to:
analecta@fcv.unlp.edu.ar

The Editorial Board of Analecta Veterinaria takes into consideration the ethical treatment of experimental animals and reserves the right not to publish works that do not comply with this premise. The submission of each article will include the certification of approval of the procedures performed for that work by the ethics committee of its academic unit. If this is not possible it will be recorded according to what national or international ethical standards were carried out.

Types of articles for publication

Submissions of research papers, research works in education, short communications, case reports, technical reports, review articles and abstracts of presentations in scientific meetings (only by organizers) are accepted (see 1.3). The Editorial Board will decide the priority of publication of each work and the proportion of each type, privileging those dealing with research.

Instructions for the preparation of the article

General characteristics

The working language can be either Spanish or English. It is preferred that works written in English follow the grammar of British English. Other variants of the English language are accepted, provided they are uniformly followed throughout the work.

Measurement units will be expressed according to the Sistema Internacional de Unidades (www.cem.es/sites/default/files/siu8edes.pdf).

Abbreviations must be clarified the first time the term or expression is mentioned but its use will not be necessary if it is mentioned less than five times. If the work requires the use of several abbreviations (more than ten) a list should be generated, which will be included after the abstracts. Certain abbreviations, acronyms and abbreviations (ATP, DNA, ELISA, WHO, PBS, Dr., No., among others) do not require clarification.

For naming substances, biological agents of disease, anatomical terms, etc., recommendations of the current nomenclatures and consensuses for the corresponding specialty will be followed. Commercial products must be identified by means of the registered trademark symbol (®/™), also specifying the generic names of the main components. If they

are mentioned in the “Materials and methods” section, the name and address of the manufacturer (city, country) must also be entered. Scientific names of generic or lower category will be written in italics.

Original for publication (general)

The original for publication includes a main document and other files:

1- **Main document:** it is a file that contains the presentation page, sections of the work (which vary according to their type), acknowledgments, conflict of interests’ statement, bibliography and the legends for the figures. This document may have some of the following formats: **doc**, **docx** o **rtf**.

2- **Other files:** tables, figures, supplementary material.

1- Main document

1.1. General format of the document del documento (common to all type of articles)

The document will be configured in A4-size paper, with margins of at least 3 cm per side and 1.5 line spacing. The text should be aligned in the left and right margins (justified text). The Times New Roman font type of 12 points will be used. Pages should be numbered, using Arabic numerals in the lower right corner. Likewise, the lines must be numbered throughout the entire document consecutively, starting on the first page or presentation page. The use of automatic hyphenation will be allowed exclusively for scientific meetings abstracts.

1.2. Other characteristics common to all type of articles

1.2.1. First page

The first page will contain the title of the work in two languages, the names of the authors, their respective filiation/place of work, the complete data of the person who sends the work and constitutes the contact and the running title of the work. Official institutional addresses (postal address and email) are preferred. If necessary, this page may exceed the length of the A4-size paper.

- *Title.* It will be written with the initial capitalized (type sentence) and in bold, centered, and text set in 14 points Times New Roman font. It will be concise, but sufficiently informative. It is desirable to include some conclusion of the work. It should

not contain abbreviations without clarification, and it will only contain abbreviations, acronyms or shortenings widely disseminated (eg DNA, AIDS, WHO). An interline space will be left and then the title will be consigned in English (or in Spanish, if the article was written in English), with the same typographical characteristics.

- *Identification of authors.* Leaving a space after the title in the second language, the last name/s will be written first, a comma, and then all the complete names. It will continue in this way, separating them by semicolons (;). Numbers with a superscript format will be placed to indicate the institutional affiliation. Following the superscript, we encourage the inclusion of the ORCID (Open Researcher and Contributor ID) identification code, which in the final article will constitute an icon with a hyperlink (see example on the first page below). The author or contact author will be identified with an asterisk.

- *Institutional affiliation/Workplace.* It will be entered immediately. First, the research unit should be indicated (Chair, working group, Laboratory, Institute). Then, the Faculty or another institution on which it depends, the University or higher organization.

Those who register their membership in a research agency must also state, in dependencies of which institution they work, for example: “... National Council for Scientific and Technical Research (CONICET), School of Veterinary Sciences ...”.

In case of being an activity professional in the private field, “independent professional”, locality and country of work will be consigned.

If all the working places are in the same country, this can be recorded at the end of the labour affiliations. Otherwise, the different countries must be included in each workplace.

Next, the contact email address should be included (for format, see example).

Even the acronyms of recognized institutions in the field of veterinary sciences should be clarified, since they may be unknown to inhabitants of other countries.

- *Running title.* It will be written in the same language as the work, after the contact email, leaving a space. It will consist of a short and representative title, of 45 characters or less, including spaces.

- *Personal information.* Below the running title the complete work postal address and the contact author's telephone number will be consigned. Only the email address will be visible in the published version.

Email addresses of the rest of the authors should be included in the metadata section during the online submission process, but they will not be published.

First page example

Full title in the language of work

Title in the second language

Last name(1), Names¹; Last name(2), Names¹;
Last name(3), Names², orcid.org/0000-0002-xxxx-xxxx;
Last name(4), Names³; Last name(5), Names⁴;
Last name(6), Names^{1*}

1. Chair, Department, Faculty/School/College, University, Country. 2. Laboratory, National Council of Scientific and Technical Research (CONICET), Faculty, University, Country. 3. Independent professional, City, Country. 4. Laboratory, National Institute of Agricultural Technology (INTA).

*Email address of the contact author:
identification@mail.edu

Running title

Data of the contact author (*)

Complete postal work address and contact telephone

1.2.2. Second and third pages: they will contain the abstracts and the keywords contendrán los resúmenes y las palabras clave.

The second page will contain the abstract of the work in the language in which it was written, under the subtitle Abstract and, below, leaving a space, will include the keywords in the same language, under the subtitle Key words. On the next page (third), the abstract will be written in the second language (in Spanish it will be subtitled as Resumen). Leaving a space, the keywords will be consigned with the subtitle: Palabras clave.

- *Characteristics of the abstracts.* They will include the objectives, main results and conclusions, developed in 200 words or less. It is suggested to avoid acronyms and abbreviations. They will not be divided into sections or contain bibliographic citations.

- *Key words.* They are additional words or expressions that facilitate the retrieval of the document from bibliographic databases. For greater utility in the search within the indexing systems, the use of terms not included in the title is suggested.

Three to five keywords separated by commas will be accepted.

1.2.3. Following pages

They will contain the text, acknowledgments, conflict of interests' statement, bibliography and legends for the figures.

- *Text.* Organized in sections according to the type of article. These will be headed by uppercase/lowercase subtitles (sentence type), without endpoint. The text will contain the entries for all the tables, figures, bibliographical references and supplementary material. Following the text, the acknowledgments, the conflict of interests' statement and the list of bibliographical references (under the subtitle Bibliography) should be announced.

- *Acknowledgements.* Here, thanks to people who have made significant contributions that do not constitute authorship can be included. In this section, the source of financing of the work must also be included as well as the codes of identification of subsidized projects.

- *Conflict of interest's statement.* There is a conflict of interest when professional judgment regarding a primary interest (the patient's well-being, the validity of the research) can be influenced by a secondary interest (such as economic benefit). Under this title:

a- financial or personal relationships with organizations or persons that may influence or bias the results of the work may be recorded.

b- it may be declared that there is no conflict of interest.

Example:

There is no conflict of interest, including among the latter the financial, personal or other relationships with other people or organizations that could inappropriately influence the work.

- *Bibliography.* ANALECTA VETERINARIA uses the format of references based on the Harvard style, of the type "author-year" in the text and in alphabetical order in the list of references.

All articles or other sources used as references should be accessible online or through bibliographic search engines. Otherwise, the document may be sent at the request of the evaluators or the Editorial Board. Sources based on communications presented at scientific meetings, personal communications, procedures manuals, institutional protocols and theses should be reduced to a minimum and only be incorporated if a source published in another medium is not registered.

Format of references in the text

It will be recorded, in parentheses in blue font colour (including parentheses): the last name of the first author (followed by the expression *et al.*, if it is more than two authors) and the year of publication, separated by a comma, according to the example. If the article has only two authors both will be consigned separated by the sign: &. If the construction requires it the reference can be in the middle of the sentence.

... puede persistir el infiltrado de linfocitos (Deeg *et al.*, 2002).

... similares a los músculos maseteros del ciervo axis (Mateo & Sánchez, 2016).

Authors could also have chosen to express:

“Según Deeg *et al.*, (2002), puede persistir el infiltrado de linfocitos.

If the same statement is based on more than one bibliographic citation these must be separated by a semicolon (;). The incorporation of quotes in parentheses will be alphabetical (see example below). If two or more references are included from the same author, the publication dates should be separated by commas, in ascending chronological order.

... en las células apoptóticas se produce la externalización de la fosfatidilserina de la membrana (Fadok *et al.*, 1992; Savill, 1993, 1997; Willie, 1997).

If two or more references are included from the same author and the same year they will be identified by letters:

... inducido por las células macrofágicas (Jones *et al.*, 2009a, 2009b).

These same letters should be recorded later in the references list.

References to personal communications will be indicated in parentheses in the following way: (personal communication, author, year). The author may be omitted if it is included in the text.

Format of references in the Bibliography (list of references)

The order will be alphabetical, and each reference must include the totality of authors.

Articles in journals

The complete list of authors and their initials, separated by commas, will be cited. Then the year between points will be consigned. Next, the title of the work with uppercase and lowercase letters (sentence type), without quotes or bold. Next, the full title of the journal followed by a period. Then, the volume, number of the journal (in parentheses), followed by a colon and the pages of the article separated by a hyphen, in that order, without spaces after the punctuation marks. If available, the Digital Object Identifier (DOI) will be included at the end of the reference, according to the format shown below:

Rensetti D, Marin M, Quintana S, Morán P, Verna A, Odeón A, Pérez S. 2016. Involvement of tolllike receptors 3 and 7/8 in the neuropathogenesis of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Research in Veterinary Science*. 107:1-7. doi:10.1016/j.rvsc.2016.04.009

Buldain D, Buchamer A, Marchetti L, Aliverti F, Borja C, Mestorino N. 2017. Efecto antimicrobiano de la combinación de cloxacilina con aceite esencial de *Melaleuca armillaris* frente a *Staphylococcus aureus*. *Analecta Veterinaria*. 37(2):33-9. doi:10.24215/15142590e014

If it is an advance publication available online, which is not part of a volume, this situation should be recorded.

Books

The authors, the year of publication, the title and the edition (if it is not the first) will be cited. Then, the city of the publication and the name of the publisher, separated by comma.

Gilbert SF. 2006. *Biología del desarrollo*. 7° Ed. reimp. Buenos Aires, Médica Panamericana.

Chapters of books

The reference will consist of authors of the chapter and title of the chapter. In: authors of the book. Year of publication. Title of the book, edition (if not the first). Then, the city of publication, name of the publisher and initial and final pages of the chapter.

García V, Ochoa L, Quiroga MF, Pasquinelli V. Aspectos celulares y moleculares de la respuesta inmune frente a las micobacterias. En: Rabinovich GA. 2004. *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina. Un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica*. Buenos Aires, Médica Panamericana, pp. 217-27.

Lewin B. Chapter 4: Clusters and repeats. En: Lewin B. 2003. Genes VIII. Upper Saddle River, Pearson Education Inc., pp. 85-133.

Scientific meetings abstracts

A format like that of articles in journals will be used, registering the name of the meeting after the title of the work. Then, city, country and page.

Pardini L, Bacigalupe D, Moré G, Rambeaud M, Basso W, Perfumo CJ, Hermann DC, Schares G, Venturini MC. 2011. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains in slaughtered pigs from Argentina. The 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Buenos Aires, Argentina, p. 336.

Master's or doctoral thesis and specialization final works

Author and year will be indicated. Then, the title of the thesis/work. Then, the indicator "Thesis of" or "Work of" followed by the career and institution that grants the title. Subsequently, the location of the resource (URL) from which the thesis or final work can be retrieved will be indicated, if deposited in an institutional repository.

Huber B. 2012. Estudio farmacocinético de tilosina en abejas melíferas. Variables con impacto en el nivel de residuos en miel. Tesis de Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/1592>.

Muriel M. 2016. Determinación de la cinética del daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica en equinos sometidos a esfuerzo físico de alta intensidad. Tesis de Doctorado en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/59227>.

Electronic books with free access on the internet

Authors. Year of publication. Title as it appears in the corresponding search engine [electronic book/ebook]. DOI (if available). Place of publication (if known), publisher. Available at: (URL) [access date].

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. 2012. Rang y Dale Farmacología. Séptima Edición [e-book]. Amsterdam, Elsevier. Available en: <https://goo.gl/NFIeWT> [Consulted 01/06/2017].

Frank SA. 2002. Immunology and Evolution of Infectious Disease [ebook]. Princeton, Princeton University Press. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2394/> [Consulted 01/06/2017]

Website

Authors. Year of publication. Page title. [Online] Available at: (URL). [Consulted (date of consultation)].

Abramowitz M, Davidson MW. 2018. Anatomy of the Microscope: Introduction. [online] Available at: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/introduction/> [Consulted 20/11/2018].

Organización Mundial de la Salud (OIE). 2018. Encefalopatía espongiiforme bovina (EEB). [online] Available at: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-los-animales/encefalopatia-espongiiforme-bovina/> [Consulted 20/11/2018]

In case of doubts about how to cite another type of material (international standards, laws, partial publications in electronic books of scientific meetings, patents, reports of organizations, etc.) communicate with the editorial board, starting a thread of discussion in the portal of the journal.

- *legends to the figures*. They are part of the main document, but they will be written on a separate page.

1.3. Characteristics of each type of article

ANALECTA VETERINARIA publish articles in 8 different sections. These are:

- **Editorial note**. It is the presentation of the number or volume. It is published by the Director of the journal, on particular occasions.

- **Research work**. They are complete reports of original research or meta-analysis. They consist of the following sections (4): Introduction, Materials and methods, Results, and Discussion and conclusions.

- **Teaching research articles**. These are works that constitute a contribution for the teaching of Veterinary Sciences (research work, interventions, etc.) that are superior to the mere presentation of quantitative results and include the corresponding analysis. They consist of the following sections (5): Introduction (in which the motive of interest, the current status of the issue, the theoretical

foundations in which it is framed and the objectives and hypotheses of work may be included), Methods, Results (presentation and analysis), Discussion and conclusions, and Projection of the investigation.

- **Short communications.** These are original reports that are characterized by being limited in size or extent or, because of their novelty, require immediate communication as a preview of a more exhaustive one. They consist of the same sections as the research works. They cannot exceed 5 pages of text (in A4-size paper, excluding the first page and the abstract page) or the 3 figures. They will have, at most, 15 bibliographical references.

- **Review articles.** They are narrative reviews aimed at updating a relevant topic and include a critical discussion of the state of knowledge. They consist of a brief Introduction (in which the interest of the topic or the reason for the review is explained), Subtitles (those that are appropriate to the topic in question) and Discussion and conclusions. They will have, at least, 40 bibliographical references.

- **Case reports.** They consist in the description of cases with unusual aspects that provide meaningful and original information. This concept includes the presentation or unusual progress of a disease, collateral or adverse effects not reported during treatments or vaccination plans, among others. They consist of Introduction, Presentation of the case (with the subtitles that require the type of case) and Discussion and conclusions. It must include relevant findings, both positive and negative, that arise from the examinations performed, the interpretation of the results and their discussion with references to the articles cited. If it is a only one case, the clinical history will be complete, if there are several, only the most relevant data of each one will be consigned. They will have a maximum of 15 bibliographical references.

- **Technical reports.** They are descriptions and analysis of novel techniques in the fields of research, diagnosis or surgical treatment. They consist of Introduction, Methodological description, and Discussion and conclusions. In this and other types of work that require it, the methodological description can be enriched through videos of high-quality information. They will have, at most, 15 bibliographical references.

- **Scientific meetings abstracts.** Its presentation will be in charge of the organizers of scientific meetings that took place at the National University of La Plata, after agreement with the Editorial Board of the journal. These abstracts will be published in a Supplement. To establish the format of the abstracts those who organize such meetings are invited to get in touch by email (analecta@fcv.unlp.edu.ar) to know the formal aspects required.

2. Other files

2.1 Figures

Figures that illustrate the work are considered both photographs and linear drawings and schemes. They must be numbered correlatively with Arabic numerals and cited in the text in the order that corresponds. Photographs should not include faces of people who are not authors, or animals with specific marks that allow them to be recognized, unless they have the written consent of their owners. It is the responsibility of the authors to obtain permission from those who possess the intellectual property to reproduce figures or tables that have been published elsewhere. The illustrations must have an adequate contrast. They must be sent separately from the text and in **TIFF format**.

Figures corresponding to microscopic images captured from video or photographic cameras mounted on the microscope and those scanned from photographs must have a final resolution of at least 300 dpi. These images must contain a calibration bar indicating the final magnification observed. Magnification units resulting from the multiplication between the objective and the eyepiece will not be accepted (for example: 400X).

Figures corresponding to line drawings and diagrams should have a final resolution of **600 to 1200 dpi**. The size of the letters and numbers included in the figures should be adequate to preserve legibility, even after the size reduction. The legends for the figures must constitute an accurate description of the contents of the figures and mention the techniques whose results are shown there. All texts containing the figures (including legends) must be accessible for correction.

2.2 Tables

Tables will be designed using the corresponding function of the word processor or spreadsheets. They must have a **simple structure** (initial horizontal lines and end of table and line of column headings), without shading and without divisions between rows or columns. All text that contains the tables (including titles) must be accessible for correction. They will be sent in a separate file with the title and the corresponding references which must follow the same typographical criteria as for the rest of the work presented.

2.3 Supplementary material

Other types of files such as videos or hyperlinks, whose relevance and quality will be evaluated by the Editorial Board may be sent. This material will not be considered if it is not sent according to the format that is detailed here: maximum weight of 20 MB each with a format

reproducible using free programs and tools (PDF, SWF, MP4, MOV, XLS, XLSX). The data of the supplementary material (name of the file, format and extension, title of the presented data and description of the data) will appear in the section "Legends to the figures".

Submission of work, review process and communication with authors

ANALECTA VETERINARIA receives works for its publication continuously. It is the responsibility of the person submitting the article to ensure that all the authors have read and approved it and agree to send it to ANALECTA VETERINARIA.

Submission and all subsequent communications will be done online at:

<https://revistas.unlp.edu.ar/analecta/index>

Submission language and the section to which it corresponds will be consigned. SUBMISSION REQUIREMENTS will be read, fulfilled and marked. Among them, it is compulsory to accompany the shipment with a brief note of presentation in the box "Comments for the editor" in which the interest of your publication is mentioned. In the presentation note, it is asked to include names of potential evaluators, who in no case may have been co-authors of any author, at least in the last five years, or current members of the same institution. These data are received as a suggestion and do not generate any commitment for the Editorial Board.

It is a requirement that authors provide all their full names and the institutional email addresses in the boxes corresponding to the meta-data of the shipment. Those who practice the profession independently or privately will consign an active email address.

Revision

The Editorial Board will evaluate the relevance of the work according to whether it fits the areas of knowledge reached by the journal. If applicable, the Editorial Board will verify that the following premises are met:

-quality of content to be submitted to external evaluation.

-grammatical structure of the language of work.

-adjustment to editorial standards (including bibliography).

Works not complying with the editorial norms will be returned to be reordered according to them, with peremptory date of receipt. In case of not being resubmitted within the prescribed period the system will issue a "rejection" response, which does not prevent a new submission.

Articles will be submitted to a double-blind peer review (the names of all the people involved as authors or evaluators will be kept anonymous). The Editorial Board will select at least two external specialists for this functions.

When the results of the evaluation are available, a discussion thread will start at the portal. The comments and suggestions of the evaluators should be answered, point by point, in a separate document (in addition to the new version of the work), entitled: "Responses to the Editorial Board", which can be read and interpreted independently of the new version of the work. The works that are forwarded more than once, or after four months from the initial decision, will be considered as a new submission. All changes made to the new submission should be highlighted in yellow for better and faster identification.

The Editorial Board will decide and inform if the work has been accepted without modifications, accepted with minor modifications, accepted with major modifications or rejected.

Once the editorial correction of the accepted work has been made, it will go to the Production stage (design of the publication layout). The authors will receive a final version in [.pdf] format (galley proof) and will have a brief period that will be communicated to them, to send modifications. In case of not sending them within the established term, the final version will be considered approved for its publication.

The articles will be made available to the public to make them fair and respectful use of copyright, complying with the terms of the **Creative Commons CC-BY-NC-ND** license. This type of license allows other people to download the work and share it, as long as credit is granted for the authorship, but does not allow them to be changed in any way or used them commercially.