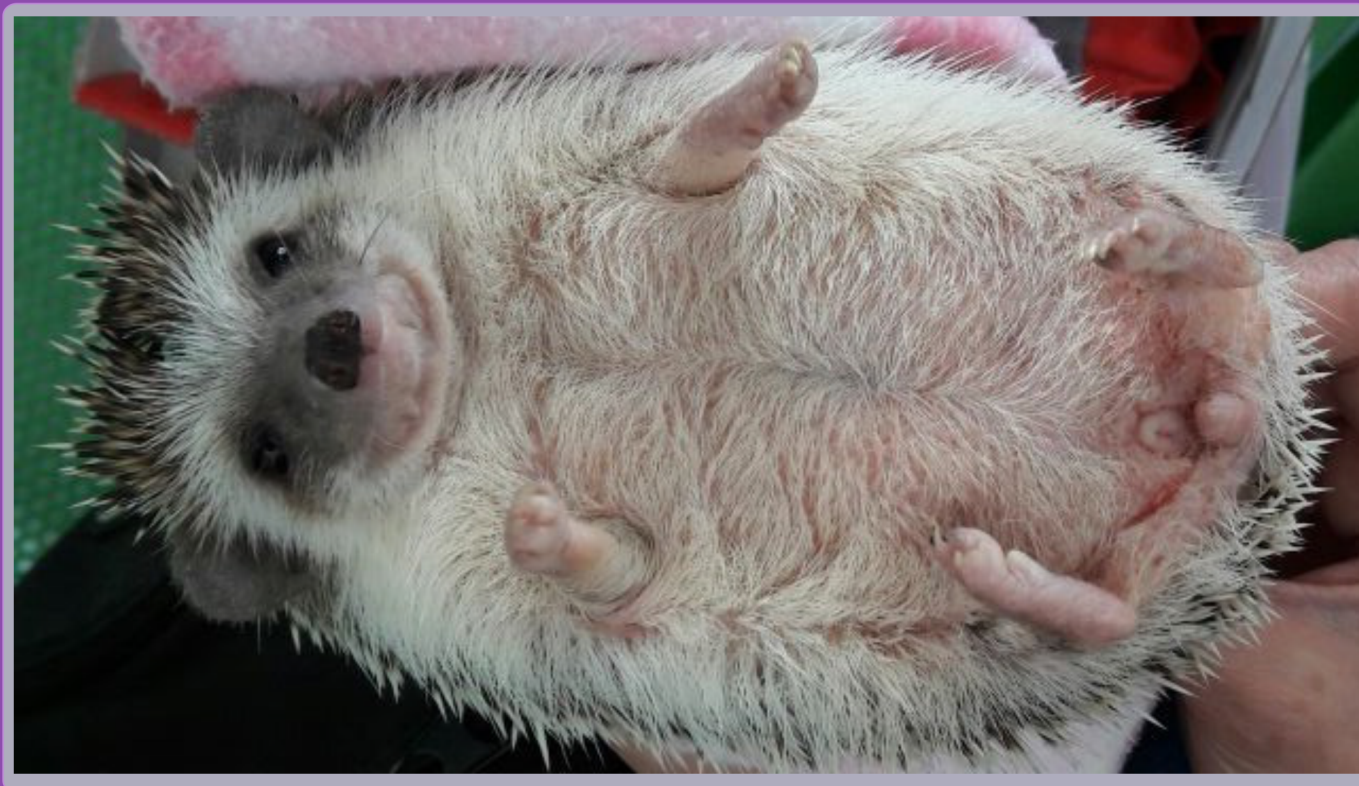


ANALECTA VETERINARIA



ISSN 1514-2590 Versión electrónica
ISSN 0365514-8 Versión impresa
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° 2, 2019

Publicación de la

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Plata



Foto de tapa: Erizo pigmeo africano (*Atelerix albiventris*).
Vicente 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 lo auspician o de las instituciones a las 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 un 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

Nuevo logro para ANALECTA VETERINARIA

doi.org/10.24215/15142590e036

1

Trabajos de investigación / Research works

Determinación de proteínas: un recurso diagnóstico para evaluar sueros de bovinos con paratuberculosis

Protein determination: a diagnostic resource to evaluate sera from cattle with paratuberculosis

MICELI GS, ALVARADO PINEDO MF, MOYANO RD, TRAVERÍA GE

doi.org/10.24215/15142590e037

2-7

Detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* en perros en contacto con zona rural. Aspectos zoonóticos de la infección

*Detection of antibodies against *Brucella abortus* in dogs in contact with rural areas. Zoonotic aspects of the infection*

MICELI GS, PÉREZ MEYER L, PERALTA LM, MÓRTOLA EC

doi.org/10.24215/15142590e038

8-14

Estudios histopatológicos y seguimiento clínico de sarcomas felinos asociados a sitios de inoculación

Histopathological studies and clinical follow-up of feline injection-site sarcomas

SANTELICES IGLESIAS OA, WRIGHT C, DUCHENE AG, RISSO MA, RISSO P,

ZANUZZI CN, NISHIDA F, LAVID A, PORTIANSKY EL, GIMENO EJ, BARBEITO CG

doi.org/10.24215/15142590e039

15-26

Comunicaciones cortas / Short communications

Evaluación del poder inhibitorio de extractos obtenidos de plantas medicinales sobre enterobacterias patógenas de importancia en Salud Pública

Evaluation of the inhibitory power of extracts obtained from medicinal plants on enteric pathogens of public health concern

FERNÁNDEZ M, SILVA P, COSTA M, GALLI L, BRUNO E

doi.org/10.24215/15142590e040

27-32

Artículos de revisión / Reviews

Inseminación artificial en la especie porcina: dosis inseminante en relación con el lugar de deposición

Artificial insemination in the swine species: inseminating dose related to the deposition place

COMPAGNONI MV, TITTARELLI CM, WILLIAMS SI

doi.org/10.24215/15142590e041

33-46

Descripciones de casos / Case reports

Pólipo y leiomioma uterinos en un erizo pigmeo africano (*Atelerix albiventris*)

*Uterine polyp and leiomyoma in an African pigmy hedgehog (*Atelerix albiventris*)*

VICENTE ME, LAPLACE R, MADARIAGA GJ, GARCÍA MITACEK MC

doi.org/10.24215/15142590e042

47-51

Información para autores/as

52-59

Information for authors

60-66

Nuevo logro para ANALECTA VETERINARIA

Con grato placer deseamos comunicar a todos los lectores que nuestra revista, ANALECTA VETERINARIA, ha sido seleccionada para integrar el Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas (NBR), un proyecto de CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) con sede en el CAICYT (Centro Argentino de Información Científica Tecnológica).

El NBR nuclea a un conjunto de publicaciones científicas y tecnológicas argentinas de excelencia, en los distintos campos del conocimiento. Dichas publicaciones científicas son sometidas a una evaluación exhaustiva con criterios únicos definidos de calidad y trascendencia, acorde con criterios internacionales.

La inclusión de ANALECTA VETERINARIA en el NBR permitirá una mayor visualización de nuestra revista tanto en la esfera nacional como internacional. Asimismo, permitirá la posibilidad de aplicar para su inclusión en otros portales, como SCIELO (Scientific Electronic Library Online), un modelo para la publicación electrónica cooperativa de revistas científicas en Internet, especialmente desarrollado para responder a las necesidades de la comunicación científica en los países en desarrollo y particularmente de América Latina y el Caribe.

Queremos agradecer a todos nuestros autores del pasado y presente por haber confiado en la calidad científica de ANALECTA VETERINARIA. Esperamos que esta reciente inclusión nos permita incrementar la cantidad de trabajos provenientes de distintas partes del mundo, para poder llevar el conocimiento científico hacia todos los rincones del planeta.

Consejo Editorial
ANALECTA VETERINARIA

Determinación de proteínas: un recurso diagnóstico para evaluar sueros de bovinos con paratuberculosis

Protein determination: a diagnostic resource to evaluate sera from cattle with paratuberculosis

MICELI GRACIELA SARA ^{1,*} , ALVARADO PINEDO MARÍA FIORELLA ² , MOYANO ROBERTO DAMIÁN ³ , TRAVERÍA GABRIEL EDUARDO ^{1,2} 

1. Cátedra de Inmunología Veterinaria Aplicada. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). 2. Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE). 3. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Laboratorio de Paratuberculosis. Instituto de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA Castelar, provincia de Buenos Aires, Argentina.

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

Resumen

Este trabajo analiza las proteínas séricas de bovinos procedentes de un rodeo con paratuberculosis endémica, enfermedad infecciosa asociada a diarrea, pérdida de estado corporal, caquexia y muerte. Se comparan los resultados obtenidos a partir de un grupo de animales positivos a tres pruebas diagnósticas de paratuberculosis con otro grupo negativo. Las pruebas utilizadas para formar los grupos fueron el cultivo mico-bacteriológico de materia fecal, la inoculación intradérmica con tuberculina aviar y un ELISA indirecto para detección de anticuerpos en suero. La concentración de las proteínas séricas y sus fracciones se analizaron mediante colorimetría y electroforesis. Los intervalos de credibilidad bayesianos fueron estadísticamente diferentes entre los grupos positivo y negativo a las pruebas diagnósticas, con menores concentraciones de albúmina y mayor concentración de gammaglobulina. La relación albúmina/globulina también presentó diferencias significativas, con disminución de la relación en el grupo positivo. Las fracciones proteicas alfa y beta no presentaron diferencias. La disminución de albúmina en el grupo de animales positivos justifica la reducción de la eficiencia productiva y enfatiza la conveniencia de segregarlos animales positivos, no solo por las pérdidas económicas asociada a la enfermedad, sino también como una medida de control para evitar la difusión de la misma.

Palabras clave

Paratuberculosis bovina, albúmina, globulina, electroforesis

Abstract

Bovine serum proteins were analyzed in sera from bovines from a herd with endemic paratuberculosis, an infectious disease associated with diarrhea, loss of body condition, cachexia and death. A group of negative animals was compared with a group of positive animals to 3 diagnostic tests for paratuberculosis (mycobacteriological culture of feces, intradermal inoculation of avian tuberculin and antibody detection by indirect ELISA). Serum protein concentrations and their different fractions were analyzed by the colorimetric method and electrophoresis. Bayesian credible intervals were statistically different, with a lower albumin concentration and higher gamma globulin concentration in the positive group compared to the negative group. The albumin/globulin ratio was also statistically different with decreased ratio in the positive group. No statistical differences were observed in alpha and beta protein fractions. The decreased albumin in the positive group partly explains the poor productive performance and emphasizes the convenience to test and cull positive animals not only to avoid economic losses, but also as a control measure to reduce dissemination of the disease.

Key words

Bovine paratuberculosis, albumin, globulin, electrophoresis

Fecha de recepción: 11/03/2019

Fecha de revisión: 13/05/2019

Fecha de aprobación: 26/06/2019

ANALECTA VET 2019; Julio-Diciembre; 39(2):2-7

Impresa ISSN 03655 14-8 Electrónica ISSN 1514-2590

doi.org/10.24215/15142590e037

Introducción

La paratuberculosis (PTB) bovina es una enfermedad infectocontagiosa producida por la micobacteria *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) (Over *et al.*, 2011). Los animales afectados presentan ileocolitis granulomatosa de curso crónico. Los signos clínicos más prominentes en los bovinos consisten en diarrea progresiva, pérdida de peso y producción láctea, emaciación y muerte (Whitlock & Buergelt, 1996). La mayoría de los animales se infecta en los primeros meses de vida, siendo el período de incubación de la enfermedad de 2 a 8 años (Koets *et al.*, 2015). Los terneros se infectan vía fecal-oral, al tomar contacto con los animales enfermos, los cuales pueden eliminar la micobacteria por la materia fecal, la leche o el calostro, incluso antes de presentar signos clínicos (Mortier *et al.*, 2015; Sweeney, 1996). La forma de controlar la enfermedad se basa en el diagnóstico y la segregación de los animales positivos y en la implementación de medidas de manejo tendientes a evitar la infección de los animales jóvenes (Gautam *et al.*, 2018). No se conocen tratamientos efectivos y las vacunas pueden interferir en el diagnóstico de la tuberculosis (Park & Yoo, 2016), siendo esta última la razón por la que no están permitidas, por el momento, en la Argentina.

Los cambios en las proteínas séricas pueden indicar procesos patológicos no específicos que afecten hígado, riñón y tracto gastrointestinal. Las proteínas séricas se han utilizado como biomarcadores en diversas enfermedades, tales como bronconeumonías, metritis, mastitis y pericarditis traumáticas, entre otras. Entre las fracciones proteicas analizadas se encuentran la albúmina, la gammaglobulina y las proteínas de fase aguda (Tothova *et al.*, 2016). En la PTB bovina, a consecuencia de la enteropatía generada, se produce un síndrome de malabsorción y mala digestión (Sweeney, 2011) con alteraciones cuantitativas en las proteínas séricas (Donat *et al.*, 2014; You *et al.*, 2012).

El objetivo del presente trabajo fue demostrar si existen diferencias en la concentración de proteínas y sus fracciones proteicas analizadas mediante electroforesis en acetato de celulosa, entre animales positivos y negativos a las pruebas diagnósticas de PTB bovina.

Materiales y métodos

Se analizaron 16 muestras de suero seleccionadas de 127 animales pertenecientes a un establecimiento ubicado en el partido de Magdalena, provincia de Buenos Aires, con PTB bovina endémica. En el mismo, se está implementando un plan de control, consistente en el sangrado periódico para la realización de un ELISA indirecto, la prueba tuberculínica anocaudal con PPD aviar y el aislamiento de *Map*. El lote original estaba

compuesto por cinco toros y 122 hembras bovinas Aberdeen Angus adultas, preñadas, con cría al pie, alimentados en pasturas naturales e implantadas. El plan sanitario está basado en vacunaciones anuales para fiebre aftosa, carbunco, canbunco sintomático y brucelosis; se complementa con desparasitaciones, tratamientos para la queratoconjuntivitis y suplementación con cobre, de acuerdo con el criterio del profesional veterinario sanitarista. La reposición del rodeo proviene del propio establecimiento y de reproductores adquiridos en remates de cabañas.

A partir del suero de los 127 animales se realizó un ELISA indirecto, de acuerdo con lo publicado previamente por Costanzo *et al.* (2012). Brevemente, se utilizó como antígeno un lisado completo de *Mycobacterium avium* subsp. *avium* cepa D4ER cultivado en caldo glicerinado durante un período de 2 meses. El soma bacteriano filtrado se inactivó mediante irradiación gamma a una dosis de 20 unidades Gray. La lisis del soma bacteriano inactivado se realizó en un disruptor celular (Constant Systeminc®, Inglaterra) a una presión de 40 Kpsi (1000 lb/in²). Posteriormente, el lisado se centrifugó a 10.000 g durante 20 minutos y el sobrenadante se utilizó como antígeno lisado completo. Cada uno de los 96 pocillos de las microplacas de ELISA (Microlon®, Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria) se sensibilizó con 100 µl del antígeno diluido 1/480 en solución tamponada de carbonatos a pH 9, durante 12 horas a 4 °C. Las placas sensibilizadas se lavaron 3 veces con una solución tamponada de fosfatos con 0,05 % de Tween20 a pH 7,2 (solución tamponada ELISA) y se incubaron con 100 µl de los sueros problema y control diluidos 1/160 en solución tamponada ELISA durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con esta solución, se incubaron con 100 µl de conjugado anti IgG bovina-peroxidasa (Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Alemania) a una dilución de 1/5000 en solución tamponada ELISA durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último se realizaron 3 lavados y se agregaron 100 µl de la solución de revelado compuesta por 1 mg/ml de ABTS (-2,2 azino-di-[3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid], Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) en solución tamponada de citrato a pH 5 y con el agregado de peróxido de hidrógeno al 3 %. Transcurridos 30 minutos, se realizó la lectura en un espectrofotómetro (Labsystem, Multiskan plus®, Helsinki, Finlandia) con un filtro de 405 nm. Se consideraron positivos los sueros con un valor igual o superior a 70% con respecto al control positivo.

Para la prueba tuberculínica se inoculó en forma intradérmica, en el pliegue anocaudal interno, 0,1 ml de PPD aviar en una concentración de 0,5 mg/ml (Ceva Salud Animal®, Buenos Aires, Argentina), utilizando una jeringa semiautomática (McLintock Bar Knighth®, Glasgow, Reino Unido); transcurridas las 72 horas, se realizó la lectura midiendo la diferencia en mm del pliegue cutáneo

inoculado con respecto al opuesto, utilizando un calibre de metal, la metodología previamente descrita de aplicación de la tuberculina y de la lectura sigue las normativas de la Resolución de tuberculosis 128/2012 de SENASA (SENASA, 2012). En paratuberculosis, para definir a los animales reactantes a la tuberculina aviar al momento de la lectura, se consideraron a quienes presentaron alguna diferencia en el pliegue cutáneo según lo sugerido por Alvarado Pinedo (2015).

Para el aislamiento de *Map* en materia fecal se recolectaron muestras de los 127 animales. Se colocaron 2 gramos de cada muestra en 30 ml de agua destilada estéril en tubos de polipropileno de 50 ml con tapa a rosca, y se agitó durante 30 segundos para disgregar el material. Transcurridos 30 minutos de reposo en posición vertical para permitir el sedimentación del material fibroso, se transfirieron 5 ml del sobrenadante a otro tubo de polipropileno conteniendo 25 ml de una solución al 0,9 % de cloruro de hexadecilpiridinio (Sigma-Aldrich® Darmstadt, Alemania). Las muestras se incubaron durante 12 horas a 37 °C. Posteriormente, se centrifugaron a 900 g durante 30 minutos, se descartó el sobrenadante y al sedimento se agregó 1 ml de una solución compuesta por caldo infusión cerebro corazón diluido al 50 %, con el agregado de vancomicina 100 mg/ml, ácido nalidíxico 100 mg/ml y nistatina 200 mg/ml. Las muestras se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Por último, se transfirieron 100 µl a un tubo de vidrio con tapa a rosca conteniendo 4 ml de un medio de cultivo líquido con micobactina J (Allied Monitor Inc®, Missouri, Estados Unidos) a razón de 1 mg/l del medio de cultivo (Stabel, 1997; Whittington et al., 2013). Las muestras se incubaron durante 2 meses, con tinciones periódicas de los medios de cultivo líquido, con el método de Ziehl Neelsen para la observación de bacilos ácido alcohol resistentes, compatibles con *Map*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas diagnósticas de PTB bovina de los 127 bovinos estudiados, se seleccionaron 16 animales divididos en un grupo positivo y otro negativo, para realizar la determinación en suero de proteínas mediante colorimetría y electroforesis (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios de selección de los 16 animales analizados para la determinación de proteínas séricas.

Resultados de las pruebas diagnósticas de paratuberculosis	Prueba de ELISA	Prueba intradérmica con PPD aviar	Cultivo de <i>Map</i>
8 positivos	8/8 positivos	6/8 reactantes*	8/8 positivos
8 negativos	8/8 negativos	8/8 no reactantes	8/8 negativos

*Los reactantes a la PPD aviar presentaron diferencias de tamaño de 2 a 6 mm, en el engrosamiento del pliegue cutáneo (Alvarado Pinedo, 2015).

La determinación de proteínas totales y albúmina se realizó mediante colorimetría utilizando el kit comercial Protiz® (Wiener Laboratorios S.A.I.C., Rosario, Argentina), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La electroforesis se realizó sobre cintas de cellogel (2,5x17 cm, 250 µm), sembrándose las muestras con aplicador semimicro (Chemar®, Capital Federal, Argentina). Las cintas se colocaron en una cubeta de electroforesis (Labnet International®, Taiwan) a 35 mA y 200 V en buffer borato-acetato, pH 8,6 (Biopur® S.R.L., Rosario, Argentina) (Heer & Margni, 1971). Finalizada la corrida, las cintas se colorearon con Amido Black 10B, se decoloraron con una solución de agua destilada, ácido acético y metanol 79:79:8,5 ml, se cortaron las distintas fracciones y se realizó su elusión. Luego, se calcularon los valores de las fracciones, relacionándolas con el valor de las proteínas totales.

El análisis estadístico entre los grupos se realizó usando el software R versión 3.2.3 (R Core Team, 2015) con el paquete BEST (Kruschke, 2013), una versión bayesiana de la prueba de T, analizando la distribución posterior de las medias, tomando como diferencias significativas al intervalo de credibilidad bayesiano (ICB) que no contiene al cero.

Resultados

Las proteínas totales en los sueros del grupo negativo al aislamiento de *Map* presentaron una media de 7,7 g% con un ICB de 6,8 a 8,5 g%. El grupo positivo al aislamiento de *Map* presentó valores de 8 g% con ICB de 7,2 a 8,7 g%, con una diferencia entre los sueros de 0,3 g% y un ICB de -0,8 a 1,5 g%; dado que el intervalo contiene al cero, las diferencias se consideran como no significativas.

La albúmina en el grupo negativo presentó valores de 5 g%. En el grupo positivo los valores disminuyeron a 2,8 g% con ICB de 2,6 a 2,9 g%, con una diferencia significativa de -2,2 g% y un ICB de -2,6 a -2,8 g%.

La gammaglobulina en el grupo de sueros procedentes de animales con pruebas diagnósticas negativas, presentaron una media de 1,3 g%. En el grupo de animales positivos la media se ubicó en 3,7 g%, con un aumento significativo de 2,4 g% y un ICB de 1,5 a 3,3 g%. Estos resultados se presentan en la Tabla 2.

La relación albúmina/globulina en el grupo negativo a las pruebas diagnósticas presentó una media de 2. En los sueros positivos la relación disminuyó a 0,5 con una diferencia significativa de -1,5 con un ICB de -2,1 a -0,9 g%, como se muestra en la tabla 2 y en la figura 1, en las que se observa que el cero se encuentra fuera del ICB.

Tanto en las fracciones proteicas beta como en las alfa, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de las diferencias en las fracciones proteicas entre los grupos de animales positivos y negativos a las pruebas diagnósticas de paratuberculosis bovina analizados con estadística bayesiana.

Proteínas séricas	Medias del grupo negativo a PTB (ICB)	Medias del grupo positivo a PTB (ICB)	Diferencia entre las medias (ICB)	Valores de referencia **
Proteínas totales en g%	7,7 (6,8; 8,5)	8 (7,2; 8,7)	0,3 (-0,8;1,5)	6 - 8
Albumina en g%*	5 (4,6;5,4)	2,8 (2,6;2,9)	-2,2 (-2,6; -1,8)*	3 - 4
α -globulinas en g%	0,5 (0,3;0,8)	0,4 (0,2;0,6)	-0,1 (-0,4;0,2)	0,79
β - globulinas en g%	0,7 (0,1;1,3)	0,9 (0,1; 1,7)	0,2 (-0,7; 1,3)	0,96
γ - globulinas en g%*	1,3 (1,1; 1,5)	3,7 (2,8;4,6)	2,4 (1,5;3,3)*	1,97
Relación A/G*	2 (1,4; 2,7)	0,5 (0,4; 0,6)	-1,5 (-2,1;-0,9)*	0,70 - 0,83

* Diferencia significativa debido a que el intervalo de credibilidad bayesiano (ICB) no contiene al 0, tomando al ICB como límite superior e inferior con un 95% de credibilidad. ** De acuerdo con Kaneko *et al.* (2008) y Miceli *et al.* (2014).

Discusión y conclusiones

Debido al carácter crónico de la enfermedad, el diagnóstico de los animales con PTB requiere del empleo de una serie de pruebas diagnósticas repetidas a intervalos regulares (Meyer *et al.*, 2019). La prueba más utilizada para detectar la respuesta inmune humoral representada por los anticuerpos es el ELISA. La mayoría de los animales positivos a esta prueba son asintomáticos (Collins *et al.*, 2005). Sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que los sueros analizados mediante electroforesis presentan diferencias en la composición de las proteínas séricas, con una franca disminución de 2 g% en la fracción de la albúmina en los animales que tienen anticuerpos contra *Map* con respecto a los que no los tienen. La disminución en la albúmina sérica representa probables consecuencias negativas en el desempeño productivo de los animales afectados, como lo demuestra el edema submandibular que suele acompañar a los animales enfermos, a causa de una disminución en la presión oncótica generada por la hipoalbuminemia (Nielsen & Toft, 2008; Whittington *et al.*, 2017). En la fracción de las inmunoglobulinas la diferencia es de 2,4 g% a favor de los animales con anticuerpos contra *Map* a causa de la respuesta inmune de tipo humoral. Esta diferencia en los niveles de la albúmina y las inmunoglobulinas altera la relación albúmina/globulina, generando una disminución significativa de -1,5. Esta proporción resulta de particular interés, ya que su variación es indicativa de disproteinemia; los valores normales se ubican en un rango de 0,70- 0,83 (Kaneko *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 2015). En nuestro estudio, la relación albúmina/globulina en los animales negativos a PTB bovina resultó mayor a los valores normales de referencia. Esto pudo deberse a diversos factores tales como estado general, nutrición, edad, sexo o diferencias metodológicas de las pruebas utilizadas. La PTB bovina es causa de severas lesiones en el íleon y en el colon, causando un síndrome de malabsorción, con disminución de la producción láctea y la ganancia de peso (Sweeney,

2011). En las enfermedades que afectan al tracto gastrointestinal, como la PTB bovina, la relación albúmina/globulina se encuentra alterada por la deficiencia en la albúmina y la respuesta inmune humoral crónica con producción de inmunoglobulinas (Kaneko *et al.*, 2008).

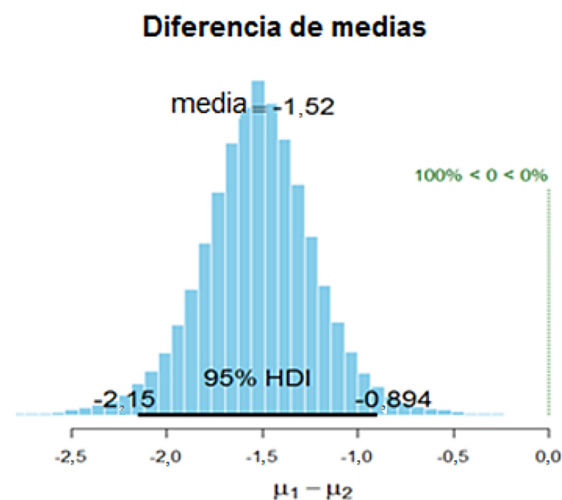


Figura 1. Representación gráfica de la diferencia de medias en la relación albúmina/globulina entre el grupo de animales positivos y negativos a las pruebas diagnósticas de paratuberculosis. La barra horizontal negra representa el 95% HDI (Highest Density Intervals) con sus intervalos de credibilidad bayesiano (ICB) 95% (-2,15, -0,894), el ICB no contiene al cero; μ_1 : media del grupo 1 (positivos a las pruebas diagnósticas), μ_2 : media del grupo 2 (negativos a las pruebas diagnósticas). El 100% de los valores se encuentran a la izquierda del cero, demostrando una disminución significativa en la relación albúmina/globulina.

Cuando se analizaron las proteínas totales, no se encontraron diferencias debido a que la disminución de la albúmina fue compensada con el aumento de la gammaglobulina; las fracciones alfa y beta globulinas no presentaron diferencias con los métodos empleados. Los resultados obteni-

dos en este estudio aportan información original sobre los niveles cuantitativos de las proteínas séricas en los bovinos con PTB, permitiendo correlacionarlos con los distintos estadios de esta enfermedad y con los resultados de las pruebas diagnósticas utilizadas.

En este estudio, los animales expuestos a la infección con *Map*, detectados mediante ELISA y, en 6 de ellos también mediante la reacción a la tuberculina, además fueron eliminadores del agente infeccioso en las heces, tal como lo demuestran los aislamientos a partir de la materia fecal. La presencia de bovinos adultos infectados eliminadores de micobacterias, ponen en riesgo a los animales jóvenes, la categoría más susceptible a la infección. Los programas de control de la enfermedad se basan en el diagnóstico y la segregación de los animales positivos (Roussel, 2011). Si los animales positivos no se excluyen de los establecimientos rurales, se prolonga el tiempo de los programas de control, con las consecuentes pérdidas productivas, los costos derivados de las pruebas diagnósticas y la infección de nuevos individuos (Shrestha *et al.*, 2018). La detección de animales enfermos en los diferentes estadios requiere de la realización e interpretación de varias pruebas diagnósticas. Las pruebas que se utilizan en forma rutinaria en Argentina son el ELISA y la tuberculina aviar por las ventajas operativas que presentan, entre las que se puede mencionar el costo y, para el caso del ELISA, la fácil obtención de las muestras (Costanzo *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos demuestran que los animales detectados mediante estas técnicas, en su mayoría se encuentran eliminando el agente causal y presentan alteraciones en sus proteínas séricas, lo que probablemente afecte en forma negativa la producción, justificando la segregación de los animales positivos.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración del propietario del establecimiento rural utilizado en este estudio. Este estudio fue parcialmente financiado por el Proyecto de Investigación y Desarrollo acreditado por la UNLP V220.

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

Alvarado Pinedo MF. 2015. Posibilidades diagnósticas de la PPD aviar en la paratuberculosis

bovina en animales jóvenes. Tesis doctoral Universidad Nacional de La Plata. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/48228>

Collins MT, Wells SJ, Petrini KR, Collins JE, Schultz RD, Whitlock RH. 2005. Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 12(6):685-92. doi: 10.1128/CDLI.12.6.685-692.2005

Costanzo G, Pinedo FA, MonML, Viale M, Gil A, Illia MC, Gioffré A, Arese A, Travería G, Romano MI. 2012. Accuracy assessment and screening of a dairy herd with paratuberculosis by three different ELISAs. *Veterinary Microbiology*. 156(1-2):183-8. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.10.029

Donat K, Erhardt G, Soschinka A, Brandt HR. 2014. Decreased serum protein associated with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* shedding in German Holstein cows. *Veterinary Record*. 174(16):408. doi: 10.1136/vr.101957

Gautam M, Ridler A, Wilson PR, Heuer C. 2018. Control of clinical paratuberculosis in New Zealand pastoral livestock. *New Zealand Veterinary Journal*. 66(1):1-8. doi: 10.1080/00480169.2017.1379914

Heer E, Margni R. 1971. Electro e inmunoelectroforesis. Manual de laboratorio e interpretaciones fundamentales. Buenos Aires, Gumersindo F. Fernández.

Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. 1997. Serum proteins and the dysproteinemias. En: Kaneko JJ (Ed): *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5ta Ed. London, Academic Press, pp. 117-38.

Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6ta Ed. London. Academic Press.

Koets AP, Eda S, Sreevatsan S. 2015. The within host dynamics of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in cattle: where time and place matter. *Veterinary Research*. 46(1):61. doi: 10.1186/s13567-015-0185-0

Kruschke JK. 2013. Bayesian estimation supersedes the t test. *Journal of Experimental Psychology*. 142(2):573-603. doi: 10.1037/a0029146

Meyer A, McAloon CG, Tratalos JA, More SJ, Citer LR, Graham DA, Sergeant ESG. 2019. Modeling of alternative testing strategies to demonstrate freedom from *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in test-negative dairy herds in the Republic of Ireland. *Journal of Dairy Science*. 102(3):2427-42. doi: 10.3168/jds.2018-14883

Miceli G, Bonzo E, Fontana L. 2014. Electroforesis en acetato de celulosa: comparación de resultados. XX Reunión Científica y Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico. Tucumán, Argentina, p. 57.

Mortier RA, Barkema HW, De Buck J. 2015. Susceptibility to and diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy calves: A review. Preventive Veterinary Medicine. 121(3-4):189-98.
doi: [10.1016/j.prevetmed.2015.08.011](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.08.011)

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)

Nagy O, Tothová C, Nagyova V, Kovac G. 2015. Comparison of serumprotein electrophoretic pattern in cow and small ruminants. Acta Veterinaria Brno. 84:187-195.
doi: [10.2754/avb201584020187](https://doi.org/10.2754/avb201584020187)

Over K, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. 2011. Current perspectives on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Johne's disease, and Crohn's disease: a review. Critical Reviews in Microbiology. 37(2):141-56.
doi: [10.3109/1040841X.2010.532480](https://doi.org/10.3109/1040841X.2010.532480)

Park HT, Yoo HS. 2016. Development of vaccines to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. Clinical and Experimental Vaccine Research. 5(2):108-16.
doi: [10.7774/cevr.2016.5.2.108](https://doi.org/10.7774/cevr.2016.5.2.108)

R Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

Roussel AJ. 2011. Control of paratuberculosis in beef cattle. Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice. 27(3):593-8.
doi: [10.1016/j.cvfa.2011.07.005](https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.005)

SENASA 2012. Disponible en: http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/INFORMACION/NORMATIVA/RESOL_Y_ANEXOS/reso_128_articulos_1-107.pdf. [Consultado 16/02/2019]

Shrestha S, Vosough Ahmadi B, Barratt AS, Thomson SG, Stott AW. 2018. Financial vulnerability of dairy farms challenged by Johne's disease to changes in farm payment support.

Frontiers in Veterinary Science. 5:316.
doi: [10.3389/fvets.2018.00316](https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00316)

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)

Sweeney RW. 2011. Pathogenesis of paratuberculosis. Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice. 27(3):537-46.
doi: [10.1016/j.cvfa.2011.07.001](https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2011.07.001)

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)

Tothova C, Nagy O, Kovac G. 2016. Serum proteins and their diagnostic utility in veterinary medicine: a review. Veterinarni Medicina. 61(9):475-96.
doi: [10.17221/19/2016-VETMED](https://doi.org/10.17221/19/2016-VETMED)

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)

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)

Whittington RJ, Begg DJ, de Silva K, Purdie AC, Dhand NK, Plain KM. 2017. Case definition terminology for paratuberculosis (Johne's disease). BMC Veterinary Research. 13(1):328.
doi: [10.1186/s12917-017-1254-6](https://doi.org/10.1186/s12917-017-1254-6)

You Q, Verschoor CP, Pant SD, Macri J, Kirby GM, Karrow NA. 2012. Proteomic analysis of plasma from Holstein cows testing positive for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Veterinary Immunology and Immunopathology. 148(3-4):243-51.
doi: [10.1016/j.vetimm.2012.05.002](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.05.002)

Detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* en perros en contacto con zona rural. Aspectos zoonóticos de la infección

Detection of antibodies against *Brucella abortus* in dogs in contact with rural areas. Zoonotic aspects of the infection

MICELI GRACIELA SARA¹ , PÉREZ MEYER LAUTARO² , PERALTA LUIS MARÍA³,
MÓRTOLA EDUARDO CARLOS^{1,*} 

1. Cátedra de Inmunología Veterinaria Aplicada. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP). 2. Profesional independiente. La Plata. Argentina. 3. Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias (CEDIVE). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

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

Resumen

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa zoonótica de curso crónico y de distribución mundial. En los perros suele ser causada por *B. canis*; sin embargo, la *B. abortus*, asociada con el bovino infectado ha sido descrita en perros, tanto en la forma experimental como en condiciones de campo. La transmisión de perros a humanos también es posible. En esta comunicación se describe, por primera vez, en Argentina, la detección de anticuerpos contra *B. abortus* en una población de perros en contacto con zonas rurales. Se analizaron 67 muestras de sueros de perros, de los cuales 26,8 % fueron positivos para *B. abortus* mediante la técnica de aglutinación con antígeno tamponado, 7,5 % se confirmaron como positivos mediante las pruebas de aglutinación lenta en tubos y 4,5 % resultaron positivos mediante la prueba de fluorescencia polarizada. Los perros reaccionantes a *B. abortus* tuvieron contacto con ganado bovino seropositivo a brucelosis o eran perros de zona urbana que convivían con perros que habían concurrido a la zona rural. La eliminación de bovinos seropositivos no necesariamente puede erradicar la brucelosis. Se necesitarían más acciones de manejo para lograrlo, como evitar el contacto directo con perros e impedir la transmisión entre especies.

Palabras clave

Brucella abortus, perros, zoonosis, Argentina

Abstract

Brucellosis is a zoonotic-contagious disease, usually of chronic evolution and worldwide distribution. Dog's infection is typically caused for *B. canis*; however, *B. abortus*, associated with infected cattle has been described in dogs, both experimentally and in field conditions. The transmission of dogs to humans is also possible. This communication describes, for the first time in Argentina, the detection of antibodies against *B. abortus* in a population of dogs in contact with rural areas. Sixty-seven samples of dog sera were analyzed, of which 26.8 % were positive for *B. abortus* by means of the agglutination technique with buffered antigen, 7.5 % were confirmed as positive by tests of slow agglutination in tubes and 4.5 % were positive by polarized fluorescence test. Dogs reacting to *B. abortus* had contact with seropositive cattle with brucellosis or were urban dogs that lived with dogs that had attended the rural area. Elimination of infected cattle may not necessarily eradicate brucellosis; management actions such as avoiding the contact of dogs from infected cows should prevent its transmission.

Key words

Brucella abortus, dogs, zoonoses, Argentina

Fecha de recepción: 12/04/2019

Fecha de revisión: 13/05/2019

Fecha de aprobación: 26/0/2019

ANALECTA VET 2019; Julio-Diciembre; 39(2):8-14

Impresa ISSN 03655 14-8 Electrónica ISSN 1514-2590

doi.org/10.24215/15142590e038

Introducción

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico y de distribución mundial, que afecta tanto al hombre como a los animales domésticos, la fauna silvestre y los mamíferos marinos. Las bacterias del género *Brucella* incluyen 11 especies reconocidas (Whatmore, 2009; Whatmore *et al.*, 2014). Las cepas lisas son: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ceti*, *B. pinnipedialis*, *B. microti*, *B. inopinata* y *B. papionis* y las cepas rugosas son: *B. ovis* y *B. canis* (Nicola & Elena, 2009). Las cepas de campo de *B. canis* son siempre rugosas y tienen crecimiento de tipo mucoide (M+) después de varios días de incubación, especialmente en medios con pH 7,2. Si la bacteria desarrolla en medios con pH menor a 6,5 se obtienen variantes M-. Las variantes M- tienen una virulencia reducida, los animales se mantienen asintomáticos y la respuesta inmune evaluada mediante pruebas serodiagnósticas es más débil, especialmente si se utiliza *B. ovis* como antígeno (Carmichael *et al.*, 1984a; 1984b).

Esta enfermedad es particularmente contagiosa y es posible la transmisión cruzada de especies de *Brucella* spp. (Olsen & Palmer, 2014). Todos los biovars de *B. abortus* y *B. melitensis* y los biovars 1, 3 y 4 de *B. suis* son patógenos para el ser humano (Godfroid *et al.*, 2002; Maudlin *et al.*, 2009). Por lo tanto, es considerada zoonosis, con carácter ocupacional, manifestándose en el hombre con fiebre, mialgias, cefalea, dermatitis, linfadenopatías y, ocasionalmente, poliartritis (Acha & Szyfres, 2001). Sin embargo, aunque es zoonótica, *B. canis* es menos reconocida como tal (Krueger *et al.*, 2014).

La brucelosis en perros fue reportada en todo el mundo, siendo endémica en América, Asia y África, donde los estudios serológicos en numerosos países establecieron una gama de seropositividad del 1 al 28 % (McDermott *et al.*, 2013). En perros, la enfermedad tiene como principal agente etiológico a *B. canis* (Carmichael & Greene, 1998), pero hay informes de contagio por *B. abortus*, *B. suis* y *B. melitensis* (Barr *et al.*, 1986; Bicknell *et al.*, 1976; Prior, 1976; Miranda *et al.*, 2005; Sandoval *et al.*, 1976).

La infección natural de perros por *B. abortus* es de ocurrencia esporádica y resulta del contacto estrecho del animal, generalmente de zona rural, con bovinos infectados. Esto ocurre habitualmente por ingestión de tejido animal, restos placentarios o fetos abortados contaminados con la bacteria (Azevedo *et al.*, 2003; Carmichael & Greene, 1998; Miranda *et al.*, 2005). Los caninos parecen ser más resistentes a *Brucella* spp. lisas, siendo raras las manifestaciones clínicas derivadas de la enfermedad, aunque, en asociación con bacteriemia transitoria, algunos animales pueden presentar linfadenopatías y otras manifestaciones de la infección (Azevedo *et al.*, 2003). Luego del contacto con la *Brucella*, los anticuerpos se hacen detectables a partir de las dos semanas

posinfección (Johnson *et al.*, 1983). En forma similar a todas las afecciones por *Brucella* spp., en la primera fase de la respuesta humoral predomina la IgM, la que va siendo paulatinamente superada por la IgG; esta predomina en la respuesta crónica (Carmichael *et al.*, 1984a, 1984b).

La identificación de los perros enfermos es de suma importancia porque constituyen fuentes de contaminación, ya que pueden eliminar el agente infeccioso por orina, semen, secreciones vaginales, fetos abortados o heces (Baek *et al.*, 2003; Forbes, 1990). La presencia y persistencia de *B. abortus* en descargas vaginales de perras por un lapso superior a los 42 días después del parto o aborto fue descrita por Baek *et al.* (2003). Esta descarga, junto con restos de abortos de las perras enfermas, es el material de mayor riesgo en la transmisión del agente a los propios perros y animales de producción (Forbes, 1990).

El diagnóstico de laboratorio para *B. canis* rutinariamente incluye la prueba de aglutinación rápida en portaobjetos (RSAT) y la inmunodifusión en gel de agar (AGID) (Robles, 1998). Estas dos pruebas presentan disminución de la especificidad dado que los antígenos de superficie de *Brucellas* rugosas reaccionan en forma cruzada con los anticuerpos producidos por otras especies de bacterias no patógenas (Shin & Carmichael, 1999). Debido a esto, se han mejorado las técnicas diagnósticas, implementándose una RSAT que utiliza un antígeno M-, una AGID que utiliza antígenos proteínicos citoplasmáticos y pruebas de ELISA e inmunofluorescencia. El uso de un antígeno proveniente de una variante M- de *B. canis*, en reemplazo del antígeno de *B. ovis*, reduce la tasa de falsos positivos. Para el diagnóstico de *B. abortus*, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) establece, como oficiales, las siguientes técnicas: aglutinación con antígeno tamponado (BPA), seroaglutinación lenta en tubo (SAT) o prueba de Wright, de 2-mercapto-etanol (2-Me), fluorescencia polarizada (FPA), fijación de complemento (FC), ELISA-I (indirecto) y ELISA-C (competición) (Nielsen, 2002).

Si bien existe una comunicación que informa sobre la presencia de anticuerpos contra *B. abortus* en perros del conurbano sur bonaerense (Eiras *et al.*, 2014), hasta la fecha no se conocen datos epidemiológicos sobre la infección humana por *B. abortus* a través de los mismos. El objetivo de este trabajo fue detectar, en sueros de perros del sudoeste de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, la presencia de anticuerpos contra *B. abortus*, haciendo hincapié en el posible impacto zoonótico de esta enfermedad.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo y observacional, empleando 67 muestras de sangre de caninos, con propietario, recolectados por el Laboratorio Coronel Suárez, de Coronel Suárez, en

el sudoeste de la Provincia de Buenos Aires, durante los años 2017 y 2018. Los propietarios dieron su consentimiento para la toma de la muestra. La muestra estaba compuesta por 35 animales que habitaban en zona rural, 29 animales que habitaban en zona urbana, pero que concurrían asiduamente al campo transportados por sus dueños, y 3 animales que habitaban en zona urbana y convivían con perros que concurrían al campo.

Se obtuvieron entre 3 y 5 ml de sangre de la vena yugular externa o cefálica antebraquial, se separó el suero y se conservó congelado a -20 °C hasta el momento de su procesamiento. La información de cada animal (sexo, edad y hábitos de vida) se registró en una planilla Excel® confeccionada para tal fin.

Para detectar anticuerpos anti *B. canis* se efectuó la prueba rápida, cualitativa de RSAT, de acuerdo con las recomendaciones de Carmichael & Joubert (1987), incluyendo en cada portaobjetos un suero control positivo. El antígeno fue producido por el SENASA utilizando la cepa *B. canis* M-, coloreado con Rosa de Bengala y sin 2-Me. La técnica se realizó utilizando 10 µl de suero y 10 µl de antígeno. La lectura se realizó a los 2 minutos, considerándose positiva cuando hubo presencia de grumos y negativa cuando la mezcla manifestó turbidez homogénea sin grumos.

Para detectar anticuerpos anti *B. abortus* se realizó, en primer término, la prueba de BPA (aglutinación rápida), de acuerdo con los procedimientos estandarizados (Alton *et al.*, 1988) y con antígeno producido por SENASA, ya que es la prueba tamiz oficialmente aceptada en la Argentina para el diagnóstico de brucelosis bovina. Se utilizaron 80 µl de suero y 30 µl de antígeno y la lectura se realizó a los 8 minutos. En caso de resultados negativos (turbidez homogénea) no se realizó ninguna otra prueba y en caso de resultados positivos (aparición de grumos) se realizaron las pruebas confirmatorias de SAT, 2-Me y FPA, de acuerdo a las indicaciones del Manual de diagnóstico serológico de la brucelosis bovina del SENASA del año 2009 (Nicola & Elena, 2009).

Las pruebas de SAT y 2-Me son cuantitativas de aglutinación lenta en tubo. Para la prueba de SAT, con la que se determinó IgG e IgM, se utilizaron 4 diluciones de suero en solución salina fenolada (1/25, 1/50, 1/100 y 1/200). Para la prueba de 2-Me, se realizaron las mismas diluciones en solución salina con 2-Me y solo se determinó IgG, ya que el compuesto con radical tiol produce alteraciones en los enlaces disulfuros y genera un impedimento estérico sobre las IgM, quedando monómeros que no tienen capacidad de aglutinar. La lectura de la reacción para ambas técnicas se realizó a las 40-48 horas y el grado de aglutinación fue definido como: a) completo: unión antígeno/anticuerpo (mezcla) con líquido límpido y sin ruptura de grumos ante la agitación suave; b) incompleto: mezcla parcialmente turbia en la que la leve agitación no produjo ruptura de

los grumos; c) negativo: mezcla turbia en la que ante la agitación no se observaron grumos.

Para la prueba de FPA, se utilizó un antígeno que consiste en un pequeño fragmento de peso molecular promedio de 22 kD, de O-polisacárido del lipopolisacárido de *B. abortus* 1119-3, conjugado con isotiocianato de fluoresceína. El mismo se incubó con una dilución 1/100 de suero (10 µl de suero en 990 µl de solución tamponada de fosfatos). A los dos minutos se realizó la lectura de los resultados en un analizador fluorescente (Sentry 100, Diachemix DLL, EE. UU.) y se expresaron en unidades de milipolarización (mP), siendo negativos los valores ≤ 94 mP, sospechosos aquellos entre 94-105 mP y positivos los ≥ 105 mP.

Resultados

La población analizada consistió en 67 perros (31 hembras y 36 machos) con un promedio de edad de 4,5 años (rango 1 a 10) en las hembras y de 4,6 años (rango 1 a 11) en los machos.

En referencia a la prueba tamiz de BPA, 18 de los 67 sueros (26,8 %) fueron positivos y la reactividad fue de 36 % (13/36) entre los machos y de 16 % (5/31) entre las hembras. Utilizando los criterios de interpretación de resultados para bovinos no vacunados, los resultados obtenidos a partir de los animales positivos a la prueba tamiz y analizados por las pruebas confirmatorias se muestran en la Tabla 1.

Solo 2 de los animales resultaron positivos a la prueba de RSAT para *B. canis* y uno de ellos resultó también positivo a la prueba de BPA (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados obtenidos mediante pruebas diagnósticas de brucelosis, aplicadas a los sueros detectados positivos, utilizando la prueba de antígeno tamponado en placa (BPA). Se detallan los valores hallados mediante las técnicas confirmatorias.

Muestra	SAT	2-ME	FPA mP	RSAT	Hábito de vida
3	N	N	N	N	R
13	N	N	N	N	R
14	N	N	N	N	U/R
18	N (1/25)	N	N	N	U/R
20	P (1/100)	P (1/100)	P (194,8)	N	R
21	N (1/50)	N	N	N	U/R
22	N	N	N	N	R
23	N	N	N	N	R
24	N (1/25)	N	N	N	U/R
25	S (1/100)	N	S (97,3)	P	R
26	N	N	N	N	U/R
27	N	N	N	N	R
28	N	N	N	N	R
29	S (1/100)	N	S (100,75)	N	U/R
31	P (1/200)	P (1/200)	P (223)	N	U/R
38	N (1/25)	N	N	N	R
40	P (1/200)	N	P (193)	N	U
46	N (1/25)	N (1/25)	N	N	R

P= positivo; N=negativo; S=sospechoso; U=urbano; U/R=urbano y rural; R=rural.

Discusión y conclusiones

Las cepas de *Brucella* lisas (*B. abortus*, *B. suis* o *B. melitensis*) expresan la cadena lateral O inmunodominante en el lipopolisacárido de su superficie. Esto hace que esta cadena lateral forme la base antigénica de las pruebas de diagnóstico BPA, SAT y 2-ME, pudiendo, de esta manera, detectarse especies lisas. Las pruebas para especies de *Brucella* rugosas, como *B. canis*, difieren de las pruebas para *Brucella* lisas, ya que *B. canis* no contiene la cadena lateral O en su superficie y la prueba RSAT es la que se emplea para su análisis serológico. Por lo tanto, no es posible que los perros infectados por *B. canis* resulten positivos para la prueba de *B. abortus* y viceversa (Mateu-de-Antonio *et al.*, 1994).

Para realizar estudios en caninos, no se ha diseñado ni estandarizado, hasta el momento, ningún ensayo que permita el diagnóstico indirecto de la infección con especies de *Brucella* lisas. Los métodos serológicos empleados para la detección de la enfermedad son los mismos que se aplican en los bovinos, no existiendo criterios uniformes para su utilización en perros (McGiven *et al.*; 2003; Nicola & Elena, 2009; Nielsen *et al.*, 2005; Vargas, 2002). Las pruebas serológicas oficiales en nuestro país para la especie bovina han sido establecidas por el SENASA en la Resolución 438/2006 (Nicola & Elena, 2009). La prueba de FPA es una prueba de referencia internacional y es utilizada en caso de ser necesario corroborar un resultado (Araoz *et al.*, 2014). No existen antecedentes sobre el uso de FPA en perros. Los datos de este trabajo, podrían constituir, en un futuro, una herramienta útil de diagnóstico, si se establece el punto de corte y la concordancia con las pruebas clásicas de SAT y 2-Me en la especie canina.

En este estudio se halló que del 26,8% de las muestras positivas a la prueba tamiz de BPA, solo el 7,5% fue confirmado mediante SAT y 2-ME (con resultados mayores o iguales a 1/100) y reconfirmado mediante la prueba de FPA. La presencia de falsos positivos a la prueba de BPA puede deberse a reacciones cruzadas con otras bacterias gram negativas que comparten un lipopolisacárido superficial similar al que presenta *Brucella* (Gall *et al.*, 2006; Godfroid *et al.*, 2002). Estas interacciones han sido estudiadas minuciosamente en los bovinos (Mainar-Jaime *et al.*, 2005), por lo que es factible que en los caninos también sean causa importante de interferencia en el diagnóstico de brucelosis.

El análisis de la información obtenida de cada animal mostró que los perros de zona rural seropositivos a *B. abortus* vivían próximos al ganado vacuno diagnosticado positivo de acuerdo a los procedimientos establecidos en la Resolución 438/2006 de SENASA, y podían tener acceso a fetos abortados y placentas de vacas infectadas. En el caso de los perros de zona urbana, estos convivían con perros que concurrían asiduamente al campo. Las descargas vaginales del ganado

positivo a *B. abortus* persisten por más de 40 días después del aborto o parto y se convierten en una fuente de infección para perros (Moreno, 2014). La dosis infecciosa para perros es de aproximadamente 106 a 1010 organismos/g (Pidgeon, 1987). La seroconversión en perros infectados por *B. abortus* puede ocurrir entre 5 y 20 días después de la infección y ha sido reportada la diseminación de *Brucella* spp. en el medio ambiente a través de la orina o heces (Pidgeon, 1987). Esta vía podría explicar la infección de los perros de zona urbana que no han concurrido al campo y que podrían haberse infectado al ingerir o tomar contacto con fómites o materiales biológicos, tales como heces u orina contaminadas con *Brucella* spp. de los perros de zona urbana y que concurren al campo.

Según la legislación vigente en Argentina, el ganado seropositivo a brucelosis debe eliminarse bajo un programa de vigilancia para evitar la propagación de la enfermedad. Hasta el momento, no hay evidencias que reporten que los perros desempeñen un papel epidemiológico activo en la transmisión de *B. abortus* a humanos o al ganado. Si bien la brucelosis en caninos no es parte del programa de vigilancia, los perros podrían desempeñar el papel de hospedadores reservorios para *B. abortus*. Esta fuente de transmisión no debe ser subestimada, ya que la transmisión cruzada de especies de *Brucella* spp. es posible (Olsen & Palmer, 2014). Existen reportes de la transmisión esporádica de *B. canis* de los perros domésticos al ser humano (Hensel *et al.*, 2018). Además, otro informe describe la detección de *B. suis* en perros, advirtiendo sobre la posible transmisión al humano (Ramamoorthy *et al.*, 2011).

Debido a que *B. abortus* es más patógena para los seres humanos que *B. canis*, las personas con sospecha de brucelosis y en contacto con perros de zona rural o perros de zona urbana pero que concurren al campo, deberían someterse a análisis para descartar o confirmar la presencia de anticuerpos anti-*Brucella*. Pese a que el riesgo de transmisión parece ser leve, los perros infectados por *B. abortus* tienen el potencial de infectar el ganado vacuno y podrían ser una amenaza en la cadena de transmisión de esta enfermedad, lo cual podría tener consecuencias económicas desfavorables. La eliminación del ganado reactor no necesariamente puede erradicar la enfermedad, pero la eliminación de los perros que se hallan en contacto con rodeos infectados, podría ayudar al control de la misma. Durante los programas de erradicación, las pruebas serológicas de perros para *B. abortus* pueden ser un indicador valioso (centinela) de la presencia de brucelosis en el ganado bovino (Moreno, 2014).

La ingestión de productos lácteos contaminados es el mayor riesgo de infección por *Brucella* en áreas endémicas (Kose *et al.*, 2014). Sin embargo, no se debe subestimar la transmisión potencial de *B. abortus* a humanos por perros que se han infectado por haber estado en contacto

directo o indirecto con vacas infectadas.

Se estima que más del 60 % de los patógenos humanos están relacionados con animales, y la incidencia de una enfermedad se ve afectada por factores ambientales, por lo que diferentes enfoques son válidos para reducir la incidencia de enfermedades zoonóticas (Cutler *et al.*, 2010). Uno de estos enfoques podría ser el concepto de “una salud”, aunque nunca antes se ha aplicado a la transmisión zoonótica de *B. abortus* a través de caninos (Day, 2011). Existe la necesidad de crear un marco conceptual para las enfermedades zoonóticas en caninos, aunque el concepto de “una salud” se ha discutido para las enfermedades emergentes con potencial pandémico (Godfroid *et al.*, 2013; Uçan & Aras, 2015). En otras palabras, el potencial zoonótico de las infecciones de los perros, con la excepción de la rabia, ha sido ignorado en gran medida en todo el mundo. Por lo tanto, zoonosis como brucelosis (incluyendo el tipo canino), la equinococosis, la rabia y algunas otras, continúan afectando significativamente la salud humana (Moreno, 2014). Las principales razones para ello son el contacto cercano con los animales al compartir el mismo entorno y las deficiencias en los recursos financieros para controlarlos principalmente en países en vías de desarrollo.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Laboratorio de Inmunología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, y es parte del Trabajo Final Integrador de la Carrera de Especialización en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio del Med. Vet. Lautaro Pérez Meyer.

Conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses que declarar.

Bibliografía

Acha PN, Szyfres B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Brucellosis. 3° Ed. Washington: OPS/OMS, pp. 28-56 (Publicación Científica y Técnica, 580).

Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. 1988. Techniques for the brucellosis Laboratory. Institute National de la Recherche Agronomique (INRA). Paris, p. 190.

Araoz L, Cruz ML, González del Pino F, Jorrot JJ, de la Vega AC. 2014. Estudio comparativo de distintas técnicas serológicas para el diagnóstico de brucelosis equina. Revista Agronómica del Noroeste Argentino. 34(2):177-9.

Azevedo SS, Batista CSA, Alves CJ, Clementino LJ. 2003. Ocorrência de anticorpos contra *Brucella abortus* em cães errantes da cidade de Patos, Estado da Paraíba, Brasil. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo. 70(4):499-500.

Baek BK, Lim CW, Rahman MS, Kim CH, Oluoch A, Kakoma I. 2003. *Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs. Canadian Journal of Veterinary Research. 67(4):312-4.

Barr SC, Eilts BE, Roy AF, Miller R. 1986. *Brucella suis* biotype 1 infection in a dog. Journal of the American Veterinary Medical Association. 189(1): 686-7.

Bicknell SR, Bell RA, Richards PA. 1976. *Brucella abortus* in the bitch. Veterinary Record. 99(5):85-6. doi: 10.1136/vr.99.5.85

Carmichael LE, Zoha SJ, Flores-Castro R. 1984a. Biological properties and dog response to a variant (M-) strain of *Brucella canis*. Developments in Biological Standardization. 56:649-56.

Carmichael LE, Zoha SJ, Flores-Castro R. 1984b. Problems in the serodiagnosis of canine brucellosis: dog responses to cell wall and internal antigens of *Brucella canis*. Developments in Biological Standardization. 56:371-83.

Carmichael LE, Joubert JC. 1987. A rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism as antigen. Cornell Veterinarian. 77(1):3-12.

Carmichael LE, Greene CE. 1998. Canine Brucellosis. En: Greene, C.E. (Ed). Infectious diseases of the dog and cat. 2° Ed. Philadelphia, W.B. Saunders, pp. 248-57.

Cutler SJ, Fooks AR, van der Poel WHM. 2010. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. Emerging Infectious Diseases. 16(1):1-7. doi: 10.3201/eid1601.081467

Day M. 2011. One health: the importance of companion animal vector-borne diseases. Parasites & Vector. 4:49-55. doi: 10.1186/1756-3305-4-49

Eiras DF, Scodellaro C, Vezzani D, López G, Boero C, Sánchez R. 2014. Diagnóstico serológico de brucelosis en perros del conurbano sur bonaerense. Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes 9(2):26-7.

Forbes LB. 1990. *Brucella abortus* infection in 14 farm dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association. 196(6):911-6.

- Gall D, Nielsen K, Bermúdez RM, Muñoz Del Real MC, Halbert G, Groulx R, Moreno F, Chow EY, Checkley SL. 2006. Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detecting equine serum antibodies to the lipopolysaccharide of *Salmonella abortus equi*. *Research in Veterinary Sciences*. 81(2):215-7. doi: [10.1016/j.rvsc.2005.11.004](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.11.004)
- Godfroid J, Saegerman C, Wellemans V. 2002. How to substantiate eradication of bovine brucellosis when aspecific serological reactions occur in the course of brucellosis testing. *Veterinary Microbiology*. 90(1-4):461-77. doi: [10.1016/S0378-1135\(02\)00230-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00230-4)
- Godfroid J, Al Dahouk S, Pappas G, Roth F, Matope G, Muma J, Marcotty T, Pfeiffer D, Skjerve E. 2013. A “One Health” surveillance and control of brucellosis in developing countries: moving away from improvisation. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 36(3): 241-8. doi: [10.1016/j.cimid.2012.09.001](https://doi.org/10.1016/j.cimid.2012.09.001)
- Hensel ME, Negron M, Arenas-Gamboa, AM. 2018. Brucellosis in dogs and public health risk. *Emerging Infectious Diseases*. 24(8):1401-6. doi: [10.3201/eid2408.171171](https://doi.org/10.3201/eid2408.171171)
- Johnson CA, Bull RW, Schirmer RG. 1983. Peripheral lymphocyte function in dogs with *Brucella canis* infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 4(4):425-31.
- Kose S, Serin Senger S, Akkoçlu G, Kuzucu L, Ulu Y, Ersan G, Ouz F. 2014. Clinical manifestations, complications, and treatment of brucellosis: evaluation of 72 cases. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 44(2):220-3. doi: [10.3906/sag-1112-34](https://doi.org/10.3906/sag-1112-34)
- Krueger WS, Lucero NE, Brower A, Heil GL, Gray GC. 2014. Evidence for unapparent *Brucella canis* infections among adults with occupational exposure to dogs. *Zoonoses Public Health* 61(7): 509-18. doi: [10.1111/zph.12102](https://doi.org/10.1111/zph.12102)
- Mainar-Jaime RC, Muñoz PM, de Miguel MJ, Grilló MJ, Marín CM, Moriyón I, Blasco JM. 2005. Specificity dependence between serological tests for diagnosing bovine brucellosis in *Brucella*-free farms showing false positive serological reactions due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *The Canadian Veterinary Journal*. 46(10):913-6.
- Mateu-de-Antonio EM, Martin M, Casal J. 1994. Comparison of serologic tests used in canine brucellosis diagnosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 6(2):257-9. doi: [10.1177/104063879400600220](https://doi.org/10.1177/104063879400600220)
- Maudlin I, Eisler MC, Welburn SC. 2009. Neglected and endemic zoonoses. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 364(1530):2777-87. doi: [10.1098/rstb.2009.0067](https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0067)
- McDermott J, Grace D, Zinsstag J. 2013. Economics of brucellosis impact and control in low-income countries. *Revue Scientifique et Technique*. 32(1):249-61.
- McGiven JA, Tucker JD, Perrett LL, Stack JA, Brew SD, MacMillan AP. 2003. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA. *Journal of Immunological Methods*. 278(1-2):171-8. doi: [10.1016/S0022-1759\(03\)00201-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(03)00201-1)
- Miranda KL, Cottorello ACP, Poester FP, Lage AP. 2005. Brucelose canina. En: *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia. Conselho Regional de Medicina Veterinária de Minas Gerais, Brasil (Editores)*. n.47, pp. 66-82.
- Moreno E. 2014. Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in Microbiology*. 13(5):213. doi: [10.3389/fmicb.2014.00213](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00213)
- Nicola A, Elena S. 2009. Manual de diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Buenos Aires, Argentina. p. 95.
- Nielsen K. 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. *Veterinary Microbiology*. 90(1-4):447-59. doi: [10.1016/S0378-1135\(02\)00229-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00229-8)
- Nielsen K, Smith P, Yu W, Nicoletti P, Elzer P, Robles C, Bermúdez R, Renteria T, Moreno FS, Ruiz A, Massengill C, Muenks Q, Jurgensen G, Tollersrud T, Samartino L, Conde S, Forbes L, Gall D, Perez B, Rojas X, Minas A. 2005. Towards single screening tests for brucellosis. *Revue Scientifique et Technique*. 24(3):1027-37.
- Olsen SC, Palmer MV. 2014. Advancement of knowledge of *Brucella* over the past 50 years. *Veterinary Pathology* 51(6):1076-89. doi: [10.1177/0300985814540545](https://doi.org/10.1177/0300985814540545)
- Pidgeon GL, Scanlan CM, Miller WR, Mayer TW. 1987. Experimental infection of dogs with *Brucella abortus*. *The Cornell Veterinarian*. 77(4):339-47.
- Prior MG. 1976. Isolation of *Brucella abortus* from two dogs in contact with bovine brucellosis. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 40(1): 117-8.
- Ramamoorthy S, Woldemeskel M, Liggett A, Snider R, Cobb R, Rajeev S. 2011. *Brucella suis* infection in dogs, Georgia, USA. *Emerging Infectious Diseases*. 17(12):2386-87. doi: [10.3201/eid1712.111127](https://doi.org/10.3201/eid1712.111127)

Robles, CA.1998. Evaluación de una técnica de doble difusión en gel de agar para el diagnóstico de la infección por *Brucella ovis* en carneros. Veterinaria Argentina. Vol XV(142):119-24.

Sandoval LA, Conrado Ribeiro LO, Amaral LBS, Feitosa MH, Bazan JM. 1976. Incidência da Brucelose canina na Cidade de São Paulo. Biológico, v.42, pp.128-32.

Shin SJ, Carmichael L. 1999. Canine brucellosis caused by *Brucella canis*. En: Carmichael L. Ed. Recent advances in canine infectious diseases. Ithaca, IVIS (www.ivis.org) A0101.1199.

Uçan US, Aras Z. 2015. The “One Health” concept and a need for national monitoring of canine and feline infections. En: Proceedings of the 1st Turkish Congress of One Health. Konya, Turkey, pp. 61-2.







Vargas F. 2002. Brucellosis in Venezuela. Veterinary Microbiology. 90(1-4):39-44. doi: [10.1016/S0378-1135\(02\)00243-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00243-2)

Whatmore AM. 2009. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. Infection, Genetics and Evolution. 9(6):1168-84. doi: [10.1016/j.meegid.2009.07.001](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.07.001)

Whatmore AM, Davison N, Cloeckaert A, Al Dahouk S, Zygmunt MS, Brew SD, Perrett LL, Koylass MS, Vergnaud G, Quance C, Scholz HC, Dick EJ Jr, Hubbard G, Schlabritz-Loutsevitch NE. 2014. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 64(12):4120-8. doi: [10.1099/ijs.0.065482-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.065482-0)

Estudios histopatológicos y seguimiento clínico de sarcomas felinos asociados a sitios de inoculación

Histopathological studies and clinical follow-up of feline injection-site sarcomas

SANTELICES IGLESIAS OLGA ANDREA^{1*} , WRIGHT CAROLINA¹, DUCHENE ADRIANA GRACIELA², RISSO MIGUEL ATILIO³, RISSO PAULA³ , ZANUZZI CAROLINA NATALIA^{1,4} , NISHIDA FABIÁN^{1,4} , LAVID ANGÉLICA³, PORTIANSKY ENRIQUE LEO^{1,5} , GIMENO EDUARDO JUAN^{1,5}, BARBEITO CLAUDIO GUSTAVO^{4,5} 

1. Laboratorio de Análisis de Imágenes, Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad Nacional de La Plata (UNLP). 2. Hospital Escuela, FCV, Universidad Nacional de Buenos Aires. 3. Departamento de Epizootiología y Salud Pública, FCV, UNLP. 4. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). 5. Laboratorio de Histología Descriptiva Experimental y Comparada y Embriología, FCV, UNLP. Argentina

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

Resumen

Los sarcomas asociados a sitios de inoculación son neoplasias de origen mesenquimático que aparecen en las regiones corporales utilizadas rutinariamente para la aplicación de vacunas u otros inóculos. Con el objetivo de caracterizar estas neoplasias se seleccionaron 117 tumores diagnosticados como sarcomas posinoculación. Se realizaron estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos que permitieron reclasificar los diferentes sarcomas hallados y establecer el porcentaje de células proliferantes. Además, se consideraron los datos demográficos y se realizaron encuestas a los médicos veterinarios para conocer la evolución de los pacientes. El diagnóstico más frecuente fue el de fibrosarcoma (87,18%). También, se encontraron, en menor proporción, otros tumores como: sarcomas pleomórficos (HFM), osteosarcomas extraesqueléticos y mixosarcomas. El grado histológico más frecuente fue el II y la mayoría presentó abundante inflamación. El promedio de células proliferantes alcanzó el 50,12%. La edad de los pacientes al momento del diagnóstico fue mayor que la informada por otros autores. Si bien los sarcomas asociados a sitios de inoculación en la República Argentina comparten características histopatológicas y clínicas con aquellos informados en otros países, existen diferencias vinculadas a la edad al momento del diagnóstico, a la presentación de las recidivas y al tiempo de sobrevida, entre otras características.

Palabras clave

Histopatología, inmunohistoquímica, seguimiento clínico, sarcomas, sitios de inoculación

Abstract

Feline injection-site sarcomas are neoplasms of mesenchymal origin frequently found in sites of the body routinely used for inoculation of vaccines and other drugs. With the aim of characterizing these neoplasms, 117 post-inoculation sarcomas were selected and analyzed. Histopathological and immunohistochemical techniques were performed to reclassify different sarcomas and determine cellular proliferation percentages. In addition, demographic data were considered, and surveys were conducted to obtain information about the clinical follow-up of patients. Of all tumors analyzed, fibrosarcoma was the most frequently diagnosed (87.18%), followed by pleomorphic sarcomas (HFM), extra skeletal osteosarcomas and mixosarcomas. The most frequent histological grade was type II which was associated with great inflammation. Cell proliferation percentage of these tumors was 50.12%. The average age of diagnosis for these sarcomas was higher than that reported by other authors. Although in Argentina injection-site sarcomas shared histopathological and clinical characteristics with those reported in other countries, differences such as the age in the moment of diagnosis, recurrence and survival were found.

Key words

Histopathology, immunohistochemistry, clinical follow-up, sarcomas, inoculation sites

Fecha de recepción: 10/07/2019

Fecha de revisión: 17/09/2019

Fecha de aprobación: 07/10/2019

ANALECTA VET 2019; Julio-Diciembre; 39(2):15-26

Impresa ISSN 03655 14-8 Electrónica ISSN 1514-2590

doi.org/10.24215/15142590e039

Introducción

Los sarcomas asociados a sitios de inoculación (SSI) son neoplasias de origen mesenquimático que aparecen en las regiones corporales utilizadas rutinariamente para la aplicación de vacunas u otros inóculos (Shaw *et al.*, 2009). Fueron descritos por primera vez en 1991, en Estados Unidos de Norteamérica (Hendrick y Goldschmidt, 1991). Posteriormente, se diagnosticaron en la mayoría de los continentes (Burton & Mason, 1997; Chang *et al.*, 2006; Hendrick & Brooks., 1994; Nieto *et al.*, 2003). El tipo más frecuente de SSI es un fibrosarcoma sumamente agresivo y recidivante con un alto índice de mortalidad (Goldschmidt & Hendrick, 2002; Hendrick *et al.*, 1992; Wilcock *et al.*, 2012). Otras variantes, tales como el sarcoma pleomórfico (Hendrick, 2017) o histiocitoma fibroso maligno (HFM), el osteosarcoma, el condrosarcoma y el rabdomiosarcoma, se presentan con menor frecuencia (Dubielzig *et al.*, 1993; Goldschmidt & Hendrick, 2002; Hendrick *et al.*, 1992; Hendrick & Brooks, 1994; Wilcock *et al.*, 2012).

La relación entre el desarrollo de sarcomas felinos y la vacunación se estableció a partir de trabajos epidemiológicos. En EE.UU. se asoció al incremento en la vacunación antirrábica de la población felina tras la sanción de una ley de vacunación obligatoria contra la rabia, en 1987 (Deim *et al.*, 2008; Hendrick *et al.*, 1992). El análisis de estos resultados permitió establecer la relación etiológica entre la vacunación y el desarrollo de fibrosarcomas (Hendrick *et al.*, 1992).

Aspectos morfológicos

Macroscópicamente, los SSI típicos son masas blanquecinas, firmes, bien delimitadas, con un centro cavitado que contiene líquido mucinoso o acuoso (Goldschmidt & Hendrick, 2002; Hendrick *et al.*, 1992). Es frecuente la presencia de una intensa respuesta inflamatoria periférica, en la que predominan linfocitos y macrófagos (Couto *et al.*, 2002; Goldschmidt & Hendrick, 2002; Hendrick & Brooks, 1994). Muchos casos presentan células gigantes intratumorales (Madewell *et al.*, 2001).

Diagnóstico

La observación microscópica a partir de la biopsia escisional es el método de elección para el diagnóstico (Goldschmidt & Hendrick, 2002). El diagnóstico de SSI se basa en la identificación de sus características histológicas y en su localización en sitios tradicionalmente usados para la inoculación de vacunas (Wilcock *et al.*, 2012).

Hipótesis respecto a su etiopatogenia

Los compuestos con aluminio son adyuvantes utilizados comúnmente en vacunas a virus muerto (Deim *et al.*, 2008; Hendrick *et al.*, 1992),

incluyendo aquellas que se aplican para prevenir la rabia y la leucemia felina. La presencia de agregados peritumorales de macrófagos con aluminio sustenta el diagnóstico de SSI (Goldschmidt & Hendrick, 2002; Hendrick *et al.*, 1992). Se postuló que el aluminio generaría una respuesta inflamatoria persistente que induciría la síntesis de factores de crecimiento y citoquinas que estimularían la proliferación de fibroblastos y miofibroblastos. Sin embargo, en un estudio de riesgo, la aparición de SSI también se relacionó con la inoculación de vacunas con adyuvantes que carecían de aluminio y sin adyuvante (Deim *et al.*, 2008; Kass *et al.*, 1993). De todas maneras, estas neoplasias siempre se relacionaron con procesos inflamatorios crónicos. En los felinos, la inflamación persistente como respuesta a la inyección predispondría al desarrollo de una actividad reparativa que, en algunos casos, daría lugar a la formación de una neoplasia (Hendrick *et al.*, 1992; Kass *et al.*, 1993; Woodward, 2011). La magnitud y duración de la inflamación estaría influenciada por la formulación de la vacuna y condicionada por el genoma del paciente (Wilcock *et al.*, 2012).

La inflamación crónica puede inducir la producción de radicales libres y metabolitos que producen daños en el ADN y mutaciones, actuando como iniciador de la carcinogénesis. El ambiente provisto por la inflamación crónica sumado a una predisposición genética alteraría la susceptibilidad ante injurias carcinogénicas (Nieto *et al.*, 2003; O'Byrne & Dagleish, 2001).

Comportamiento biológico y clínico

Los SSI se originan en sitios de inoculación tales como cuello, región interescapular, parrilla costal, región dorsolumbar, flanco y miembros posteriores (Goldschmidt & Hendrick, 2002; Hendrick *et al.*, 1992; Hendrick & Brooks, 1994). A pesar de las diferencias de diagnósticos histopatológicos asociados a los sitios de inoculación, ninguno de ellos brinda diferencias pronósticas para la vida del paciente (Wilcock *et al.*, 2012).

Este tipo de neoplasias no presenta predilección sexual. La edad promedio documentada para su aparición es de 8,1 años, que es menor a la de los sarcomas no asociados a sitios de vacunación que aparecen a una edad promedio de 9,2 años (Goldschmidt & Hendrick, 2002; Hendrick *et al.*, 1994). Además, los sarcomas no asociados a la vacunación son menos invasivos y recidivantes (Deim *et al.*, 2008).

Se calculó que la prevalencia de los SSI es de 1:1000 a 1:10000 gatos vacunados (Goldschmidt & Hendrick, 2002; Kass *et al.*, 1993; Wilcock *et al.*, 2012). El intervalo más frecuente entre la vacunación y la aparición del tumor se encuentra entre los 3 meses y los 3 años posinoculación (Hendrick *et al.*, 1992). Sin embargo, puede llegar a los 15 años (Wilcock *et al.*, 2012).

Los SSI son neoplasias sumamente invasivas, el riesgo de recidiva es alto y pueden ser extirpadas quirúrgicamente de una a tres veces en un lapso de uno a dos años (Goldschmidt & Hendrick, 2002; Hendrick *et al.*, 1994). Sin embargo, una escisión quirúrgica agresiva, que permita lograr un amplio margen, puede extender el intervalo libre de tumor y la sobrevida (Davidson *et al.*, 1997; Goldschmidt & Hendrick, 2002; Hershey *et al.*, 2000; Wilcock *et al.*, 2012). Algunos trabajos preliminares sugieren que este intervalo también podría extenderse con el uso de quimioterapia o de combinaciones de inmunostimulantes y radioterapia (Goldschmidt & Hendrick, 2002).

En la mayoría de los casos, los gatos son sometidos a eutanasia luego de varias cirugías con o sin terapia adyuvante. El potencial metastásico de estos tumores inicialmente es bajo, pero aumenta con la sobrevida prolongada (Goldschmidt & Hendrick, 2002; Wilcock *et al.*, 2012). Las metástasis se encontraron en linfonodos regionales, mediastino, pulmones (Briscoe *et al.*, 1998; Goldschmidt & Hendrick, 2002; Hendrick *et al.*, 1994; Rudmann *et al.*, 1996), hígado y omento (Sandler *et al.*, 1997).

Situación actual

Luego de haber sido descritos por primera vez en 1991, la identificación de estos sarcomas motivó cambios en los protocolos de vacunación. Así, hacia 1996 se incluyó la recomendación de modificar los sitios de inoculación y, además, se diseñaron vacunas antirrábicas sin adyuvante, para uso en gatos. Sin embargo, no hubo, tras estas modificaciones, cambios ni en la prevalencia ni en la edad de presentación de los SSI. Sí, en cambio, se registró una variación en la ubicación corporal, en correspondencia a los nuevos sitios recomendados para vacunación. Antes de 1996, la localización interescapular era cinco veces más frecuente que las otras. Luego de ese año, el sitio más frecuente se localizó en los miembros posteriores y sus áreas de adyacencia (Shaw *et al.*, 2009; Wilcock *et al.*, 2012). Por estos motivos, no existiría razón para modificar los sitios de inoculación, más allá de la factibilidad de lograr un amplio margen quirúrgico como sucede en el caso de los miembros o del rabo.

Las vacunas sin adyuvante (recombinantes) no causan inflamación significativa. Por lo tanto, no deberían inducir la formación de sarcomas. La falla en la disminución de la prevalencia podría deberse a que, en realidad y pese a las indicaciones, éstas no reemplazaron, en la práctica, a las vacunas tradicionales, debido a su mayor costo (Wilcock *et al.*, 2012).

Algunos autores sostienen que otros productos inoculados pueden promover el desarrollo de sarcomas (MacEwen *et al.*, 2001; Martino *et al.*, 2011). En realidad, cualquier sustancia

que genere una respuesta infamatoria local persistente podría llevar al desarrollo de sarcomas en gatos susceptibles. Sin embargo, el incremento de la frecuencia de inoculación de la población felina sería la responsable de la mayor correlación con la enfermedad (MacEwen *et al.*, 2001).

Los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar desde el punto de vista histopatológico e inmunohistoquímico a los SSI, establecer su grado de anaplasia (GA) y de inflamación (GI), calcular el porcentaje de células proliferantes (PCP) y detallar la información obtenida en relación con el seguimiento clínico.

Materiales y métodos

Muestras

Se seleccionaron casos de archivo (tacos en parafina) de un laboratorio privado de histopatología que recibe muestras de todo el país (Laboratorio Duchene). Se realizó un muestreo consecutivo (Robledo Martín, 2005), tomando todos los casos que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión durante los años 2011 y 2012. Dichos criterios fueron:

- 1) Criterio de inclusión: se seleccionaron para su estudio todos los tumores diagnosticados como sarcomas posinoculación, en el período antes mencionado, quedando incluidos 185 casos.
- 2) Criterio de exclusión: los casos con características histológicas típicas, pero localización atípica o desconocida fueron excluidos. La muestra quedó finalmente conformada por 117 casos.

Estudios histopatológicos

Los cortes histológicos (5 μ m), obtenidos a partir de las muestras seleccionadas, fueron coloreados con Hematoxilina y Eosina. Posteriormente se examinaron con un microscopio óptico (CX31, Olympus, Japón).

Los sarcomas seleccionados fueron reclasificados siguiendo los criterios de la OMS (Organización Mundial de la Salud) para tumores mesenquimáticos de la piel y tejidos blandos (Hendrick *et al.*, 1998). Se consideraron como fibrosarcomas aquellos tumores compuestos por haces o fascículos entrelazados de células fusiformes pleomórficas. En cambio, los que presentaron células de fusiformes a estrelladas, de disposición laxa, inmersas en una matriz mucinosa (que adopta una tonalidad celeste con hematoxilina eosina), fueron clasificados como mixosarcomas. Las neoplasias tradicionalmente llamadas histiocitomas fibrosos malignos, fueron denominadas sarcomas pleomórficos (Hendrick, 2017); para su clasificación, se tuvo en cuenta la presencia de abundantes células gigantes multinucleadas, células fusiformes

y células histiocitoides atípicas. Aquellos que presentaron células pleomórficas con abundante citoplasma eosinofílico, células multinucleadas y células en raqueta (con prolongaciones citoplasmáticas) se clasificaron como rabdomiosarcomas.

Dado que la OMS (Hendrick *et al.*, 1998) no considera dentro de las neoplasias de tejidos blandos a aquellas que forman matriz condroide u osteoide, se recurrió a otros criterios presentes en la bibliografía, tanto de medicina humana (Sangüesa Nebot *et al.*, 2007) como veterinaria (Thompson y Dittmer, 2017), para su clasificación. Por ello, se consideraron osteosarcomas extraesqueléticos a aquellos que forman matriz osteoide, aunque puedan también formar matriz condroide, (Thompson y Pool, 2002). Debido a que existen comunicaciones científicas que mencionan la posibilidad de ocurrencia de metaplasia osteoide y condroide en neoplasias de tejidos blandos (Thompson y Dittmer, 2017), se consideraron criterios adicionales para diferenciar fibrosarcomas con diferenciación condroide y osteoide de osteosarcomas extraesqueléticos. Para ello, se tuvo en cuenta la extensión y diferenciación del tejido osteoide y condroide. Aquellos con un patrón predominante de haces entrelazados de células fusiformes pleomórficas y que, además, presentaron tejido condroide y osteoide, o solo osteoide, diferenciado y en menos del 50 % de la extensión de la muestra, se consideraron fibrosarcomas con metaplasia ósea. En cambio, las neoplasias que presentaron tejido osteoide con diferenciación moderada a pobre, y que se extiende en más del 50 % de la muestra, se consideraron osteosarcomas extraesqueléticos.

El GA se determinó utilizando un esquema propuesto por Couto (Couto *et al.*, 2002), que toma en cuenta la diferenciación celular, el índice mitótico (IM) y el grado de necrosis. De la combinación de dichas características surge la puntuación que permite clasificar las neoplasias en tres grados.

Para establecer el puntaje correspondiente al grado de diferenciación celular se consideraron los siguientes criterios: se asignó un punto a los tumores cuyas células eran similares a las diferenciadas del tejido normal, dos puntos si sus células presentaban fenotipo histológico definido, y finalmente, se asignó tres puntos a aquellos con células pobremente diferenciadas (Couto *et al.*, 2002).

El IM se estableció obteniendo el promedio de mitosis en diez campos, utilizando un objetivo de alta magnificación (PLAN C 40x 0.65 NA, FN 22 y ocular 10X FN 20). Se excluyeron sectores con extensas áreas de inflamación y necrosis. El puntaje que se atribuyó a los sarcomas respetó el siguiente esquema: un punto para IM entre 1 y 9, dos puntos para IM entre 10 y 19, y tres puntos para IM ≥ 20 (Couto *et al.*, 2002).

En cuanto al grado de necrosis de los tumores analizados, se computó un punto cuando se verificó su ausencia, dos puntos cuando la

necrosis representó menos del 50% del área de la muestra, y tres puntos cuando fue mayor al 50% de su área (Couto *et al.*, 2002).

La suma de los puntajes obtenidos para cada criterio analizado constituyó el puntaje final, en función del cual se atribuyó a cada neoplasia uno de los tres grados de anaplasia considerados (Couto *et al.*, 2002).

El GI se estableció al evaluar el infiltrado linfóide peritumoral a baja magnificación (4X) según criterios adaptados a partir de los utilizados por Couto (2002): 0=ausencia de infiltrado linfóide peritumoral, 1=escaso infiltrado linfóide (requiere búsqueda cuidadosa), 2=infiltrado difuso o pequeños agregados en menos del 50 % de los campos, y 3=agregados linfocitos en el 50 % de los campos o más. En este caso, se excluyó uno de los tacos de la población seleccionada, ya que por ser una muestra mínima (biopsia incisional) el área peritumoral, en la que se centra la evaluación, no resultaba representativa.

Estudios inmunohistoquímicos

Se realizaron estudios inmunohistoquímicos para confirmar la estirpe celular que originó las neoplasias. Para ello se utilizó, como anticuerpos primarios, pancitoqueratina (anti-cytokeratin, Dako, Carpintería, CA, USA) y vimentina (Vimentin RTU-VIM-V9, Leica Biosystems, Newcastle Ltd, United Kingdom). Además, se seleccionaron 10 sarcomas al azar a los que se les realizó inmunomarcación con anticuerpo anti-desmina (Desmin RTU-DES-DERII, Leica Biosystems, Newcastle Ltd, United Kingdom). Aquellos casos que lo requirieron fueron sometidos a otras pruebas inmunohistoquímicas para confirmar su diagnóstico histopatológico. Los anticuerpos utilizados en estos casos fueron anti-desmina y anti- α -actina (anti- α -actina, [ab7817] Abcam, Cambridge, England) de músculo liso.

También, se realizó la inmunomarcación con anticuerpo anti-antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, clone PC 10, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.) para establecer el PCP. Para ello, se seleccionó una muestra de 54 casos tomados al azar.

Para la técnica inmunohistoquímica se realizaron cortes de 3 μm de espesor que se montaron sobre vidrios positivados (HistoSystem, Rosario, Argentina). Estos se desparafinaron, rehidrataron e incubaron con 3 % de H₂O₂ diluida en metanol, para inhibir la peroxidasa endógena, durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se lavaron con solución tamponada de fosfato (PBS, pH 7,4). La recuperación antigénica se realizó en microondas a 800 W, durante 3 minutos en solución tamponada de citrato, pH 6,0. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon al incubar los cortes con 1 % de albúmina sérica bovina (BSA) diluida en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, en cámara húmeda. La incubación con

anticuerpos primarios policlonales (pancitoqueratina dilución 1:500) y monoclonales (anti- α -actina, dilución 1:200; PCNA, dilución 1:3000; anti-vimentina; anti-desmina) se realizó en cámara húmeda durante una noche a 4 °C, la que fue seguida por la incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo (EnVision HRP ®, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) para los anticuerpos policlonales, y anti-ratón (EnVision HRP ®, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) para los anticuerpos monoclonales en cámara húmeda y a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Como control negativo de anticuerpo se reemplazó el anticuerpo por PBS, pH 7,4. Se utilizaron muestras de intestino delgado como controles negativos y positivos para cada anticuerpo, considerando su especificidad para los tejidos epitelial de revestimiento y glandular, conectivo y muscular liso. Además, se consideraron como controles negativos a los tejidos no neoplásicos de cada muestra. Se utilizó 3,3-diaminobenzidina tetrahydrochloride (DAB) como cromógeno (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), y hematoxilina como colorante de contraste.

El PCP se evaluó mediante la inmunomarcación con anticuerpo anti-PCNA, estimando el porcentaje de células con marcación nuclear positiva, al contar estas sobre imágenes digitales tomadas en diez campos obtenidos mediante un objetivo de 40X de magnificación. Las imágenes se capturaron mediante una cámara de video digital (Sony DXC390) montada sobre un microscopio trinocular (CX31, Olympus, Japón) y conectada a una computadora que cuenta con un programa informático de análisis de imágenes digitales (ImagePro Plus v6.3 - Media Cybernetics, USA).

Seguimiento clínico

Las unidades de observación utilizadas corresponden a los Médicos Veterinarios remitentes y protocolos de remisión de muestras para obtener información de la historia clínica y evolución.

Las variables consideradas fueron: 1) parámetros demográficos: raza, y sexo; 2) parámetros clínicos: edad al momento del diagnóstico, ocurrencia de recidivas, tiempo promedio entre recidivas y sobrevida. Además, se consideró la ubicación anatómica de las neoplasias.

Las técnicas de recolección de la información fueron las siguientes: los parámetros demográficos y la ubicación anatómica se extrajeron de la información enviada por los profesionales remitentes junto con la muestra (protocolos de remisión de muestra). Para la recolección de información comprendida en los parámetros clínicos se diseñó una encuesta que se envió por correo electrónico a los médicos remitentes para obtener la información clínica pertinente. Aquellos profesionales que no respondieron por vía electrónica

fueron contactados por vía telefónica.

Análisis estadístico

Para evaluar la asociación entre las variables GA y GI se realizó una prueba de correlación bayesiana (matriz de correlación bayesiana). Para ello, se desarrollaron scripts en lenguaje R (<https://cran.r-project.org/>) y WinBUGS (<https://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/software/bugs/the-bugs-project-winbugs>), utilizando la interfaz del lenguaje R, R2WinBUGS (<https://cran.r-project.org/web/packages/R2WinBUGS/index.html>). Se partió de una distribución prior no informativa (prior: anterior a los datos o la muestra; no informativa, otorga la misma probabilidad a cualquier evento y cuyos parámetros a y b equivalen a la unidad, $a = b = 1$) y se corrieron 10000 iteraciones del modelo, descartando las primeras 1000 (Risso & Risso, 2017).

Para evaluar la asociación entre las variables GA, GI, sexo, edad -informada al remitir la muestra-, ubicación anatómica, edad al momento del diagnóstico (encuesta), existencia de recidivas, tiempo promedio entre recidivas, número de recidivas, tiempo de sobrevida y PCP, la metodología de correlación bayesiana se aplicó mediante el uso de software JASP (<https://jasp-stats.org/>).

Para todos los casos, los datos numéricos discretos, se analizaron usando un modelo transformación a raíz cuadrada, los datos expresados como proporciones se analizaron usando un modelo transformación arcoseno. Para todo el estudio se fijó un nivel de significación $P \leq 0.05$.

Resultados

Estudios histopatológicos

La distribución de los diferentes tipos morfológicos fue: fibrosarcoma 87,18 % (8 de ellos presentaron metaplasia osteoide), osteosarcoma extra esquelético 1,71 %, mixosarcoma 5,98 %, sarcoma pleomórfico 3,42 %, rabdomiosarcoma 1,71 %. De los 117 SSI estudiados el 29,91 % presentó GA I, el 64,11 % GA II y el 5,98 % GA III. Tres de las recidivas presentaron el mismo GA (GA II) que el tumor primario y una de ellas presentó menor GA (GA I) que aquel (Santelices *et al.*, 2018). Respecto al grado de inflamación, se asignó grado 1 al 15,52 %, grado 2 al 36,21 % y grado 3 al 48,27 % de ellos. En este caso, tres de las recidivas presentaron el mismo grado de inflamación que su tumor primario (grado 3 en todos los casos), y una de ellas presentó un grado de inflamación menor (grado 1) que su tumor primario, que era de grado 2 (Santelices *et al.*, 2018).

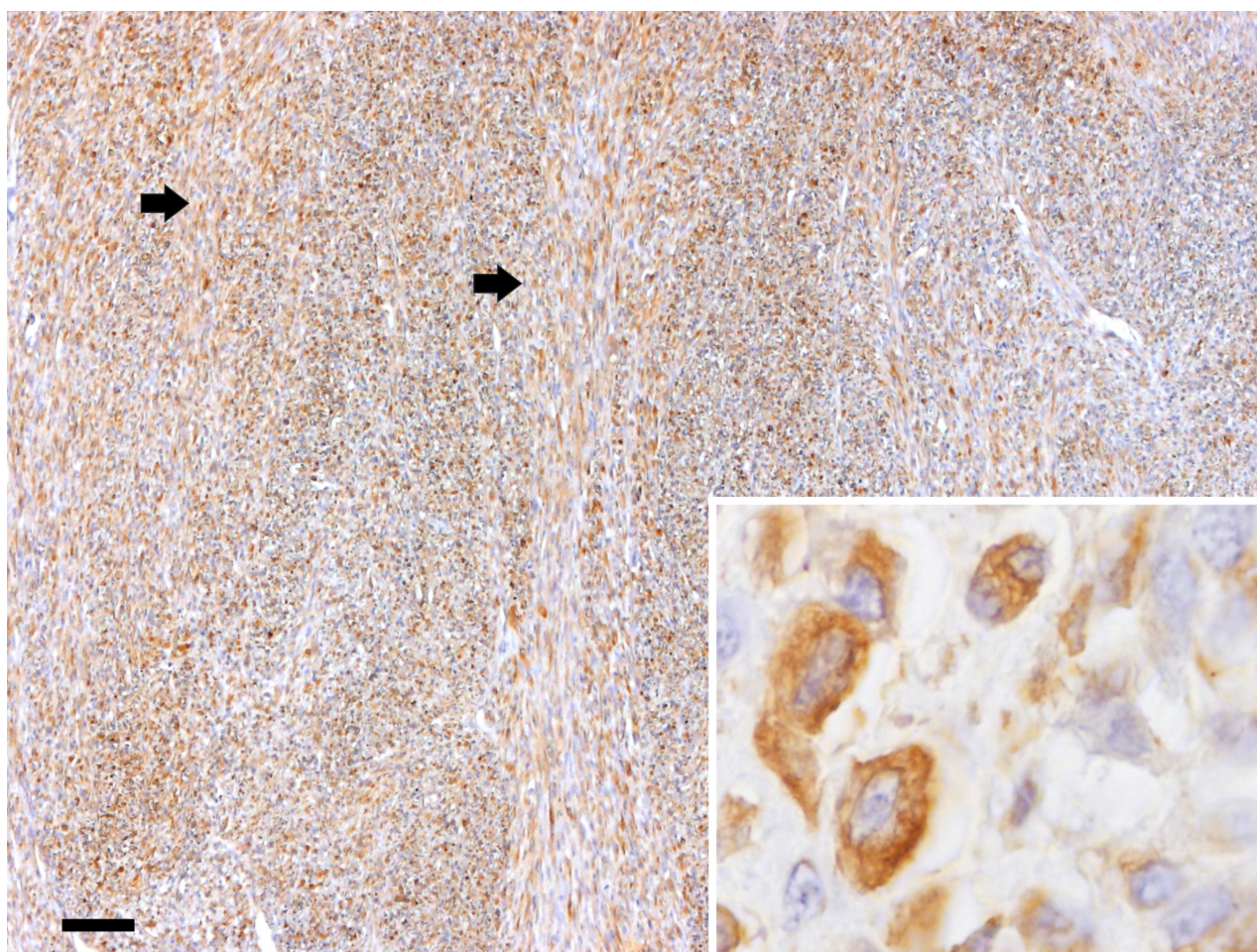


Figura 1. Fibrosarcoma. Patrón característico de haces o fascículos entrelazados de células fusiformes pleomórficas (flechas). Marcación inmunohistoquímica positiva para vimentina. Inserto: detalle magnificado de un área de la imagen principal mostrando la inmunomarcación citoplasmática. Barra = 200 μ m (imagen principal); 20 μ m (inserto). DAB y hematoxilina.

Tabla 1. Clasificación de los sarcomas de acuerdo con los estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos.

%	Tipo	Grado de anaplasia	%
88,89	Fibrosarcoma ^{(1)a}	I	27,88
		II	67,30
		III	4,81
1,71	Osteosarcoma extraesquelético ^b	I	50
		II	50
		III	0
5,98	Mixosarcoma ^a	I	71,43
		II	14,28
		III	14,28
3,42	Sarcoma pleomórfico o HFM ^c	I	0
		II	25
		III	75

(1) Ocho de ellos presentaron metaplasia osteoide.

a. Hendrick *et al.*, 1998; b. Sangüesa Nebot *et al.*, 2007; Thompson y Dittmer, 2017; Thompson y Pool, 2002; c. Hendrick, 2017.

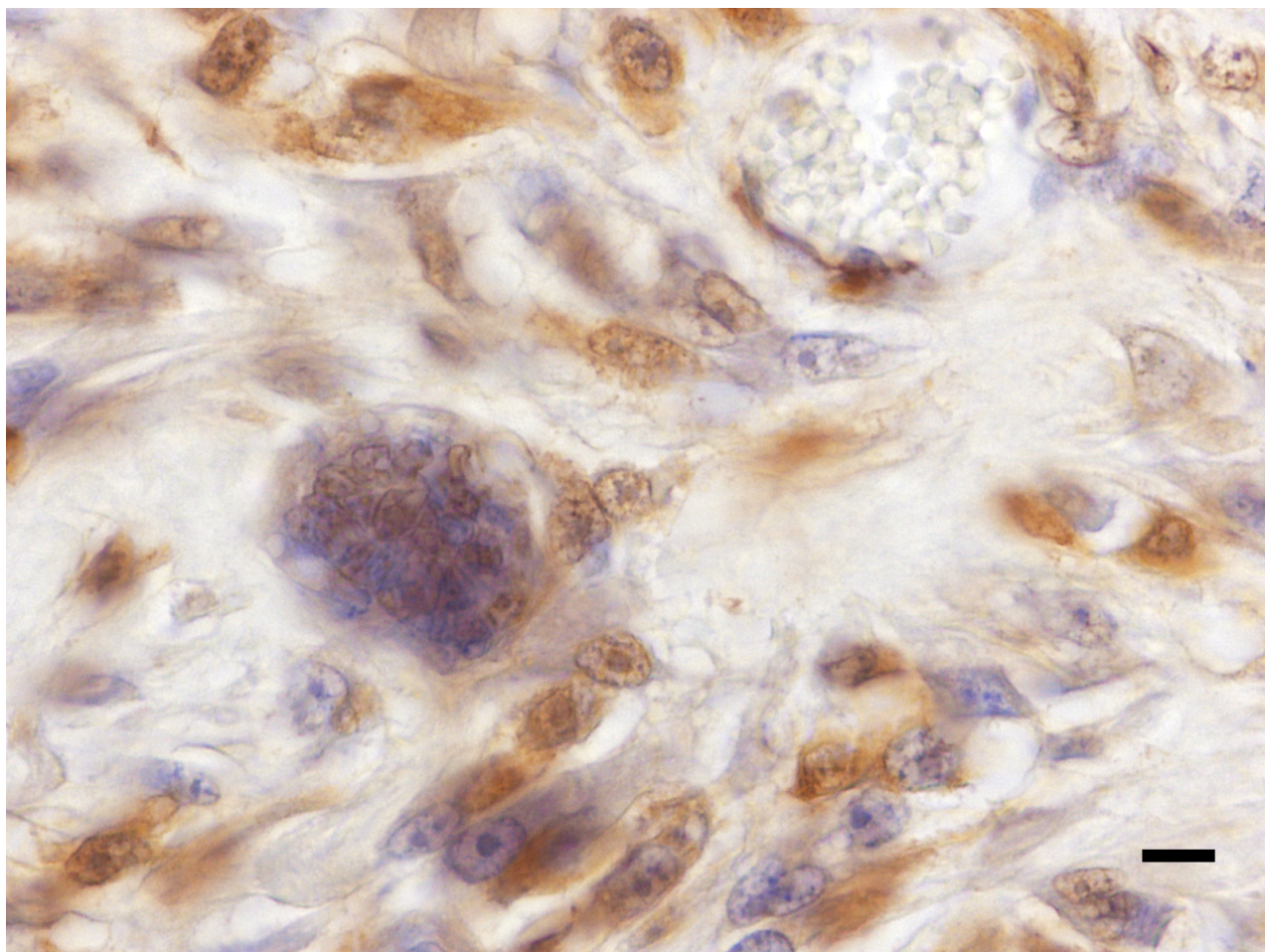


Figura 2. Sarcoma pleomórfico (Hendrick, 2017). Se observa inmunomarcación positiva para alfa-actina. Barra = 200 μ m. DAB y Hematoxilina.

Estudios inmunohistoquímicos

Todos los sarcomas resultaron negativos para pancitoqueratina y positivos para vimentina (Figura 1). Los 10 sarcomas, seleccionados al azar, en los cuales se evaluó la expresión de desmina resultaron negativos. Los dos SSI que habían sido clasificados preliminarmente como rabdomyosarcomas resultaron negativos para desmina y, por ello, se reclasificaron como fibrosarcomas. Los cuatro clasificados inicialmente como sarcomas pleomórficos (anteriormente denominados HFM) resultaron positivos para α -actina de músculo liso (Figura 2) y negativos para desmina, lo que justificó conservar el diagnóstico original.

La clasificación de los SSI de acuerdo con los estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos se detallan en la Tabla 1.

El PCP alcanzó un promedio de 50,12 % de núcleos positivos con puntos extremos de 10,59 % y 89 %.

Seguimiento clínico

Se obtuvieron veinticuatro respuestas efectivas (Tabla 2) que permitieron conocer la evolución de la enfermedad en los casos informados. En relación con la raza de los felinos involucrados 58,12 % (68 de 117 casos) fueron informados como mestizos o común europeo y 5 (4,27 %) fueron siameses; de los 44 (37,61 %) restantes no se dispone información. El 46,15 % (54 de 117) fueron hembras, el 50,43 % fueron machos y se desconoce el sexo de los restantes 4 animales (3,42 %).

La ubicación anatómica más frecuente fue la parrilla costal (60 animales, 51,28 %), seguida del flanco (29, 24,79 %). Otros sitios menos frecuentes de aparición fueron la región dorsolumbar (19, 16,24 %), el cuello (4 casos, 3,42 %) y la zona interescapular (4 casos, 3,42 %). Solo se informó un caso de SSI en el muslo (0,85 %).

Tabla 2. Información clínica aportada por Médicos Veterinarios remitentes

Edad al momento del diagnóstico clínico en años	¿Recidivó? Si/No	Número de Recidivas	Tiempo promedio entre recidivas en días	Sobrevive Si/No	Tiempo de sobrevida en días
3,5	Si	2	168	D	D
9	D	D	D	D	D
13	Si	1	365	No	545
13,5	Si	5	342	No	1945
6	Si	2	360	No	910
10,5	Si	2	D	D	D
5,5	Si	1	360	No	545
9	Si	1	D	No	450
7,67	Si	1	180	No	635
15	Si	1	540	No	1945
14	No	0	-	No	120
9	Si	1	274	No	635
D	D	D	D	No	365
16	D	D	D	No	270
15	Si	3	340	D	D
12,5	Si	1	240	No	D
9	No	0	-	D	D
7,67	No	0	-	D	D
12	Si	3	281,4	No	1215
5	Si	2	267	No	730
D	Si	2	D	No	D
8	Si	2	135	No	270
6	Si	2	255	No	665
12	Si	1	180	No	365

D: dato desconocido.

Veintidós profesionales informaron la edad del animal al momento del diagnóstico, de estos datos se obtuvo un promedio de 10 años. Si consideramos la edad informada al momento de remitir la muestra, el promedio de los 103 casos informados es de 8,9 años.

En relación con la ocurrencia de recidivas, de los 24 SSI informados 18 recidivaron (75 %), con un promedio de 1,8 recidivas y variaciones entre 1 y 5 recidivas; 3 no recidivaron (12,5 %) y de 3 se desconoce si hubo o no recidiva (12,5 %). Se obtuvo información sobre el tiempo entre recidivas en 15 de los 24 casos informados, cuyo promedio fue de 285,83 días con variaciones entre 120 y 540 días. Para ocho casos (33,34 %) se informó solo una recidiva, en diez casos (41,67 %) se informó más de una recidiva. Seis de ellos (25 %) recidivaron por primera (o única) vez dentro de los 6 meses, mientras que 4 de ellos recidivaron más de una vez dentro de un período de 2 años (16,67 %).

Respecto al tiempo de sobrevida se obtuvo un promedio de 725,62 días (resultado obtenido a partir de 16 casos en los que se informó este tiempo). Las variaciones oscilaron entre los 120 y 1945 días. En solo tres casos se informó evidencia de metástasis. Uno de ellos presentó masas cutáneas múltiples, otro presentó afección del sistema respiratorio y en el restante se detectó una masa intestinal. Ninguno de estos tumores secundarios

cuenta con confirmación histopatológica. La causa de muerte informada fue: eutanasia en 10 casos, deterioro general en 2, insuficiencia renal en 3 y posible metástasis en sistema respiratorio en 1. En 8 casos se desconoce la causa de la muerte.

Solo dos de los Médicos Veterinarios informaron haber realizado cirugía radical. De ellos, solo uno cuenta con información sobre la evolución del paciente. Este último, informa que el paciente sufrió una recidiva y luego de un tratamiento quirúrgico agresivo en el que se extirpó, junto con la masa, pared costal y abdominal, permaneció libre de tumor hasta su muerte por insuficiencia renal. El tiempo de sobrevida en este caso fue de 1945 días.

Cuando se consultó a los profesionales por la posibilidad de vacunación en el sitio de aparición de la neoplasia en cuestión, 5 respondieron que con certeza recibieron la aplicación de vacunas en ese sitio, 15 que existía la posibilidad de vacunación en el sitio. Cuando se los consultó sobre la vacunación antirrábica (específicamente), 4 manifestaron certeza de vacunación antirrábica en el sitio y 16 que existía esa posibilidad. De los restantes casos, 4 en total, los médicos actuantes no pudieron informar sobre antecedentes de vacunación, argumentando que el caso era atendido por otros colegas previamente al diagnóstico del tumor y que recibieron el caso por derivación.

Tabla 3. Matriz de correlación Bayesiana (<https://jasp-stats.org/>)

Variables		Pearson cc	p-value ⁽¹⁾
GA	Sexo	-0,098	0,303
GA	Raza	NaN ^a (2)	-----
GA	Edad	0,03	0,76
GA	UA	-0,076	0,413
GA	EMD	0,111	0,623
GA	TPR	-0,124	0,661
GA	NR	-0,296	0,1930
GA	Tsd	-0,351	0,1830
GA	Rsn	-0,04	0,8630
GI	Sexo	-0,129	0,1720
GI	Edad	0,033	0,7370
GI	Raza	NaN ^a (2)	-----
GI	UA	-0,106	0,2560
GI	EMD	-0,324	0,7310
GI	TPR	-0,151	0,5920
GI	NR	-0,03	0,8960
GI	Tsd	-0,3	0,2590
GI	Rsn	0,198	0,3900
PCP	Sexo	0,04	0,387
PCP	Raza	NaN ^a (2)	-----
PCP	Edad	-0,341	0,01
PCP	UA	0,039	0,39
PCP	EMD	-0,442	0,02
PCP	TPR	-0,124	0,661
PCP	NR	-0,193	0,246
PCP	Tsd	-0,072	0,395
PCP	Rsn	-0,072	0,481
PCP	GA	0,244	0,037
PCP	GI	-0,01	0,528
EMD	TPR	0,451	0,046
EMD	Rsn	-0,065	0,607
EMD	NR	0,122	0,305
EMD	Tsd	0,23	0,205
TPR	Rsn	NaN ^a (2)	-----
TPR	NR	0,049	0,431
TPR	Tsd	0,696	0,006
Rsn	NR	0,564	0,004
Rsn	Tsd	0,342	0,116
NR	Tsd	0,635	0,007

(1) $P > 0.05$ = no hay correlación significativa. (2) NaN^a = Varianza = 0, no se realiza el análisis. Pearson cc = coeficiente de correlación; p-value = valor de P; GA= grado de anaplasia; UA = ubicación anatómica; Edad: edad informada al momento de la remisión de la muestra en años; EMD = edad al momento del diagnóstico clínico en años; TPR = tiempo promedio entre recidivas en días; NR = número de recidivas; Tsd = tiempo de sobrevida en días; Rsn = recidiva, si – no; GI= grado de inflamación; PCP= porcentaje de células proliferantes.

Análisis estadístico

No hubo asociación estadísticamente significativa entre las variables GA y GI ($P = 0.203$). Tampoco hubo asociación entre las variables GA y GI con sexo, edad (al momento de remisión de la muestra), ubicación anatómica, edad al momento del diagnóstico (informado en encuesta), existencia de recidivas, tiempo promedio entre recidivas en días, número de recidivas y tiempo de sobrevida. Del mismo modo, no se halló asociación entre el PCP y, sexo, ubicación anatómica, GI, existencia de recidivas, tiempo promedio entre recidivas y tiempo de sobrevida (Tabla 3).

Se halló asociación estadísticamente significativa entre el PCP y las siguientes variables: GA

($P=0,037$), edad al momento del diagnóstico ($P=0,02$), edad informada al momento de remisión de la muestra ($P=0,01$) y número de recidivas ($P=0,026$) (Tabla 3).

También, se demostró correlación significativa directa entre: edad al momento del diagnóstico y tiempo promedio entre recidivas ($P=0,046$), tiempo promedio entre recidivas y tiempo de sobrevida ($P=0,006$), número de recidivas y tiempo de sobrevida ($P=0,007$) (Tabla 3).

No se evaluó la asociación entre el PCP y raza debido a que todos los animales de los que se conoció la raza y a los que se realizó inmunomarcación con anticuerpo anti-PCNA eran gatos mestizos; 5 profesionales no informaron ese dato.

Discusión y conclusiones

El fibrosarcoma es el SSI más frecuente en la República Argentina, aunque también se encuentran, en menor proporción, otros tumores como: sarcomas pleomórficos (HFM), osteosarcomas extra esqueléticos y mixosarcomas. Estos hallazgos son similares a los descritos en otros países en los que se realizaron estudios epidemiológicos, tales como EE.UU., España, Italia, Canadá (Hendrick, 1999; Martano *et al.*, 2011; Nieto, 2003; Wilcock *et al.*, 2012).

Según Hendrick (2017), los sarcomas pleomórficos o HFM poseen un fenotipo fibroblástico/miofibroblástico: positivo a vimentina, y con positividad variable para actina y desmina. En este estudio, los resultados inmunohistoquímicos de estos SSI (positivos para vimentina y α -actina de músculo liso, y negativos para desmina) fueron compatibles con el fenotipo descrito por Hendrick (2017), por este motivo se confirmó su diagnóstico.

En relación con el grado de anaplasia de los SSI, al igual que lo informado por Couto (2002) y Nieto (2003), las neoplasias de GA II fueron las más numerosas. Tres de las recidivas presentaron el mismo GA (DA II) que el tumor primario y una de ellas presentó un GA menor (GA I).

Con respecto al GI, la mayoría de los sarcomas fueron de grado 3. En este caso, tres de las recidivas presentaron el mismo GI que el tumor primario, en todos los casos GI 3, y una de ellas tuvo un GI menor (grado 1) que el tumor primario que presentó GI 2. Esta información concuerda con la presentada por Couto (2002), que manifiesta que la mayoría de las neoplasias presentan abundante inflamación, tanto en los tumores primarios como en las recidivas. No se halló asociación entre GA y GI, tal como ocurrió en trabajos previos (Couto, 2002).

El promedio de edad al momento del diagnóstico fue mayor, tanto en las encuestas (10 años), como en los protocolos de remisión de muestras (8,9 años), al informado por otros autores (8,1 años) (Goldschmidt & Hendrick, 2002; Hendrick *et al.*, 1994). Incluso, el obtenido de las encuestas, es mayor que el informado para los sarcomas no asociados a sitios de inoculación (9,2 años) (Goldschmidt & Hendrick, 2002; Hendrick *et al.*, 1994). Esto podría deberse a que la consulta en nuestro medio se retrasa en comparación con lo que ocurre en países del primer mundo.

Los sarcomas estudiados presentaron alta recurrencia. Esto concuerda con lo comunicado por Hendrick (1999). Sin embargo, solo un tercio lo hizo dentro de los seis meses, período en el que este autor ubica la mayoría de las primeras recidivas y solo el 16,67 % de los casos presentaron

más de una recidiva en un período de dos años, porcentaje muy inferior al mencionado por este autor (22 %) (Hendrick *et al.*, 1999). Es necesario considerar que solo 5 (20,84 % de los 24 casos con información sobre seguimiento clínico, y el 31 % de los 16 con información sobre tiempo de sobrevida) alcanzaron los dos años de sobrevida (730 días). Al igual que informaron otros autores (Martano, 2011) no se encontró asociación entre el GA y la ocurrencia de recidivas.

Según los resultados estadísticos obtenidos, los animales de mayor edad (al momento del diagnóstico) presentaron intervalos mayores entre recidivas y los animales cuyo período entre recidivas era más extenso tenían mayor expectativa de sobrevida. Sin embargo, a mayor tiempo de sobrevida mayor es el número de recidivas informadas. No hallamos en la bibliografía consultada ninguna información previa que vincule estas variables.

Respecto a la relación que el tipo de tratamiento mantiene con la sobrevida y con la ocurrencia de recidivas contamos con escasa información. El único caso en el cual se informa la realización de una cirugía radical no presentó recidivas luego de esta y fue uno de los dos pacientes con sobrevida más extensa, hechos que coinciden con lo hallado por otros autores (Hendrick, 1999). Sin embargo, es imposible extraer conclusiones definitivas al respecto, ya que se trata de un único caso.

La variable PCP se asoció significativamente con el GA, la edad al momento del diagnóstico (relación inversa) y el número de recidivas (relación inversa). Esto pareciera indicar que cuanto menor es la edad (al momento del diagnóstico y de remisión de la muestra), mayor es el PCP y cuanto mayor la capacidad proliferativa de estas neoplasias las posibilidades de recidivar son menores. Sin embargo, si bien existen antecedentes de neoplasias que se comportan más agresivamente en jóvenes (Poles *et al.*, 2016), es indispensable disponer de más información sobre otras variables relacionadas. Otras variables, tales como el tamaño de la neoplasia al momento del diagnóstico y la agresividad del tratamiento quirúrgico realizado, no están disponibles y serían importantes para evaluar, en forma más profunda, la significación biológica de estos resultados estadísticos.

El presente trabajo representa el primer estudio epidemiológico sobre los SSI en Argentina. La mayoría de los aspectos analizados, tales como diagnósticos histopatológicos, la presencia de inflamación, el GA, los sitios de aparición y la ausencia de predisposición sexual, son similares a los hallados en otros países. La mayor edad al momento del diagnóstico podría deberse a diferencias en el momento en que los propietarios de los gatos realizan la consulta con el médico veterinario.

Agradecimientos

A Fabiana Confente y Melina Díaz por su invaluable labor en el área técnica. El presente trabajo contó con el siguiente financiamiento: Proyectos de la Universidad Nacional de La Plata (11/V229, 11/V232, S/N).

Conflicto de intereses

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

- Briscoe CM, Lipscomb TP, McKinney L. 1998. Pulmonary metastasis of a feline vaccination-site fibrosarcoma. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 10(1):79-82. doi: [10.1177/104063879801000114](https://doi.org/10.1177/104063879801000114)
- Burton G, Mason KV. 1997. Do postvaccinal sarcomas occur in Australian cats? *Australian Veterinary Journal*. 75(2):102-8. doi: [10.1111/j.1751-0813.1997.tb14167.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1997.tb14167.x)
- Chang HW, Ho SY, Lo HF, Tu YC, Jeng CR, Liu CH, Wang FI, Pang VF. 2006. Vaccine-associated Rhabdomyosarcoma with Spinal Epidural Invasion and Pulmonary Metastasis in a Cat. *Veterinary Pathology*. 43(1): 55-58. doi: [10.1354/vp.43-1-55](https://doi.org/10.1354/vp.43-1-55)
- Couto SS, Griffey SM, Duarte PC, Madewell BR. 2002. Feline vaccine-associated fibrosarcoma: morphologic distinctions. *Veterinary Pathology*. 39(1):33-41. doi: [10.1354/vp.39-1-33](https://doi.org/10.1354/vp.39-1-33)
- Davidson EB, Gregory CR, Kass PH. 1997. Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats. *Veterinary Surgery*. 26(4): 265-9. doi: [10.1111/j.1532-950X.1997.tb01497.x](https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.1997.tb01497.x)
- Deim Z, Pálmai N, Cserni G. 2008. Feline vaccine-associated fibrosarcoma induced by aluminium compound in two cats: short communication. *Acta Veterinaria Hungarica*. 56(1):111-6. doi: [10.1556/AVet.56.2008.1.11](https://doi.org/10.1556/AVet.56.2008.1.11)
- Dubielzig RR, Hawkins KL, Miller PE. 1993. Myofibroblastic sarcoma originating at the site of rabies vaccination in a cat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 5(4):637-8. doi: [10.1177/104063879300500427](https://doi.org/10.1177/104063879300500427)
- Goldschmidt MH, Hendrick MJ. Tumors of the Skin and Soft Tissues. En: Meuten DJ 2002. *Tumors in Domestic Animals*. 4th Edition. Iowa, Ed Blackwell Publishing, pp. 45-117.
- Hendrick MJ, Shofer FS, Goldschmidt MH, Haviland JC, Schelling SH, Engler SJ, Gliatto JM. 1994. Comparison of fibrosarcomas that developed at vaccination sites and at nonvaccination sites in cats: 239 cases (1991-1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 205(10): 1425-9.
- Hendrick MJ, Brooks JJ. 1994. Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*. 31(1):126-9. doi: [10.1177/030098589403100121](https://doi.org/10.1177/030098589403100121)
- Hendrick MJ, Goldschmidt MH. 1991. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 5(8): 968.
- Hendrick MJ, Goldschmidt MH, Shofer FS, Wang YY, Somlyo AP. 1992. Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminum. *Cancer Research*. 52(19):5391-4.
- Hendrick MJ, Mahaffey EA, Moore FM, Vos JH, Walder EJ. Histological classification of mesenchymal tumors of skin and soft tissues of domestic animals. En: 1998. *World Health Organization International Classification of Tumors in Domestic Animals*. 2nd Edition, Washington DC, Ed. Armed Forces Institute of Pathology, pp. 15-60.
- Hendrick MJ. 1999. Feline vaccine-associated sarcomas. *Cancer Investigation*. 17(4):273-7.
- Hendrick, MJ. Mesenchymal Tumors of the Skin and Soft Tissues. En: Meuten DJ. 2017. *Tumors in Domestic Animals*, 5ta Edición, Iowa, Ed. Wiley Blackwell, pp. 142-75.
- Hershey AE, Sorenmo KU, Hendrick MJ, Shofer FS, Vail DM. 2000. Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 216(1):58-61. doi: [10.2460/javma.2000.216.58](https://doi.org/10.2460/javma.2000.216.58)
- Kass PH, Barnes WG Jr, Spangler WL, Chomel BB, Culbertson MR. 1993. Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 254(1):105-11.

- American Veterinary Medical Association. 203(3): 396-405.
- MacEwen EG, Powers BE, Macy D, Withrow SJ. Soft Tissue Sarcomas. En: Withrow SJ, MacEwen EG. 2001. Small Animal Clinical Oncology. 3th Edition. Philadelphia, W.B. Ed Saunders Company, pp. 283-304.
- Madewell BR, Griffey SM, McEntee MC, Leppert VJ, Munn RJ. 2001. Feline Vaccine-associated Fibrosarcoma: An Ultrastructural Study of 20 tumors (1996-1999). *Veterinary Pathology*. 38(2): 196-202. doi: [10.1354/vp.38-2-196](https://doi.org/10.1354/vp.38-2-196)
- Martano M, Morello E, Buracco P. 2011. Feline injection-site sarcoma: past, present and future perspectives. *Veterinary Journal*. 188(2):136-41. doi: [10.1016/j.tvjl.2010.04.025](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.025)
- Nieto A, Sánchez MA, Martínez E, Rollán E. 2003. Immunohistochemical expression of p53, Fibroblast Growth Factor-b, and Transforming Growth Factor- α in feline vaccine-associated sarcomas. *Veterinary Pathology*. 40(6):651-8. doi: [10.1354/vp.40-6-651](https://doi.org/10.1354/vp.40-6-651)
- O'Byrne KJ, Dalglish AG. 2001. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *British Journal of Cancer*. 85(4):473-83. doi: [10.1054/bjoc.2001.1943](https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1943)
- Poles GC, Clark DE, Mayo SW, Beierle EA, Goldfarb M, Gow KW, Goldin A, Doski JJ, Nuchtern JG, Vasudevan SA, Langer M. 2016. Colorectal carcinoma in pediatric patients: A comparison with adult tumors, treatment and outcomes from the National Cancer Database. *Journal of pediatric surgery*. 51(7):1061-6. doi: [10.1016/j.jpedsurg.2015.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.11.005)
- Risso MA, Risso P. Capítulo I. El teorema de Bayes. En: Risso MA, Risso P. 2017. Una Introducción a la Estadística Bayesiana: Uso de Lenguaje R y WinBUGS, 1ra Edición, La Plata, Ed. Vuelta a casa, pp. 19-38.
- Robledo Martín J. 2005. Diseño de muestreo (II). Nure Investigación. [En línea] Disponible en: <http://www.nureinvestigacion.es/OJS/index.php/nure/article/viewFile/214/199> Consultado: 02/04/2019
- Rudmann DG, Van Alstine WG, Doddy F, Sandusky GE, Barkdull T, Janovitz EB. 1996. Pulmonary and mediastinal metastases of a vaccination-site sarcoma in a cat. *Veterinary Pathology*. 33(4):466-9. doi: [10.1177/030098589603300422](https://doi.org/10.1177/030098589603300422)
- Sandler I, Teeger M, Best S. 1997. Metastatic vaccine associated fibrosarcoma in a 10-year-old cat. *The Canadian Veterinary Journal*. 38(6):374.
- Sangüesa Nebot MJ, Cabanes Soriano F, Valverde Mordt C. 2007. Osteosarcoma extraesquelético. Caso clínico. *Revista Española De Cirugía Osteoarticular*. 42:88-92.
- Santelices Iglesias OA, Wright C, Duchene AG, Risso MA, Risso P, Zanuzzi CN, Nishida F, Lavid A, Confente F, Díaz M, Portiansky EL, Gimeno EJ, Barbeito CG. 2018. Association between degree of anaplasia and degree of inflammation with the expression of Cox-2 in feline injection site sarcomas. *Journal of Comparative Pathology*. 165:45-51. doi: [10.1016/j.jcpa.2018.09.002](https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2018.09.002)
- Shaw SC, Kent MS, Gordon IK, Collins CJ, Greasby TA, Beckett LA, Hammond GM, Skorupski KA. 2009. Temporal changes in characteristics of injection-site sarcomas in cats: 392 cases (1990-2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 234(3):376-80. doi: [10.2460/javma.234.3.376](https://doi.org/10.2460/javma.234.3.376)
- Thompson KG, Pool RR. Tumors of Bones. En: Meuten DJ. 2002. Tumors in Domestic Animals, 4ta Edición, Iowa, Ed. Blackwell Publishing, pp. 245-317.
- Thompson KG, Dittmer KE. Tumors of Bone. En: Meuten DJ. 2017. Tumors in Domestic Animals, 5ta Edición, Iowa, Ed. Wiley Blackwell, pp. 356-424.
- Wilcock B, Wilcock A, Bottoms K. 2012. Feline postvaccinal sarcoma: 20 years later. *The Canadian veterinary journal*. 53(4):430-4.
- Woodward KN. 2011. Origins of Injection-Site Sarcomas in Cats: The possible role of chronic inflammation-a review. *International Scholarly Research Network Veterinary Science*. 2011:1-16. doi: [10.5402/2011/210982](https://doi.org/10.5402/2011/210982)

Evaluación del poder inhibitorio de extractos obtenidos de plantas medicinales sobre enterobacterias patógenas de importancia en Salud Pública

Evaluation of the inhibitory power of extracts obtained from medicinal plants on on pathogenic enterobacteria relevant in public health

FERNÁNDEZ MIJAIL^{1,2,4}, SILVA PIERO^{1,2,4}, COSTA MAGDALENA^{2,3} , GALLI LUCÍA^{2,3} ,
BRUNO ESTELA^{2,4,*} 

1. Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, Arequipa-Arequipa, Perú. 2. Cátedra Microbiología Aplicada, Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Argentina. 3. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. 4. Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA, UNLP-CONICET-CICPBA), Argentina.

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

Resumen

Los extractos vegetales pueden ser obtenidos de diferentes partes de las plantas como hojas, tallos, flores y raíces. El interés por los extractos vegetales ha aumentado notablemente por sus propiedades bactericidas, fungicidas y antioxidantes. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el poder inhibitorio de sustancias extraídas de cuatro plantas medicinales: *Schinus molle* (molle), *Sesamum indicum* (sésamo) *Cinnamomum zeylanicum* (canela) y *Minthostachys mollis* (muña) frente a diez bacterias enterobacterias patógenas. Los extractos se obtuvieron con o sin maceración empleando solventes orgánicos y por extracción acuosa. La metodología de extracción que presentó mayor poder inhibitorio fue la realizada con solventes orgánicos, mientras que las extracciones acuosas fueron las que presentaron un poder menor. En los ensayos de inhibición, el extracto de canela fue el que presentó mayor poder inhibitorio frente a los enterobacterias patógenas, mientras que la combinación de canela con sésamo (1:1) mostró un efecto sinérgico, potenciando la actividad antibacteriana. Además, la canela presentó actividad bactericida frente a *Salmonella ser. typhimurium* y *Salmonella ser. enteritidis*.

Palabras clave

Plantas medicinales, extractos vegetales, inhibición, enterobacterias patógenas

Abstract

Vegetable extracts can be obtained from different parts of plants such as leaves, stems, flowers and roots. Interest in vegetable extracts has increased significantly due to their bactericidal, fungicidal and antioxidant properties. For this reason, the objective of this work was to evaluate the inhibitory power of the vegetable substances extracted from four medicinal plants: *Schinus molle* (molle), *Sesamum indicum* (sesame) *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon) and *Minthostachys mollis* (muña) against ten pathogenic enterobacteria. The extracts were obtained with or without maceration with organic solvents and by aqueous extraction. The extraction methodology that presented the highest inhibitory power was that carried out with organic solvents, while the aqueous extractions were those that presented lower inhibitory power. In the inhibition assays, cinnamon extract showed the greatest inhibitory power against pathogenic enterobacteria, while the cinnamon extract combined with sesame (1:1) showed a synergistic effect enhancing antibacterial activity. In addition, cinnamon presented bactericidal effect against *Salmonella ser. typhimurium* and *Salmonella ser. enteritidis*.

Key words

Medicinal plants, vegetable extracts, inhibition, pathogenic enterobacteria

Fecha de recepción: 03/05/2019

Fecha de revisión: 19/07/2019

Fecha de aprobación: 26/09/2019

ANALECTA VET 2019; Julio-Diciembre; 39(2):27-32

Impresa ISSN 03655 14-8 Electrónica ISSN 1514-2590

doi.org/10.24215/15142590e040

Introducción

Los productos alimenticios están frecuentemente propensos a la contaminación causada por agentes patógenos. Con el fin de garantizar la seguridad alimentaria, existe la necesidad de generar medidas de control eficaces con conservantes antimicrobianos, que garanticen la inactivación bacteriana y que a su vez no generen efectos secundarios por su consumo. Por tal motivo, se están estudiando extractos vegetales con la finalidad de demostrar su capacidad antimicrobiana (García *et al.*, 2010). Los extractos son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas y están compuestos principalmente por terpenos y sus derivados, así como también, hidrocarburos, alcoholes, ácidos, ésteres, y aldehídos. Tienen un amplio campo de aplicación tanto para medicina humana como veterinaria (Abadie *et al.*, 2014; Bozín *et al.*, 2006; Deveci *et al.*, 2010).

Las características de las plantas medicinales tales como *Sesamum indicum* (sésamo), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Minthostachys mollis* (muña), *Schinus molle* (molle), son las siguientes: el extracto de sésamo está compuesto principalmente por sesamina y sesamolina, por lo que los usos son alimentario, medicinal, antioxidante y bactericida (Castro Montoya *et al.*, 2015). El extracto de canela está compuesto principalmente por sustancias antioxidantes fenólicas y polifenólicas (Sánchez Miranda, 2013) y además contiene cinamaldehído como principio activo. Se utiliza en la industria alimentaria y medicinal como antibacteriano y antifúngico (Wong *et al.*, 2014). El extracto de muña está compuesto principalmente por sustancias terpénicas y fenilpropanicas. Se utiliza en la industria alimentaria como digestivo, antihelmíntico, afrodisíaco y antibacteriano y en la industria farmacéutica como antifúngico y antibacteriano (Alegre *et al.*, 2017). El molle está compuesto mayoritariamente por terpenos (Arias *et al.*, 2017). Sus múltiples usos abarcan aspectos químicos, industriales, médicos y alimenticios.

El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar y comparar el poder inhibitorio de los extractos de plantas medicinales: *Schinus molle* (molle), *Sesamum indicum* (sésamo) *Cinnamomum zeylanicum* (canela) y *Minthostachys mollis* (muña) sobre diez enterobacterias patógenas de importancia en la Salud Pública, algunos con probada capacidad zoonótica.

Materiales y métodos

1. Obtención de extractos vegetales

La materia prima utilizada para obtener los extractos vegetales se adquirió en el Mercado Andino de Liniers (Buenos Aires, Argentina), en febrero de 2018. Las ramas y hojas de las plantas se lavaron 4 veces con agua potable, se

sumergieron durante 5 min en hipoclorito de sodio al 10 %, se filtraron, se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron en estufa. Posteriormente se trituraron (multiprocesadora Peabody, PEMC9103, China). Para la obtención de los extractos acuosos, se colocaron 4 g de muestra en 36 mL de agua destilada, se sometieron a agitación durante 30 min, y se centrifugaron a 6000 rpm, a 4 °C, durante 10 min (Darré *et al.*, 2017). Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se reservó. El pellet resultante de esta primera extracción se resuspendió con 18 ml de agua destilada y se procesó repitiendo el procedimiento anteriormente descrito. El sobrenadante obtenido de esta segunda extracción se combinó con el de la primera extracción y se conservó a 0 °C durante 24 h. La conservación de este extracto se realizó liofilizando el sobrenadante obtenido en la primera y segunda extracción.

Para la obtención de los extractos con solventes orgánicos se procedió según la metodología de Darré *et al.*, (2017), agregando 36 ml de metanol absoluto o etanol 96° a 4 g de muestra. Para analizar el efecto del tiempo de extracción, un lote de extractos se utilizó para realizar las determinaciones inmediatamente, mientras que el otro lote se dejó macerar 7 días a 0 °C para luego realizar las determinaciones. Posteriormente, los lotes se centrifugaron a 6000 rpm, a 4 °C, durante 10 min. El sobrenadante fue retirado y se concentró por medio de un rotavapor (Büchi R-124, Labortechnik A.G., Flawil, Suiza).

2. Ensayos de inhibición de las enterobacterias patógenas

2.1. Método de difusión en agar por disco

Para los ensayos de inhibición se utilizaron 10 cepas bacterianas de la colección del Laboratorio de Seguridad Alimentaria perteneciente a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata (Tabla 1). Los ensayos de inhibición se realizaron según la metodología descrita por Shiva Ramayoni (2007). Brevemente, las cepas se cultivaron en caldo nutritivo durante 18-24 h a 37 °C y su densidad óptica fue estandarizada utilizando el equipo DEN-1B (Biosan, Biosystem, Argentina) alcanzando un valor equivalente a 108 UFC/ml. Cada uno de los microorganismos se sembró con hisopos estériles en placas de agar nutritivo (Britania, Argentina) en forma de pátina. Los extractos se utilizaron en forma individual y combinados: molle, canela, muña, sésamo, molle + sésamo, canela + sésamo. Los extractos acuosos liofilizados se resuspendieron en agua destilada hasta una concentración del 10 % de cada uno de los rendimientos obtenidos, mientras que los obtenidos con solventes orgánicos se utilizaron puros después de la utilización del rotavapor. Para el ensayo de difusión se embebieron discos de

Tabla 1. Enterobacterias patógenas utilizadas para los ensayos de inhibición bacteriana

Microorganismo	Identificación	Serotipo/Serovar	Caracterización genotípica	Origen
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	L12		<i>aggR</i>	caso clínico
<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	L14		<i>ipaH</i>	caso clínico
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	L22		<i>lt/st</i>	caso clínico
<i>Staphylococcus aureus</i>	L290		<i>sea</i>	alimentos
<i>Shigella flexneri</i>	L392			
<i>Escherichia coli</i>	L564	O157:H7	<i>stx2/fliC_{H7}/rfb_{O157}</i>	carne picada
<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	L1046	O26:H11	<i>stx1/stx2</i>	carne picada
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	L1122	O177:H11	<i>eae</i>	carne bovina
<i>Salmonella</i>	L1492	enteritidis		carne picada
<i>Salmonella</i>	L1570	typhimurium		carne de frigorífico

papel de filtro (Whatman® 91, *wet strengthened qualitative*, Maidstone, England) de 4 mm de diámetro a saturación, colocando no más de cuatro discos por placa (Figura 1). Los ensayos se realizaron por duplicado. La medición del poder inhibitorio antibacteriano se determinó cualitativamente mediante la formación de halos de inhibición, los que se clasificaron en dos categorías: inhibitorio (+) y no inhibitorio (-).

2.2. Determinación de actividad bacteriostática/bactericida de los extractos vegetales

Los extractos vegetales y las cepas que en el ensayo de inhibición por difusión en agar presentaron halos de inhibición bacteriana, se utilizaron para el ensayo de la actividad bactericida/bacteriostática según Henao Riveros (2003). Brevemente, en un tubo de ensayo estéril se colocaron 5 ml del extracto puro a ensayar (metanólico, etanólico) y se agregaron 0,5 ml de un cultivo puro de cada enterobacteria. El momento que se mezcla el extracto puro con el microorganismo se considera como tiempo 0 (t_0). En t_0 , a 2,5, 5 y 10 min, se transfirieron dos ansadas a tubos con 5 ml de caldo nutritivo (Britania, Argentina) y luego se incubaron durante 24 h a 37 °C. En los tubos en los que se observó un crecimiento microbiano (+) en los diferentes tiempos, pero no en el inicial t_0 , los extractos fueron considerados bacteriostáticos. En los tubos en los que no se observó desarrollo microbiano (-), los extractos fueron considerados bactericidas.

Resultados y discusión

Los extractos de condimentos y especias se han estudiado desde el punto de vista funcional, si tienen actividad antimicrobiana, si actúan como agentes antioxidantes o si aportan nutrientes. Las

propiedades funcionales de los extractos varían con la proporción de los compuestos presentes. Para especias diferentes se obtienen respuestas diferentes en su actividad antimicrobiana de acuerdo a las condiciones en las que se procesan (Peredo-Luna *et al.*, 2009). Las muestras extraídas en este trabajo con solventes orgánicos, maceradas y concentradas con el uso del rotavapor, mostraron poder inhibitorio, no así los extractos etanólicos y metanólicos sin maceración, ni los acuosos, con excepción del extracto acuoso de canela sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* (Tabla 2). Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta que, para extraer los principios activos con actividad antibacteriana, el solvente debe penetrar y disolverlos. En cambio, los extractos acuosos no se maceran, ya que pueden propiciar la fermentación o la formación de mohos (González Villa, 2004). Herrera Arias y García-Rico (2006) también demostraron que los extractos acuosos de canela tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la cepa de *S. aureus*. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos por los autores antes mencionados, las cepas de *E. coli* y *Salmonella* spp. utilizadas en el presente trabajo no fueron sensibles al extracto de canela, lo que estaría indicando que el poder inhibitorio es específico de variedad de especie, siendo las utilizadas en este trabajo cepas autóctonas.

Los extractos etanólicos presentaron poder inhibitorio solo frente a la cepa de *S. aureus*. Estos resultados coinciden con los hallados por Burt (2004), siendo los organismos gram[+] ligeramente más sensibles que los gram[-].

Los resultados más efectivos se obtuvieron a partir de los extractos vegetales obtenidos con metanol. El molle inhibió el desarrollo de *S. aureus*. La canela inhibió a *S. aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *Salmonella* ser. enteritidis y *S. ser. typhimurium*. La muña inhibió a *S. aureus*. El sésamo no inhibió a ninguna de las enterobacterias ensayadas.

Tabla 2. Ensayo de inhibición de los extractos vegetales sobre las enterobacterias patógenas

Microorganismo	molle			canela			muña			sésamo			sésamo + molle			sésamo + canela			
	A	E	M	A	E	M	A	E	M	A	E	M	A	E	M	A	E	M	
<i>E. coli</i> (EAEC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i> (EIEC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i> (ETEC)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. aureus</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+
<i>S. flexneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i> (O157)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i> (STEC)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i> (EPEC)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. ser. enteritidis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>S. ser. typhimurium</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

A: extracción acuosa; E: extracción etanólica con maceración; M: extracción metanólica con maceración

En la literatura se registran numerosas combinaciones de extractos vegetales para potenciar su actividad, como la canela más el clavo de olor (Pastrana Puche *et al.*, 2017). En el presente trabajo, la combinación del sésamo con el molle produjo inhibición de *S. aureus*, mientras que la combinación del sésamo con la canela inhibió el desarrollo de todas las cepas ensayadas. Asimismo, estudios anteriores como los de Amara *et al.*, (2008) y Huamán *et al.*, (2003) demostraron la actividad antibacteriana del extracto metanólico de la canela (que en este trabajo fueron preparados a partir de la corteza).

La evaluación del efecto bacteriostático/bactericida puede observarse en la Tabla 3. La mayoría de los extractos ensayados presentaron efecto bacteriostático a t_0 , mientras que el efecto bactericida solo se observó en la canela frente a *S. ser. typhimurium* a 5 min y frente a *E. coli* O157:H7 a 10 min. Los extractos de molle, molle + sésamo y muña frente a *S. aureus* no presentaron ningún tipo de efecto. Esto puede relacionarse con lo descrito por diversos investigadores que han demostrado que se requieren altas concentraciones de principios activos de extractos vegetales para lograr inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos (Rodríguez Pava *et al.*, 2017).

En la literatura se registran numerosas combinaciones de extractos vegetales para potenciar su actividad, como la canela más el clavo de olor (Pastrana Puche *et al.*, 2017). En el presente trabajo, la combinación del sésamo con el molle produjo inhibición de *S. aureus*, mientras que la combinación del sésamo con la canela inhibió el desarrollo de todas las cepas ensayadas. Asimismo, estudios anteriores como los de Amara *et al.*, (2008) y Huamán *et al.*, (2003)

demonstraron la actividad antibacteriana del extracto metanólico de la corteza de canela.

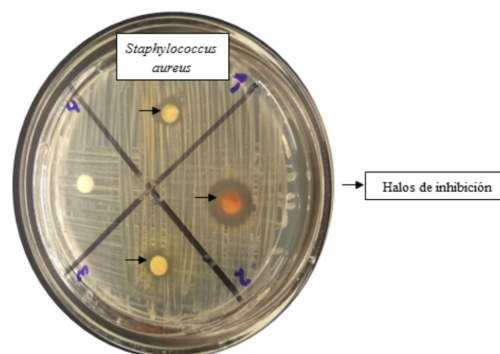


Figura 1. Poder inhibitorio de extractos vegetales sobre el *Staphylococcus aureus*. Método de difusión en agar nutritivo por disco frente a molle (1), canela (2), muña (3), sésamo (4). La flecha indica los halos de inhibición.

La evaluación del efecto bacteriostático/bactericida puede observarse en la Tabla 3. La mayoría de los extractos ensayados presentaron efecto bacteriostático a t_0 , mientras que el efecto bactericida solo se observó en la canela frente a *S. ser. typhimurium* a 5 min y frente a *E. coli* O157:H7 a 10 min. Los extractos de molle, molle + sésamo y muña frente a *S. aureus* no presentaron ningún tipo de efecto. Esto puede relacionarse con lo descrito por diversos investigadores que han demostrado que se requieren altas concentraciones de principios activos de extractos vegetales

Tabla 3. Evaluación del efecto bacteriostático/bactericida de los extractos vegetales (EV)

Microorganismos + EV	Tiempo (min)			
	0	2.5	5	10
<i>S. aureus</i> + molle	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> + canela	-	+	+	+
<i>S. aureus</i> + muña	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> + (molle + sésamo)	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> + (canela + sésamo)	-	+	+	+
<i>S. flexneri</i> + (canela + sésamo)	-	+	+	+
<i>E. coli</i> (EAEC) + (canela + sésamo)	-	+	+	+
<i>E. coli</i> (ETEC) + (canela + sésamo)	-	+	+	+
<i>S. typhimurium</i> + (canela + sésamo)	-	+	+	+
<i>S. typhimurium</i> + canela	-	+	-	-
<i>S. enteritidis</i> + (canela + sésamo)	-	+	+	+
<i>S. enteritidis</i> + canela	-	+	+	+
<i>E. coli</i> (EPEC) + (canela + sésamo)	-	+	+	+
<i>E. coli</i> (EPEC) + canela	-	+	+	+
<i>E. coli</i> (STEC) + (canela + sésamo)	-	+	+	+
<i>E. coli</i> (STEC) + canela	-	+	+	+
<i>E. coli</i> (EIEC) + (canela + sésamo)	-	+	+	+
<i>E. coli</i> (O157) + (canela + sésamo)	-	+	+	+
<i>E. coli</i> (O157) + canela	-	+	+	-

para lograr inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos (Rodríguez Pava *et al.*, 2017).

Conclusiones

En este trabajo se pudo observar que los extractos con mayor poder inhibitorio sobre enterobacterias patógenas fueron los obtenidos con solventes orgánicos con maceración, mientras que la extracción acuosa no mostró poder inhibitorio. Los extractos de sésamo y canela no mostraron efecto alguno frente a determinadas cepas, en cambio estos extractos combinados, frente a las mismas cepas, mostraron actividad inhibitoria, observándose un efecto sinérgico. La aparición de cepas resistentes a los antibióticos comerciales genera la necesidad de buscar otras alternativas para controlarlas. Tal es el caso del uso de plantas que contienen principios activos capaces de inhibir el crecimiento bacteriano. Por este motivo, los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían ser tenidos en cuenta para futuros usos medicinales contra cepas bacterianas con particular interés en la Salud Pública.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado con insumos propios de la cátedra de Microbiología

Aplicada, perteneciente a la carrera de Microbiología Clínica e Industrial, FCV-UNLP. El equipamiento utilizado fue proporcionado por el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA).

Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Bibliografía

- Amara AA, El-Masry MH, Bogdady HH. 2008. Plant crude extracts could be the solution: extracts showing antitumorigenic activity. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 21(2):159-171.
- Abadie R, Medina R, Ruiz L, Tresierra-Ayala A. 2014. Actividad antibacteriana de extractos vegetales frente a cepas intrahospitalarias, Iquitos-Perú. *Revista ECIPerú*. 11(1), 31-38. doi: 10.33017/RevECIPerú2014.0005
- Alegre A, Iannacone J, Carhuapoma M. 2017. Toxicity of aqueous, ethanolic and hexanic extracts of *Annona muricata*, *Minthostachys mollis*, *Lupinus mutabilis*, and *Chenopodium quinoa* against *Tetranychus urticae* and *Chrysoperla externa*. *Chilean Journal of*

Agricultural & Animal Sciences. 33(3):273-284.
doi: [10.4067/s0719-389020017005000705](https://doi.org/10.4067/s0719-389020017005000705)

Arias JP, Silva GA, Figueroa IC, Fischer SG, Robles-Bermúdez A, Rodríguez-Maciél JC, Lagunes-Tejeda A. 2017. Actividad insecticida, repelente y antialimentaria del polvo y aceite esencial de frutos de *Schinus molle* L. para el control de *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences. 33(2):93-104.
doi: [10.4067/s0719-38902017005000301](https://doi.org/10.4067/s0719-38902017005000301)

Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some *lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54(5):1822-1828.
doi: [10.1021/jf051922u](https://doi.org/10.1021/jf051922u)

Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. International Journal of Food Microbiology. 94(3):223-253.
doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022)

Castro Montoya JM, Rangel-Peraza JG, Piña-Hernández CJ, Mora-Rochín S, Rochín-Medina JJ. 2015. Actividad antioxidante de compuestos fenólicos en semillas de ajonjolí y su efecto sobre el crecimiento bacteriano. Revista Iberoamericana de Ciencias. Disponible en: www.reibci.org

Darré M, Valerga L, Araque LCO, Lemoine ML, Demkura PV, Vicente AR, Concellón A. 2017. Role of UV-B irradiation dose and intensity on color retention and antioxidant elicitation in broccoli florets (*Brassica oleracea* var. Italica). Postharvest biology and technology, 128, 76-82.
doi: [10.1016/j.postharvbio.2017.02.003](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.02.003)

Deveci O, Sukan A, Tuzun N, Hames Kocabas EE. 2010. Chemical composition, repellent and antimicrobial activity of *Schinus molle* L. Journal of Medicinal Plants Research. 4(21):2211-2216.
doi: [10.5897/JMPR10.326](https://doi.org/10.5897/JMPR10.326)

García C, Martínez A, Ortega J, Castro F. 2010. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. Química Viva. Vol. 2(1): 12-21.

González Villa ÁA. 2004. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas (Disertación doctoral, Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales). Disponible en: www.bdigital.unal.edu.co/1173

Henao Riveros SC. 2003. Actividad bactericida del ácido hipocloroso. Revista Facultad de Medicina, 51(3), 136-142.

Herrera Arias F, García-Rico RO. 2006. Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 4(2), 13-19.

Huamán S, Hurtado H, Kong V, León C, León D, Lister P, Miñano K, Orrego F, Santillán L. 2003. Estudio toxicológico y teratogénico del extracto metanólico de *Cinnamomum zeylanicum* (canela). Revista Horizonte Medico. Vol 3 No 1 y 2.

Pastrana Puche YI, Durango Villadiego AM, Acevedo Correa D. 2017. Efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre patógenos. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 15(1):56-65. doi: [10.18684/bsaa\(15\)56-65](https://doi.org/10.18684/bsaa(15)56-65)

Peredo-Luna HA, Palou-García E, López-Malo A. 2009. Aceites esenciales: métodos de extracción. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 3(1): 24-32. [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)

Ramírez-Albores JE. 2013. Distribución y abundancia de Musa velutina en un bosque nuboso, Ángeles de San Ramón, Alajuela, Costa Rica. Boletín de la Red Latinoamericana para el Estudio de Especies Invasoras. 3(1):16-22.

Rodríguez Pava CN, Zarate Sanabria AG, Sánchez Leal LC. 2017. Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. Nova, 15(27), 119-129.

Sánchez Miranda L. 2013. Determinación de compuestos funcionales en canela (*Cinnamomum zeylanicum*). Disponible en: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/25267/S%C3%81NCHEZ%20MIRANDA%20LUISA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Shiva Ramayoni CM. 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universitat Autònoma de Barcelona. Disponible en: www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5606/cmsr1de1.pdf?sequence=1

Wong YC, Ahmad-Mudzaqqir MY, Wan-Nurdiyana WA. 2014. Extraction of essential oil from cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*). Oriental Journal of Chemistry. 30(1):37-47.
doi: [10.13005/ojc/300105](https://doi.org/10.13005/ojc/300105)

Inseminación artificial en la especie porcina: dosis inseminante en relación con el lugar de deposición

Artificial insemination in the swine species: inseminating dose related to the deposition place

COMPAGNONI MARICEL VANINA^{1,3} * , TITTARELLI CLAUDIA MARCELA¹, 
WILLIAMS SARA INÉS^{1,2} 

1. Cátedra de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Argentina. 2. Cátedra de Producción Porcina. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Argentina. 3. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET-CCT-La Plata), Argentina.

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

Resumen

La inseminación artificial en la especie porcina es una herramienta de gran utilidad que permite grandes avances en la industria porcícola, tanto en nuestro país como en el mundo. La inseminación artificial es una herramienta biotecnológica de la reproducción que se aplica en la producción animal con el fin de aumentar la eficiencia productiva, lograr un mayor progreso genético e incrementar el desempeño reproductivo. Existen diferentes métodos de inseminación artificial en porcinos que permiten variar el volumen y la cantidad de espermatozoides de la dosis inseminante al modificar el lugar de deposición de esta. El objetivo de esta revisión fue recopilar y actualizar información relevante sobre la inseminación artificial en la especie porcina, relacionando la dosis seminal y el método de conservación con la técnica empleada.

Palabras clave

Porcino, semen, inseminación artificial, dosis inseminante

Abstract

Artificial insemination is a very useful tool that allows huge advances in the swine industry all around the world. The use of artificial insemination for breeding pigs has facilitated global improvements in genetic and reproductive performances. There are variations of the technique with differences in the volume and number of sperm per dose according to the place of deposition of the semen. This review is a compilation and update of relevant information on artificial insemination in swine, relating the seminal dose and the preservation method with the technique used.

Key words

Swine, sperm, artificial insemination, inseminating dose

Introducción

La biotecnología ofrece técnicas que aplicadas a la reproducción animal aumentan la eficiencia productiva en diferentes especies domésticas. Su objetivo es lograr un mayor progreso genético para incrementar la producción de leche, lana, pelo y carne, según la especie en cuestión (Palma, 2001). Un ejemplo de ellas es la inseminación artificial (IA), método de reproducción asistida que consiste en colocar espermatozoides viables en el tracto reproductivo de una hembra en celo, con el objetivo de lograr una preñez exitosa. De manera más extensa podemos definir a la IA como la técnica mediante la cual es posible extraer semen a un reproductor, diluirlo y conservarlo, con el propósito de llevarlo al lugar ideal del aparato genital de la hembra, a fin de fecundarla, realizando esta técnica en el momento oportuno y con el instrumental adecuado (Rillo, 1982). La mejor forma de aprovechar el potencial genético de un verraco es la IA, por el efecto multiplicador que la misma ejerce sobre el semen. Además, facilita la implementación de programas de cruzamiento, mejores controles sanitarios, de bioseguridad y productivos (Rillo, 1982). Actualmente, se utiliza como herramienta para aplicar otras nuevas técnicas de la reproducción, como son el sexado de espermatozoides, la criopreservación de semen y otros métodos mucho más complejos, como la transgénesis (Palma, 2001).

Uno de los objetivos primordiales de la IA es incrementar el recurso macho; para ello, luego de la extracción de semen, este se diluye para obtener dosis seminales que contengan una cantidad de espermatozoides apropiada según los métodos de conservación y de IA que se utilizarán. Es así como el semen de machos de alto mérito genético puede ser utilizado para inseminar de 10 a 20 cerdas partiendo de un único eyaculado (Rillo, 1982). Como se podrá deducir de lo expresado anteriormente, la cantidad de espermatozoides por dosis modificará de forma directa el rendimiento del eyaculado.

Es de suma importancia determinar el momento ideal para realizar la IA. Esto es debido a que, en la especie porcina, no solo es importante conseguir la preñez, sino, además, obtener la mayor cantidad de embriones posible en cada gestación, para lograr un tamaño de camada adecuado a las exigencias productivas de cada establecimiento comercial.

La IA en la especie porcina ha sido un instrumento de gran utilidad para la mejora global de las piaras en cuanto a fertilidad, genética, sanidad y manejo. Los primeros avances logrados en conservación de semen permitieron extender la vida útil de las dosis seminales hasta por 3 días, lo que posibilitó su envío a distancias relativamente próximas al lugar donde se encontraban los machos. Con los progresos en el desarrollo de diluyentes de larga duración, la capacidad de conservar semen durante un período más prolongado

abrió las puertas a una rápida aceptación de la IA en todo el mundo (Knox, 2016).

En la actualidad, las granjas comerciales utilizan la IA para realizar los servicios. Los mismos se efectúan en el momento que se detecta el celo, recibiendo cada hembra al menos dos dosis de semen por ciclo. Esta práctica permite reducir el porcentaje de machos en el establecimiento al 1-2 % (Franco, 2012).

Los últimos avances realizados para incrementar la mejora genética a través del uso de la IA se centraron en reducir la cantidad de espermatozoides por dosis y la cantidad de IA por celo, con el objetivo de lograr una preñez exitosa luego de realizar una única IA posterior a la inducción de la ovulación (inseminación artificial a tiempo fijo). Ambos enfoques permiten una mayor presión de selección para caracteres económicamente importantes desde el punto de vista productivo, y ayudan a extender las ventajas genéticas a través de la IA a más granjas de producción (Knox, 2016).

El objetivo de esta revisión fue recopilar y actualizar información relevante sobre la IA en la especie porcina, relacionando la dosis seminal y método de conservación, con la técnica empleada.

1.1. La inseminación artificial porcina en el mundo

Los inicios de la técnica de IA en porcinos ocurrieron en los países desarrollados, y su difusión global hizo que llegara a nuestro país para ser adoptada por los productores locales. Las primeras contribuciones para el desarrollo de esta técnica revolucionaria en la especie se realizaron entre 1926 y 1940 en Rusia, Estados Unidos, Japón y Europa. Hacia la década del '60 la monta natural comenzó a ser reemplazada por la IA. Su aplicación fue reportada por primera vez en el Reino Unido, algunos países de Europa (Brassley, 2007) y otros lugares del mundo (Niwa, 1961, citado por Knox, 2016).

Ya para mediados de la década del '80, algunos países de Europa practicaban IA en más del 50% del plantel de reproductoras, mientras que, en otros países, la misma se fue incorporando de manera gradual (Crabo, 1991). Asimismo, en esta década, se constituyeron los primeros centros de IA, en los que una cantidad significativa de verracos fueron confinados con el objetivo de producir semen (Reed, 1982).

En muchos países de Europa, durante los años '90, los registros indicaban que la mayoría de los cerdos destinados a consumo eran producto del uso de la IA. En el año 2000, el incremento de la utilización de la IA en el mundo llevó a que prácticamente todos los cerdos fueran producidos mediante esta técnica (Weitze, 2000). Su incorporación en muchos países en desarrollo también ocurrió a pesar de las limitaciones de infraestructura.

La eficiencia y las ganancias de las producciones comerciales están ligadas al uso de la IA. Los registros reproductivos de cientos de miles de cerdas mostraron, ya en 1990, que las tasas de partos logrados con el uso de IA variaban entre el 80 y el 90 % y que el tamaño de las camadas obtenidas era de 11 a 13 lechones (Colenbrander *et al.*, 1993; PigCHAMP Benchmarking, 2012). Más recientemente, en el año 2014, datos provenientes de un relevamiento de 1,3 millones de cerdas, mostraron una tasa de parto del 86 %, con un promedio de 14 lechones nacidos totales (Yeste *et al.*, 2014). A pesar de esto, el nivel de fertilidad alcanzado es muy variable entre países y granjas y puede atribuirse a diferencias en los métodos de trabajo a la hora de producir las dosis seminales y efectuar la IA propiamente dicha.

1.2. La inseminación artificial porcina en la República Argentina

En Argentina, el uso de la IA en la especie porcina se inició en 1953, cuando se creía que su aplicación era de utilidad solo con fines científicos (Cano & García Mata, 1953). No fue sino hasta la década del '70 que algunos profesionales del ámbito privado hicieron esfuerzos aislados para implementar esta técnica en establecimientos comerciales. Si bien para esta época la inseminación en bovinos era ampliamente conocida y su empleo se hacía cada vez más creciente, no ocurría lo mismo en el sector porcino (Arisnabarreta & Allende, 2017). La falta de difusión entre los productores porcícolas pudo deberse al escaso interés de estos por intentar una mejora genética de sus plantales. Otros inconvenientes con los que debían lidiar, era la imposibilidad de conservar el material seminal durante tiempos prolongados y la incertidumbre de cuál sería el momento óptimo para realizar la inseminación, debido a la relativamente larga duración del celo (Arisnabarreta & Allende, 2017).

Marotta (1973; 1978), docente y difusor de la IA porcina desde una perspectiva académica, publicó en la Revista de la Sociedad de Medicina Veterinaria, dos artículos detallando, por un lado, las características del semen y la eyaculación (extracción, conservación y dilución del material seminal) y, por el otro, el tiempo de conservación y la técnica de inseminación. Sin embargo, en lo que respecta a su aplicación, solo mencionó a los grandes productores mundiales de carne de cerdo (Japón, Europa y Estados Unidos) como países que la utilizaban.

Hacia la década del '80 se establecieron los primeros dos centros de IA porcina. En estas instalaciones se pretendía recolectar, procesar, acondicionar y enviar a distancia el material seminal de verracos entrenados para dicho fin. Uno de ellos fue el Centro de IA porcina de Inrville (Córdoba), con instalaciones modelo, diseñadas

bajo la supervisión técnica del INRA (Instituto Nacional de Investigación Agronómica de Francia) aunque, por diferentes razones, este centro nunca llegó a funcionar como tal. El segundo, fue el Centro de IA porcino CAR-CIAVT que funcionó en el Centro Agrotécnico Regional de Venado Tuerto (Santa Fe), bajo la dirección técnica del CIAVT (Centro de Inseminación Artificial de Venado Tuerto). Uno de sus objetivos fue capacitar a los potenciales usuarios, productores y profesionales, en el manejo de la técnica de la IA porcina. El CAR-CIAVT trabajó durante cinco años, con diez verracos de diferentes razas, la mitad de los cuales se importaron de Canadá y Estados Unidos. Si bien desde el punto de vista técnico este proyecto fue un éxito, no logró alcanzar las expectativas comerciales esperadas, debido a que solo pudieron comercializar 2400 dosis/año. En consecuencia, se decidió devolver los verracos a sus propietarios y capacitar al personal para que realizara la obtención y dilución del semen en sus propios establecimientos comerciales (Arisnabarreta & Allende, 2017), modalidad que actualmente se sigue poniendo en práctica.

Según Arisnabarreta y Allende (2017), durante los últimos años de la década del '90 en Argentina, la aplicación de la IA porcina se difundió ampliamente, impulsada por el desarrollo de programas de mejoramiento genético. Coincidentemente, Riesenbeck (2011), menciona un significativo crecimiento de la producción porcina, de alrededor del 112% en la primera década del siglo XXI. Dicho crecimiento se vio acompañado de un mayor desarrollo tecnológico en las explotaciones, como fue la implementación de la IA en el 85 % de las hembras en sistemas en confinamiento, con la utilización anual de más de un millón de dosis seminales (Williams, 2015, citado por Arisnabarreta & Allende, 2017).

Actualmente, en nuestro país, la obtención de los eyaculados y el procesamiento del material seminal se realizan mayoritariamente en los mismos establecimientos en que se encuentran las hembras (granjas comerciales) o en lugares muy próximos a estos. Una alternativa a esta estrategia son los centros de IA porcina, cuyo radio de acción regional asegura la conservación de la viabilidad y fertilidad del material seminal procesado.

2. Parámetros indicativos de calidad seminal

Cuando se conserva material seminal para realizar IA es importante tener en cuenta la calidad del semen utilizado, sobre la base de parámetros mínimos de aceptación que determinan si el eyaculado obtenido puede ser utilizado con éxito.

La evaluación del semen comprende el examen macroscópico, que incluye la medición del volumen, el pH mediante tiras reactivas y la

Tabla 1. Valores de referencia y límites de aceptabilidad de diferentes parámetros de semen fresco porcino

Parámetros	Valores de referencia	Límite de aceptabilidad
Motilidad	>75 %	60%
Concentración (fracción rica)	700-800 x 10 ⁶ /ml	
Malformaciones	10-15%	
Espermatozoides normales		70%
Acrosomas dañados	10%	
Acrosomas normales		75%
pH	6,8-7,3	

Extraído de Williams (2015)

apreciación del olor, el color y el aspecto. Por otro lado, en el examen microscópico se evalúa la motilidad individual, el recuento celular (concentración), las formas anormales, la vitalidad y el grado de aglutinación de la muestra. Otras evaluaciones complementarias que ayudan a categorizar la calidad seminal son el test de resistencia osmótica (ORT, por sus siglas en inglés), la evaluación de la integridad acrosomal y la identificación de gérmenes y antibiograma (Williams, 2015) (Tabla 1).

La evaluación del material seminal es de suma importancia debido a que es un indicador directo de la fertilidad de los verracos (Gadea *et al.*, 1998) y debe tenerse en cuenta a la hora de seleccionar reproductores o decidir la continuidad de los mismos en el plantel (Tabla 2).

Finalmente, considerando que las cerdas son inseminadas con dosis seminales que contienen una determinada cantidad de espermatozoides y que son conservadas a la temperatura adecuada, la calidad de las mismas debe evaluarse para reducir el margen de error previo a la IA. Para ello se tendrán en cuenta los parámetros y valores considerados en el examen microscópico del semen fresco.

3. Lugar de deposición de la dosis

Según el lugar del útero en donde se deposita el material seminal, existen diferentes técnicas de IA en las que varían: el volumen, la cantidad de espermatozoides que se utilizan por dosis (concentración), y la longitud del dispositivo empleado para inseminar (catéter de inseminación). En la actualidad existen tres técnicas utilizadas en la especie porcina; de ellas, dos son muy sencillas de realizar y se utilizan rutinariamente en granjas comerciales. La primera de las técnicas desarrolladas fue la IA convencional (IAC), en la cual, la dosis seminal se deposita en el cuello del útero, ya sea en los anillos más caudales o en el tercio medio del cérvix, dependiendo del catéter que se utilice. La segunda fue la IA post-

cervical (IAPC), que como su nombre lo indica, consiste en atravesar el cérvix y colocar la dosis en el cuerpo del útero. La tercera se denomina IA profunda (IAP) y, en este caso, la dosis seminal se deposita en uno de los cuernos uterinos, favoreciendo la aproximación de los espermatozoides a la unión útero-tubárica, lugar más cercano al sitio donde se produce la fecundación de los ovocitos. Esta técnica se reserva para utilizar semen descongelado, debido a que el mismo posee una sobrevivencia post-descongelación inferior al refrigerado a 15 °C.

Actualmente, los verracos pueden producir entre 20 y 40 dosis de 2,5-3 mil millones de espermatozoides diluidos en un volumen de 75-100 ml para IAC, o bien, 40-60 dosis de 1,5 a 2 mil millones de espermatozoides en volúmenes menores para una IAPC. Esto demuestra que, con la sola modificación de la técnica de IA, se puede duplicar el aprovechamiento de los verracos, práctica ampliamente justificada en el caso de animales de alto índice genético (Knox, 2016). Estudios realizados para probar la eficiencia de la IA con baja cantidad de espermatozoides han dado resultados aceptables, tanto utilizando la técnica de IAC con dosis de 2 y 3 mil millones de espermatozoides en volúmenes convencionales (100 ml) (Feitsma, 2009; Olesen & Hansen, 2009; Watson & Behan, 2002) como realizando una IAPC con mil millones de espermatozoides en volúmenes reducidos (40-50 ml) (Vázquez *et al.*, 2008) (Tabla 3).

3.1. Inseminación artificial convencional

Es la técnica más utilizada, simple y fácil de realizar, en la cual el semen diluido, con un volumen final de 70 a 100 ml, se coloca en el cérvix utilizando un catéter de IA de 54 cm de longitud (Arisnabarreta & Allende, 2017).

La cantidad de espermatozoides probados para una única IAC ha oscilado entre 1 y 40 mil millones de espermatozoides (Kemp & Soede, 1997). Mientras que los primeros trabajos indicaron una fertilidad óptima con 5 a 10 mil millones

Tabla 2. Valores seminales (media±DE) de motilidad, morfoanomalías, gotas citoplasmáticas y colas en látigo y su relación con el porcentaje de parición de hembras inseminadas con semen de padrillos de baja, media y alta fertilidad

Tipo de fertilidad	Parición (%)	Motilidad (%)	Morfoanomalías (%)	Gotas citoplasmáticas (%)	Colas en látigo (%)
Baja	8±3,26	63,7±3,1	43±6,8	26,8±5,6	15,2±2,1
Media	52,63±2,27	74,5±1,7	22,7±4	14,2±3,4	7,2±1,5
Alta	89,03±1,82	76,6±1	11,1±1,9	6,1±1,2	4±1,2

Extraído de Williams (2015)

de espermatozoides, con los avances en los diluyentes, la calidad seminal y los materiales para la inseminación, la cantidad de espermatozoides se ha reducido gradualmente. Es así que en Europa se utilizan dosis de 1,5 a 2 mil millones y en otros países de 2,5 a 4 mil millones de espermatozoides (Kemp & Soede, 1997), obteniendo escasos beneficios para la fertilidad al incrementar la cantidad de los mismos. Se ha mostrado poco efecto sobre la fertilidad cuando se inseminó con 1, 3 o 6 mil millones de espermatozoides, siempre que la inseminación se realice entre 12 y 24 horas antes de la ovulación (Steverink *et al.*, 1997). Actualmente, en muchas partes del mundo se realiza la IAC utilizando dosis de entre 2,5 y 3 mil millones de espermatozoides (Broekhuijse *et al.*, 2011; Knox *et al.*, 2008). Sin embargo, se han realizado ensayos a campo que sugieren que a medida que la cantidad de espermatozoides en la dosis aumentó de 2,5 a 4,5 mil millones también lo hizo el tamaño de la camada (Reicks & Levis, 2008). Asimismo, otro estudio similar demostró que 3 mil millones de espermatozoides utilizados en una IAC aumentaron el tamaño de la camada y la tasa de parto en comparación con el uso de 2 mil millones de espermatozoides (Alm *et al.*, 2006). Los resultados combinados de estos estudios sugieren que una mayor cantidad de espermatozoides proporciona algún tipo de resguardo contra los problemas relacionados con la fertilidad del semen, la estación del año, el operario y el momento de la IA. En la práctica, esta técnica usualmente utiliza una cantidad de espermatozoides por dosis de 3 mil millones (Hormaechea, 2016).

3.2. Inseminación artificial post-cervical

En la inseminación post o transcervical, el material seminal diluido en un volumen final de 30 a 50 ml, conteniendo 1,5 millones de células espermáticas por dosis, se deposita por vía no quirúrgica en el cuerpo del útero, por medio de una cánula que sobresale 15 a 20 cm del interior de un catéter de IAC. La longitud del complejo catéter-cánula es de 73 cm.

Estudios de campo han resultado en tasas

de fertilidad similares al realizar dos IAPC, tanto con dosis de 1,5 como con 3 mil millones de espermatozoides en volúmenes reducidos (40-60 ml). Por su parte, Hernández-Caravaca *et al.* (2012), utilizando dosis de mil millones de espermatozoides, lograron en promedio una tasa de partos del 84 % y un tamaño de la camada de 13,9 lechones nacidos totales, valores más que aceptables para estos parámetros productivos. Adicionalmente, se ha comprobado que la IAPC en sí misma no mejora la fertilidad cuando se usa una mayor cantidad de espermatozoides (3 mil millones) (Peltoniemi *et al.*, 2009). Si bien, Rozeboom *et al.* (2004) han reportado menor tasa de partos y tamaño de camada con menos de mil millones de espermatozoides, Mezalira *et al.* (2005) consiguieron una buena fertilidad utilizando solo 500 millones si la inseminación se realiza 24 horas antes de la ovulación.

Parece poco probable que los resultados de fertilidad sean similares para ambas técnicas de inseminación, dadas las diferencias que poseen, pero esto es posible gracias a que los elementos críticos importantes para la fertilidad se adaptan a cada tipo de inseminación, como son la cantidad de espermatozoides y el volumen de la dosis.

Con la finalidad de reducir la cantidad de espermatozoides por dosis, el uso comercial de la IAPC continúa aumentando en todo el mundo; cada vez más proveedores de reproductores o de material genético en dosis seminales, producen dosis con baja cantidad de espermatozoides en volúmenes reducidos y recipientes más pequeños.

A diferencia de la monta natural, en la IA no existe un tapón gelatinoso que obture el cérvix para disminuir el reflujo del material seminal luego del servicio (Lovell & Getty, 1968). Esto predispone a que las contracciones miométricas que ayudan al transporte del esperma a través del cuerpo y cuernos uterinos, ocasionen el reflujo de parte de la dosis luego de la IA. Esta respuesta uterina se produce con el fin de eliminar el exceso de esperma y secreciones, preparando al útero para la futura preñez (Steverink *et al.*, 1998). Está comprobado que, dentro de las 2 horas posteriores a la IA, el 60 % de los espermatozoides de la dosis, son eliminados por polimorfocitos neutrófilos

Tabla 3. Comparación de la fertilidad y fecundidad de cerdas después de haber sido inseminadas dos veces en el mismo estro con un dispositivo estándar (Goldenpig®: control) y uno novedoso para su utilización en inseminación post-cervical (Deepgoldenpig™)

Dispositivo	Dosis inseminante (mil millones)	Preñez (%)	Parto (%)	Nacidos totales	Nacidos vivos
Goldenpig®	1	66,2	65,8	10,3	9,0
	2	91,1	91,8	12,6	10,9
	3	91,3	91,1	12,5	10,9
Deepgoldenpig™	1	88,7	86,9	12,1	10,9
	2	92,6	92,5	12,3	10,8
	3	91,8	90,5	12,3	11,0
Total (N)		3230	3201	2768	2768

Extraído y modificado de Watson & Behan (2002)

del endometrio y por el reflujo vaginal (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005; Willenburg *et al.*, 2003). Se ha demostrado que esto ocurre tanto al inseminar con diluyente solo, como utilizando una dosis seminal, aunque en este último caso, la presencia de espermatozoides pareció incrementar notablemente la respuesta celular (Rozeboom *et al.*, 1998). Además, se observó que con la exposición al padrillo durante la IAC dicho reflujo disminuía (Willemburg *et al.*, 2003).

Con la IAPC en muchos casos ocurren fugas o reflujos de dosis similares a los de la IAC, aunque esto es más común en la IAC por la incorrecta colocación del catéter y por la excesiva velocidad a la cual se deposita el semen. Asimismo, es normal que haya reflujo de dosis, cuando estas son voluminosas hasta 1-2 horas luego de la inseminación (Hernández-Caravaca *et al.*, 2012).

Por otro lado, se dispone de pocos estudios sobre el uso de la IAPC en cerdas nulíparas. En condiciones de campo, y utilizando el dispositivo tradicional para cerdas multíparas, da Rosa Ulguim *et al.* (2018) observaron que la cánula solo llegaba 10 cm más allá del cuello uterino en el 44 % de las cerdas nulíparas en el primer intento. En otro informe, se logró un éxito total en aproximadamente el 20 % de los casos con un dispositivo para multíparas, aunque este bajo índice de éxito aumentó al 60,3 % en el primer intento con un dispositivo diseñado específicamente para la IAPC en primerizas (Hernández-Caravaca *et al.*, 2017). Resulta necesario realizar más investigaciones para optimizar la IAPC en hembras nulíparas, dado que existen diferencias en la porción craneal del cuello uterino entre nulíparas y multíparas (García-Vázquez *et al.*, 2019). El diseño de dispositivos especiales de IA de acuerdo con la forma del cuello uterino puede ser una solución para mejorar el éxito de la IAPC en las diferentes categorías de cerdas (Llamas-López *et al.*, 2019).

3.3. Inseminación artificial profunda

Finalmente, con el fin de reducir aún más la cantidad de espermatozoides en la dosis seminal, se desarrolló la IAP (Vázquez *et al.*, 2005). Fue diseñada para el uso de semen criopreservado o sexado, con valores de viabilidad y fertilidad inferiores a los de semen fresco o refrigerado a 15 °C, con el objetivo de incrementar al máximo la posibilidad de una preñez. En la IAP los espermatozoides se depositan en uno de los cuernos, lo más cerca posible de la unión útero-tubárica, con un catéter y una cánula de aproximadamente 148 cm. Con esta técnica se minimiza el reflujo y los efectos de las células de la inflamación, particularmente polimorfonucleares neutrófilos, lo que permite reducir la cantidad de espermatozoides y el volumen de las dosis. Mediante esta técnica, se han logrado preñeces usando dosis de 50 a 200 millones de espermatozoides de semen fresco, de 70 a 140 millones de espermatozoides de semen sexado mediante citometría de flujo y de mil millones de espermatozoides congelados-descongelados (Roca *et al.*, 2003).

Sin embargo, el alto costo del catéter para este procedimiento y las dificultades en la ejecución de la técnica, aún representan impedimentos para su implementación en granjas comerciales. Además, los resultados de la eficiencia reproductiva son inferiores cuando se los compara con los obtenidos con la IAPC (Tabla 4).

4. Momento de la inseminación

Si bien son varios los factores que influyen en la tasa de fecundación, como por ejemplo el entrenamiento de los operarios que realizan la detección de celo y la IA, la alimentación del plantel reproductor y factores medio ambientales, la calidad seminal junto con el momento de la

Tabla 4. Tasas de fecundación y parto, y tamaño de camada de cerdas tratadas hormonalmente al destete e inseminadas una vez con procedimiento intrauterino profundo, usando un bajo número de espermatozoides frescos (150×10^6) y descongelados (1000×10^6) o inseminadas convencionalmente utilizando semen descongelado (6000×10^6)

	Inseminación intrauterina profunda		Inseminación convencional
	Semen descongelado	Semen fresco	Semen descongelado
N° cerdas inseminadas	49	29	33
N° cerdas que no retornaron al estro (%)	42/49 (85,71)	24/29 (82,76)	27/33 (81,82)
N° cerdas preñadas al día 28 (%)	39/49 (79,59)	24/29 (82,76)	26/33 (78,79)
N° cerdas que abortaron (%)	1/39 (2,56)	0 (0,0)	1 (3,85)
N° cerdas al parto (%)	38/49 (77,55)	24/29 (82,76)	25/33 (75,76)
Lechones nacidos (media \pm ES)	354 (9,31 \pm 0,41)	239 (9,96 \pm 0,32)	240 (9,6 \pm 0,53)

Extraído y modificado de Roca et al. (2003)

inseminación son factores determinantes para la ocurrencia de una preñez.

La IA puede realizarse en el mismo momento en el que se detecta el celo o bien pueden identificarse las hembras en celo para realizarla posteriormente. La detección de celo y la técnica de inseminación suelen estar relacionadas con el diseño de las granjas (animales confinados en jaulas o en corrales grupales acordes con las normas de bienestar animal). Kemp *et al.* (2005) comprobaron que la detección del celo puede realizarse sin dificultades independientemente del sistema de alojamiento en el que se encuentren los animales. Sin embargo, se observó que el grado de expresión del celo puede disminuir por efecto del reagrupamiento luego del destete (Rault *et al.*, 2014) o por estar las cerdas en continuo contacto con los verracos (Knox *et al.*, 2004). Por otro lado, la proximidad del verraco puede acentuar la expresión del celo e inducir la ovulación en cerdas primíparas y múltiparas luego del destete, al trasladarlas al sitio de la granja donde toman contacto con el mismo, diariamente y de forma intermitente (sitio 1) (Langendijk *et al.*, 2006).

Para las cerdas alojadas en jaula, la exposición al verraco se lleva a cabo durante 1 a 2 minutos mientras este recorre las hileras frente a las cerdas y simultáneamente un operario aplica presión en los cuartos traseros de estas.

En alojamientos grupales, la detección de celo se puede realizar observando el comportamiento de las cerdas cuando un macho es puesto en las cercanías del corral o dentro del mismo.

Una tercera alternativa para gestaciones grupales, aunque más costosa, es la detección de celo electrónica, que puede ayudar a identificar cerdas en celo usando registros de visitas a un macho adyacente, tomados durante 24 horas (Bressers *et al.*, 1991; Cornou, 2006).

Considerando que aproximadamente entre

el 75 % y el 80 % de las hembras del plantel reproductor son cerdas, y el resto son hembras de reposición, las cuotas de servicio se organizan sobre la base de un evento constante como es el destete. La mayoría de las cerdas expresan celo entre los días 4 y 6 post-destete y los registros indican que el 90 % de las mismas muestran celo y se inseminan dentro de los primeros 7 días (Olesen, 2011, citado por Knox 2016; Yeste *et al.*, 2014). Aunque la mayoría de las cerdas recibirán dos dosis seminales por ciclo, un bajo porcentaje de las mismas puede recibir una dosis o hasta tres dosis, según la duración del celo. En granjas que no disponen de un centro de IA dentro del establecimiento, las entregas programadas de dosis deberían ocurrir antes de que las cerdas comiencen a expresar el celo post-destete, manteniéndolas almacenadas a 15-17 °C.

Estos protocolos consideran la presencia del verraco durante la IA. Dicho manejo tiene por objetivo mantener a la cerda de pie y promover las contracciones miométriales que ayudan a la progresión de la dosis seminal a lo largo del útero (Langendijk *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha demostrado que la realización de la inseminación en ausencia del macho no tiene efectos perjudiciales sobre la progresión de la dosis, la retención de espermatozoides o la fertilidad (Willenburg *et al.*, 2003), aunque su presencia tiene efectos facilitadores para la realización de la IA en primerizas.

Si bien actualmente la práctica de IA en presencia del macho es el procedimiento de rutina, requiere trabajo adicional para su movimiento y control. La técnica de IAPC, sin embargo, no requiere la presencia del padrillo en el momento de la inseminación, para no estimular las contracciones del útero (Langendijk *et al.*, 2005).

En granjas comerciales se utiliza un sistema de inseminación múltiple, en el que las hembras reciben una dosis seminal por cada día

Tabla 5. Modelo de protocolos utilizados para realizar inseminación artificial teniendo en cuenta la relación del intervalo destete-celo, en granjas donde se realizan dos detecciones diarias

Presentación de celo post-destete	Detección de celo	Día 1 de detección	Día 2 de detección	Día 3 de detección
Temprano (3-4 días post-destete)	matutina	celo	celo 1 ^{ra} IA	si hay celo 3 ^{ra} IA
	vespertina	celo	celo 2 ^{da} IA	
Normal (5-7 días post-destete)	matutina	celo	celo 2 ^{da} IA	si hay celo 3 ^{ra} IA
	vespertina	celo 1 ^{ra} IA		
Tardío (>7 días post-destete)	matutina	celo 1 ^{ra} IA	si hay celo 3 ^{ra} IA	
	vespertina	celo 2 ^{da} IA		

que se detecta celo positivo (Diehl *et al.*, 1984). La detección precisa del inicio del estro es importante, porque gran parte de los datos de fecundidad demuestran que proporcionar una única dosis de semen es menos efectivo que un sistema de IA múltiple. Como resultado, detectar celo diariamente ayuda a asegurar que un alto porcentaje de cerdas reciba inseminaciones múltiples (Flowers & Esbenschade, 1993; Lamberson & Safranski, 2000).

El grado de respuesta al reflejo de quietud de monta cambia al progresar el estro. Esto podría usarse para ajustar el momento óptimo para realizar la IA, debido a que dicha respuesta, ante la sola presencia del hombre (sin verraco), ocurre solo hacia la mitad del estro y más cerca del momento de ovulación (Langendijk *et al.*, 2000). La duración del estro es variable y su importancia radica en la cantidad de inseminaciones que recibirá la cerda en relación al momento de la ovulación (Weitze *et al.*, 1994). El estro dura de 45 a 65 horas y la ovulación se produce siempre en el último tercio (Soede & Kemp, 1997). La mayoría de los estudios indican que la dehiscencia de todos los folículos ocurre en un lapso de 1 a 3 horas (Flowers & Esbenschade, 1993; Soede *et al.*, 1992; Soede *et al.*, 1997).

Como la mayoría de las hembras del plantel reproductor son cerdas destetadas, la importancia del intervalo destete-estro y estro-ovulación determina el momento de la IA y la fertilidad del servicio (Kemp & Soede, 1997).

Las cerdas que presentan celo poco después del destete tienen un estro de mayor duración, por lo que el intervalo inicio del celo-ovulación también se prolonga, en contraposición a cerdas que tienen su celo post-destete más tardío (celos e intervalo inicio del celo-ovulación más cortos). Es por esta relación que las hembras que manifiestan celo poco después del destete tienen más probabilidades de recibir una tercera dosis, mientras que las que lo hacen más tardíamente,

generalmente reciben una sola IA. Sin embargo, en muchas granjas comerciales se realiza un ajuste del protocolo de IA según la manifestación de celo post-destete, retrasando el primer servicio en cerdas detectadas en celo en los días 3 y 4 post-destete, ya que la mayoría de estas permanecerá en celo durante 2 días más, y aun así recibirán dos dosis por ciclo (Tabla 5).

La fertilidad con el uso de la IA está muy influenciada por el intervalo entre la inseminación y la ovulación y explica gran parte de la variación en la tasa de preñez y el tamaño de la camada. El intervalo entre la inseminación y la ovulación puede influir en la viabilidad de los espermatozoides del reservorio oviductal (Soede *et al.*, 1995), la fertilización del ovocito y la supervivencia embrionaria (Hunter, 1967; 1990).

Soede *et al.* (1995) evaluaron la tasa de fertilidad y la cantidad de embriones normales en cerdas inseminadas entre las 48 horas previas y las 16 horas posteriores a la ovulación (Tabla 6). Asimismo, Nissen *et al.* (1997) obtuvieron mayor tasa de parto y tamaño de la camada en cerdas inseminadas entre 24 horas previas y 4 horas posteriores a la ovulación. En todos los casos se comprobó que las inseminaciones realizadas demasiado temprano o demasiado tarde en el estro, y su relación con la ovulación, pueden reducir la fertilidad, e incluso si se realizan hacia finales del estro pueden aumentar la pérdida de embriones y causar endometritis (Kemp & Soede, 1997).

4.1. Reservorio espermático

La formación del reservorio espermático después de la IA es un aspecto crítico para la fertilidad de los eyaculados. Solo una pequeña proporción de espermatozoides de la dosis seminal sobrevive al proceso de eliminación por reflujo y a los leucocitos endometriales, estableciéndose en

Tabla 6. Estado de los embriones recuperados y de los ovocitos, por cada cerda y para cada intervalo de tiempo inseminación-ovulación de 8 horas (n= 151)

	Cerdas (n)	Estado de los embriones por cerda (%)			% de cerdas con > 90% de embriones normales
		Ovocitos no fertilizados	Embriones degenerados	Embriones normales	
Inseminación antes de la ovulación (en horas)					
>48	1	65 49 ^{ce}	6 8 ^a	29 37 ^d	0 (0)
40-48	6	58 (0-100) 45 ^a	2,5 (0-40) 5	32 (0-95) 47 ^d	1 (17)
32-40	14	50 (0-100) 15 ^{ab}	0 (0-44) 4	44 (0-100) 79 ^{abc}	2 (14)
24-32	19	0 (0-100) 4 ^a	0 (0-27) 3 ^b	87 (0-100) 94 ^a	9 (47)
16-24	24	0 (0-40) 6 ^{ad}	0 (0-40) 2 ^b	100 (20-100) 93 ^a	19 (79)
8-16	24	0 (0-100) 4 ^a	0 (0-13) 2 ^b	100 (0-100) 95 ^a	20 (83)
0-8	21	0 (0-100)	0 (0-11)	100 (0-100)	18 (86)
Inseminación después de la ovulación (en horas)					
0-8	26	19 ^{bcd} 0 (0-100)	4 0 (0-38)	75 ^{ba} 95 (0-100)	14 (54)
16-8	15	33 ^{bc} 6 (0-100)	4 0 (0-22)	62 ^{ce} 76 (0-100)	8 (53)
>16hs	1	100	0	0	0 (0)

La mediana y el rango se expresan entre paréntesis. ^{a b c d e} Los valores con diferentes letras en una columna difieren significativamente ($P < 0,05$). Cerdas que fueron inseminadas más de 48 horas antes de la ovulación y más de 16 horas después de la ovulación no se incluyen en los análisis. Extraído y modificado de Soede et al, (1995).

reservorios en el oviducto (Claus *et al.*, 1985b; First *et al.*, 1968; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005; Woelders & Matthijs, 2001). Una escasa cantidad de espermatozoides llega al oviducto dentro de los 15 minutos posteriores a la IA; dicha cantidad se incrementa considerablemente luego de 2 horas. Colectivamente, estos espermatozoides conforman el reservorio espermático en las trompas, permaneciendo viables durante 24 horas (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005). A pesar de encontrarse en el lugar donde ocurre la fertilización luego de unos minutos posteriores a la IA, los espermatozoides requieren de 2 a 4 horas de exposición al bicarbonato oviductal para modificar su motilidad y estructura de membrana y así capacitarse (Woelders & Matthijs, 2001). La ubicación de los espermatozoides en el reservorio oviductal parece importante para su selección, capacitación, transporte y escape de la fagocitosis (Hunter, 1981; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005). Dicho reservorio

funciona para asegurar que los espermatozoides se mantengan en diferentes estadios de capacitación de manera de permitir la fertilización de los ovocitos a medida que llegan al oviducto (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2001). Este estado de capacitación diferencial también puede servir para modular la liberación de espermatozoides del reservorio, contribuyendo a evitar la polispermia (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005).

4.2. Factores que modifican la fertilidad de la dosis seminal

En el eyaculado del verraco, más precisamente en el plasma seminal, existen hormonas y sustancias que influyen en la fertilidad espermática al modular la supervivencia y el transporte de los espermatozoides (Claus *et al.*, 1985a). El agregado de plasma seminal, estrógenos o prostaglandinas (que se encuentran en el plasma

seminal) u oxitocina (liberada por el útero) a una dosis de IA podría influir en las contracciones uterinas y en el transporte de semen (Flowers & Esbenshade, 1993; Kirkwood *et al.*, 2008; Weiler & Claus, 1990). Además, se ha demostrado que el plasma seminal es importante para modular la respuesta inmune del útero después del apareamiento (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009) permitiendo la supervivencia de los espermatozoides antes de que se produzca la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares del sistema inmune de la cerda (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005).

Finalmente, la adición de oxitocina y prostaglandina F₂α a una dosis de IA, tuvo efectos positivos, más claramente evidenciados cuando la fertilidad de la misma se vio comprometida por un factor limitante, como por ejemplo el tiempo de conservación de la dosis, la cantidad de espermatozoides/dosis o la estación del año (Maes *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 1998).

Conclusiones

1. La inseminación artificial en la especie porcina está en constante desarrollo y permite el aprovechamiento de verracos genéticamente superiores y la aplicación de otras técnicas, como la congelación de semen, el sexado de espermatozoides y la IA a tiempo fijo.

2. El lugar de deposición de la dosis, ya sea de forma convencional, post-cervical o profunda, permite modificar la cantidad de espermatozoides y el volumen de la dosis, logrando un mayor aprovechamiento del potencial de los verracos. Cuanto más se aproxima el lugar de deposición a la unión útero-tubárica (zona de fertilización), menor cantidad de espermatozoides y menor volumen de la dosis seminal es requerida.

3. Cuando la IA se realiza a celo detectado, es importante instaurar protocolos que aseguren la aplicación de la dosis seminal y la formación de un adecuado reservorio de espermatozoides, lo más cercano posible al momento de la ovulación, para alcanzar los porcentajes de preñez y tamaños de camadas acordes a las exigencias de la especie.

Estos conocimientos constituyen la base para futuras mejoras de la técnica de IA en la especie porcina, para incrementar la fertilidad y, consecuentemente, el porcentaje de preñez y el tamaño de camada, mejorando así la eficiencia reproductiva y productiva de los establecimientos comerciales.

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado a través del Proyecto de Incentivos 11/V230 "Monitoreo de la salud animal y utilización de biotecnologías reproductivas para la mejora de la eficiencia

reproductiva en animales de interés productivo y de compañía" bajo la dirección del Dr. R. Luzbel de la Sota y la co-dirección de las Dras. Sara Williams y María Alejandra Stornelli.

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

Alm K, Peltoniemi OAT, Koskinen E, Andersson M. 2006. Porcine field fertility with two different insemination doses and the effect of sperm morphology. *Reproduction in Domestic Animals*. 41(3):210-3.

doi: 10.1111/j.1439-0531.2005.00670.x

Arisnabarreta ER, Allende RA. 2017. Manual de inseminación artificial en porcinos. [libro electrónico] Buenos Aires: Ediciones INTA. Disponible en: http://www.revistataurus.com.ar/uploads/productos/20170903161417_manual_de_inseminacion_artificial_en_porcinos__arisnabarreta_-_allende_.pdf. [Consultado 28/11/2019]

Brassley P. 2007. Cutting across nature? The history of artificial insemination in pigs in the United Kingdom. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*. 38(2):442-61.

doi: 10.1016/j.shpsc.2007.03.008

Bressers HPM, Te Brake JHA, Noordhuizen JPTM. 1991. Oestrus detection in group-housed sows by analysis of data on visits to the boar. *Applied Animal Behaviour Science*. 31(3-4):183-93.

doi: 10.1016/0168-1591(91)90004-H

Broekhuijse MLWJ, Feitsma H, Gadella BM. 2011. Field data analysis of boar semen quality. *Reproduction in Domestic Animals*. 46:59-63.

doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01861.x

Cano A, García Mata E. Cría de cerdos. En: Cano A., García Mata E. 1953. Enciclopedia Agropecuaria Argentina. Buenos Aires, Editorial Sudamericana, pp: 71-121.

Claus R, Schopper D, Wagner HG, Weiler U. 1985a. Photoperiodic influences on reproduction of domestic boars, I. Light influences on testicular steroids in peripheral blood plasma and seminal plasma. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A*.

32:86-98.

doi: [10.1111/j.1439-0442.1985.tb01920.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1985.tb01920.x)

Claus R, Weiler U, Wagner HG. 1985b. Photoperiodic influences on reproduction of domestic boars, II. Light influences on semen characteristics and libido. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A*. 32:99-109.

doi: [10.1111/j.1439-0442.1985.tb01921.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1985.tb01921.x)

Colenbrander B, Feitsma H, Grooten HJ. 1993. Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *Journal of Reproduction and Fertility*. 48:207-15.

Cornou C. 2006. Automated oestrus detection methods in group housed sows: Review of the current methods and perspectives for development. *Livestock Science*. 105(1-3):1-11.

doi: [10.1016/j.livsci.2006.05.023](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.05.023)

Crabo B. 1991. Preservation of boar semen: a worldwide perspective. *Proceedings, 2nd International Conference on Boar semen preservation*, Beltsville MD, 1990, USDA, pp. 3-12.

da Rosa Ulguim R, Vier CM, Betiolo F, Sbardella PE, Bernardi ML, Wentz I, Mellagi AP, Bortolozzo FP. 2018. Insertion of an intrauterine catheter for post-cervical artificial insemination in gilts: a case report. *Semina: Ciências Agrárias*. 39(6):2833-88.

doi: [10.5433/1679-0359.2018v39n6p2833](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n6p2833)

Diehl JR, Day BN, Stevermer EJ. 1984. Artificial insemination in swine. *Pig industry handbook North Carolina Cooperative Extension Service*. pp. 3-6.

Feitsma H. 2009. Artificial insemination in pigs, research and developments in the Netherlands, a review. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37(1):61-71.

First NL, Short RE, Peters JB, Stratman FW. 1968. Transport and loss of boar spermatozoa in the reproductive tract of the sow. *Journal of Animal Science*. 27(4):1037-40.

doi: [10.2527/jas1968.2741037x](https://doi.org/10.2527/jas1968.2741037x)

Flowers WL, Esbenshade KL. 1993. Optimizing management of natural and artificial matings in swine. *Journal of Reproduction and Fertility*. 48:217-28.

Franco R. 2012. Buenas prácticas de manejo en las distintas etapas productivas. En: Beyli ME, Brunori J, Campagna D, Cottura G, Crespo D, Denegri D, Ducommun ML, Faner C, Figueroa ME, Franco R, Giovannini F, Goenaga P, Lomello F, Lloveras M, Millares P, Odetto S, Panichelli D, Pietrantonio J, Rodríguez Fazzone M, Suárez R, Spiner N, Zielinsky G. 2012. Buenas prácticas

pecuarias (BPP) para la producción y comercialización porcina familiar, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. pp. 141-54.

Gadea J, Matás C, Lucas, X. 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration (hIVP) assay. *Animal Reproduction Science*. 54(2):95-108.

doi: [10.1016/S0378-4320\(98\)00144-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(98)00144-4)

García-Vázquez FA, Llamas-López PJ, Jacome MA, Sarrias-Gil L, Albors OL. 2019. Morphological changes in the porcine cervix: A comparison between nulliparous and multiparous sows with regard to post-cervical artificial insemination. *Theriogenology*. 127:120-9.

doi: [10.1016/j.theriogenology.2019.01.004](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.004)

Hernández-Caravaca I, Izquierdo-Rico MJ, Matás C, Carvajal JA, Vieira L, Abril D, Soriano-Úbeda C, García-Vázquez FA. 2012. Reproductive performance and backflow study in cervical and post-cervical artificial insemination in sows. *Animal Reproduction Science*. 136(1-2):14-22.

doi: [10.1016/j.anireprosci.2012.10.007](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.007)

Hernández-Caravaca I, Llamas-López PJ, Izquierdo-Rico MJ, Soriano-Úbeda C, Matás C, Gardón JC, García-Vázquez FA. 2017. Optimization of post-cervical artificial insemination in gilts: Effect of cervical relaxation procedures and catheter type. *Theriogenology*. 90:147-52.

doi: [10.1016/j.theriogenology.2016.11.027](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.027)

Hormaechea S. 2016. Inseminación artificial post-cervical en cerdas. Tesina de pregrado para la orientación Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

<http://www.riada.unicen.edu.ar/xmlui/handle/123456789/1190>

Hunter RHF. 1967. The effects of delayed insemination on fertilization and early cleavage in the pig. *Reproduction*. 13(1):133-47.

doi: [10.1530/jrf.0.0130133](https://doi.org/10.1530/jrf.0.0130133)

Hunter RHF. 1981. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *Reproduction*. 63(1):109-17.

doi: [10.1530/jrf.0.0630109](https://doi.org/10.1530/jrf.0.0630109)

Hunter RHF. 1990. Fertilization of pig eggs in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 40: 211-26.

Kemp B, Soede NM. 1997. Consequences of variation in interval from insemination to ovulation on fertilization in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 52:79-89.

- Kemp B, Soede NM, Langendijk P. 2005. Effects of boar contact and housing conditions on estrus expression in sows. *Theriogenology*. 63(2):643-56. doi: [10.1016/j.theriogenology.2004.09.038](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.038)
- Kirkwood RN, Vadnais ML, Abad M. 2008. Practical application of seminal plasma. *Theriogenology*. 70(8): 1364-7. doi: [10.1016/j.theriogenology.2008.07.018](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.018)
- Knox RV. 2016. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*. 85(1):83-93. doi: [10.1016/j.theriogenology.2015.07.009](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.009)
- Knox RV, Breen SM, Willenburg KL, Roth S, Miller GM, Ruggiero KM, Rodríguez-Zas SL. 2004. Effect of housing system and boar exposure on estrus expression in weaned sows. *Journal of Animal Science*. 82(10):3088-93. doi: [10.2527/2004.82103088x](https://doi.org/10.2527/2004.82103088x)
- Knox R, Levis D, Safranski T, Singleton W. 2008. An update on North American boar stud practices. *Theriogenology*. 70(8):1202-8. doi: [10.1016/j.theriogenology.2008.06.036](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.036)
- Lamberson WR, Safranski TJ. 2000. A model for economic comparison of swine insemination programs. *Theriogenology*. 54(5):799-807. doi: [10.1016/S0093-691X\(00\)00391-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00391-5)
- Langendijk P, Soede NM, Bouwman EG, Kemp B. 2000. Responsiveness to boar stimuli and change in vulvar reddening in relation to ovulation in weaned sows. *Journal of Animal Science*. 78(12): 3019-26. doi: [10.2527/2000.78123019x](https://doi.org/10.2527/2000.78123019x)
- Langendijk P, Soede NM, Kemp B. 2005. Uterine activity, sperm transport, and the role of boar stimuli around insemination in sows. *Theriogenology*. 63(2):500-13. doi: [10.1016/j.theriogenology.2004.09.027](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.027)
- Langendijk P, Soede NM, Kemp B. 2006. Effects of boar stimuli on the follicular phase and on oestrous behaviour in sows. *Society of Reproduction and Fertility*. 62:219-30.
- Llamas-López PJ, López-Úbeda R, López G, Antinoja E, García-Vázquez FA. 2019. A new device for deep cervical artificial insemination in gilts reduces the number of sperm per dose without impairing final reproductive performance. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 10(1):11. doi: [10.1186/s40104-019-0313-1](https://doi.org/10.1186/s40104-019-0313-1)
- Lovell JW, Getty R. 1968. Fate of semen in the uterus of the sow: histologic study of endometrium during the 27 hours after natural service. *American Journal of Veterinary Research*. 29(3): 609-25.
- Maes DGD, Mateusen B, Rijsselaere T, De Vliegher S, Van Soom A, de Kruif A. 2003. Motility characteristics of boar spermatozoa after addition of prostaglandin F2 α . *Theriogenology*. 60(8):1435-43. doi: [10.1016/S0093-691X\(03\)00132-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00132-8)
- Marotta E. 1973. Extracción de semen en el cerdo: técnica y material. *Revista de Medicina Veterinaria*. 54:25-34.
- Marotta E. 1978. Inseminación artificial en la especie porcina. *Revista de Medicina Veterinaria*. 59:310-2.
- Mezalira A, Dallanora D, Bernardi ML, Wentz I, Bortolozzo FP. 2005. Influence of sperm cell dose and post insemination backflow on reproductive performance of intrauterine inseminated sows. *Reproduction in Domestic Animals*. 40(1):1-5. doi: [10.1111/j.1439-0531.2004.00524.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00524.x)
- Nissen AK, Soede NM, Hyttel P, Schmidt M, D'hoore L. 1997. The influence of time of insemination relative to time of ovulation on farrowing frequency and litter size in sows, as investigated by ultrasonography. *Theriogenology*. 47(8):1571-82. doi: [10.1016/S0093-691X\(97\)00162-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00162-3)
- Olesen AK, Hansen C. 2009. Intrauterine insemination of sows by using a two-chamber semen bag system. *Proceeding of 8th International Conference on Pig Reproduction*, Nottingham, UK, pp. 81-2.
- Palma GA, Brem G. *Biotechnología de la reproducción*. En: Palma GA. 2001. *Biotechnología de la Reproducción*. Buenos Aires, Ediciones INTA. pp. 1-14.
- Peltoniemi OAT, Alm K, Andersson M. 2009. Uterine insemination with a standard AI dose in a sow pool system. *Reproduction in Domestic Animals*. 44(3):414-8. doi: [10.1111/j.1439-0531.2008.01094.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01094.x)
- Peña FJ, Domínguez JC, Carbajo M, Anel L, Alegre B. 1998. Treatment of swine summer infertility syndrome by means of oxytocin under field conditions. *Theriogenology*. 49(4):829-36. doi: [10.1016/S0093-691X\(98\)00032-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00032-6)
- PigCHAMP Benchmarking. 2012. Use data to benchmark your farms. <https://www.pigchamp.com/benchmarking> [Consultado el 06/11/2013].
- Rault JL, Morrison RS, Hansen CF, Hansen LU, Hemsworth PH. 2014. Effects of group housing after weaning on sow welfare and sexual behavior. *Journal of Animal Science*. 92(12):5683-92. doi: [10.2527/jas.2014-8238](https://doi.org/10.2527/jas.2014-8238)

- Reed HCB. Artificial insemination. En: Cole DJA, Foxcroft GR. 1982. Control of pig reproduction. London, Butterworth Scientific. pp. 65-90.
- Reicks DL, Levis DG. 2008. Fertility of semen used in commercial production and the impact of sperm numbers and bacterial counts. *Theriogenology*. 70(8):1377-9. doi: [10.1016/j.theriogenology.2008.07.019](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.019)
- Riesenbeck A. 2011. Review on international trade with boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 46:1-3. doi: [10.1111/j.1439-0531.2011.01869.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01869.x)
- Rillo SM. 1982. Reproducción e inseminación artificial porcina. Barcelona, Editorial AEDOS.
- Roca J, Carvajal G, Lucas X, Vázquez JM, Martínez EA. 2003. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*. 60(1):77-87. doi: [10.1016/S0093-691X\(02\)01330-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01330-4)
- Rodríguez-Martínez H, Kvist U, Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Sanz L, Peña FJ, Martínez EA, Roca J, Vázquez JM, Calvete JJ. 2009. The physiological roles of the boar ejaculate. *Control of Pig Reproduction VIII*. 66:1-21.
- Rodríguez-Martínez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson A, Vázquez J, Martínez E, Roca J, Sanz L, Calvete JJ. 2005. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology*. 63(2):514-35. doi: [10.1016/j.theriogenology.2004.09.028](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.028)
- Rodríguez-Martínez H, Tienthai P, Suzuki K, Funahashi H, Ekwall H, Johannisson A. 2001. Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reproduction Cambridge Supplement*. 58:129-45.
- Rozeboom KJ, Reicks DL, Wilson ME. 2004. The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows. *Journal of Animal Science*. 82(7):2164-8. doi: [10.2527/2004.8272164x](https://doi.org/10.2527/2004.8272164x)
- Rozeboom KJ, Troedsson MHT, Crabo BG. 1998. Characterization of uterine leukocyte infiltration in gilts after artificial insemination. *Reproduction*. 114(2):195-9. doi: [10.1530/jrf.0.1140195](https://doi.org/10.1530/jrf.0.1140195)
- Soede NM, Helmond FA, Schouten WGP, Kemp B. 1997. Oestrus, ovulation and peri-ovulatory hormone profiles in tethered and loose-housed sows. *Animal Reproduction Science*. 46(1-2):133-48. doi: [10.1016/S0378-4320\(96\)01609-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(96)01609-0)
- Soede NM, Kemp B. 1997. Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 52: 91-103.
- Soede NM, Noordhuizen JPTM, Kemp B. 1992. The duration of ovulation in pigs, studied by transrectal ultrasonography, is not related to early embryonic diversity. *Theriogenology*. 38(4):653-66. doi: [10.1016/0093-691X\(92\)90028-P](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90028-P)
- Soede NM, Wetzels CCH, Zondag W, De Koning MAI, Kemp B. 1995. Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *Reproduction*. 104(1):99-106. doi: [10.1530/jrf.0.1040099](https://doi.org/10.1530/jrf.0.1040099)
- Steverink DWB, Soede NM, Bouwman EG, Kemp B. 1997. Influence of insemination-ovulation interval and sperm cell dose on fertilization in sows. *Reproduction*. 111(2):165-71. doi: [10.1530/jrf.0.1110165](https://doi.org/10.1530/jrf.0.1110165)
- Steverink DWB, Soede NM, Bouwman EG, Kemp B. 1998. Semen backflow after insemination and its effect on fertilisation results in sows. *Animal Reproduction Science*. 54(2):109-19. doi: [10.1016/S0378-4320\(98\)00146-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(98)00146-8)
- Vázquez JM, Martínez EA, Roca J, Gil MA, Parrilla I, Cuello C, Carvajal G, Lucas X, Vázquez JL. 2005. Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology*. 63(2):536-47. doi: [10.1016/j.theriogenology.2004.09.043](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.043)
- Vázquez JM, Roca J, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Vázquez JL, Martínez EA. 2008. New developments in low-dose insemination technology. *Theriogenology*. 70(8):1216-24. doi: [10.1016/j.theriogenology.2008.06.013](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.013)
- Watson PF, Behan JR. 2002. Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology*. 57(6):1683-93. doi: [10.1016/S0093-691X\(02\)00648-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00648-9)
- Weiler U, Claus R. 1990. Endocrine aspects of testicular function, especially hormones in the seminal plasma and their fate in the female reproductive tract: testicular steroids and their relevance for male and female reproductive functions. En: Johnson LA, Rath D. 1990. Boar semen preservation II. Berlin, Paul Parey Scientific Publishers. pp. 41-61.
- Weitze K. 2000. Infertilidade estacional no suíno. 3rd Simposio Internacional de Inseminação Artificial em Suínos. Porto Alegre, Brasil, pp. 50.

Weitze KF, Wagner-Rietschel H, Waberski D, Richter L, Krieter J. 1994. The onset of heat after weaning, heat duration, and ovulation as major factors in AI timing in sows. *Reproduction in Domestic Animals*. 29(5):433-43.
[doi: 10.1111/j.1439-0531.1994.tb00590.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1994.tb00590.x)

Willenburg KL, Miller GM, Rodríguez-Zas SL, Knox RV. 2003. Effect of boar exposure at time of insemination on factors influencing fertility in gilts. *Journal of Animal Science*. 81(1):9-15.
[doi: 10.2527/2003.8119](https://doi.org/10.2527/2003.8119)

Williams S, Fernández V. Evaluación, procesamiento y conservación de semen.

Inseminación artificial. En: Williams S. 2015. *Atlas de Reproducción Porcina*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Inter-médica, pp. 25-32.

Woelders H, Matthijs A. 2001. Phagocytosis of boar spermatozoa in vitro and in vivo. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*. 58:113-27.

Yeste M, Estrada E, Pinart E, Bonet S, Miró J, Rodríguez-Gil JE. 2014. The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. *Cryobiology*. 68(2):251-61.
[doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.02.004](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.004)

Pólipo y leiomioma uterinos en un erizo pigmeo africano (*Atelerix albiventris*)

Uterine polyp and leiomyoma in an African pigmy hedgehog (*Atelerix albiventris*)

VICENTE MARTÍN EZEQUIEL^{1,*}, LAPLACE ROSANA^{1,2}, MADARIAGA GONZALO JULIÁN^{3,4} 
GARCÍA MITACEK MARÍA CARLA^{2,5}

1. Servicio de Especies No Tradicionales del Hospital Escuela. 2. Cátedra y Servicio de Reproducción Animal. 3. Laboratorio de Patología Especial Veterinaria “Dr. B. Epstein”. 4. Cátedra de Clínica de Pequeños Animales. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 5. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

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

Resumen

El erizo pigmeo africano (*Atelerix albiventris*) se ha convertido en una mascota exótica. Es por ello que se han realizado diversos estudios sobre aspectos de salud y enfermedad de esta especie. El objetivo del trabajo fue presentar un caso de un pólipo y leiomioma uterinos en un erizo pigmeo africano. En 2016, una hembra de 2 años se presentó a la consulta con hematuria. La radiografía y ecografía abdominales revelaron una masa intrauterina. Se realizó ovariectomía y se constató la presencia de dos masas de tejido. Mediante estudios histopatológico e histoquímico se formuló un diagnóstico de pólipo y leiomioma uterinos. La paciente se recuperó totalmente. Doce meses postintervención la misma concurrió a consulta para realizar un control anual en el cual se no se evidenciaron signos clínicos de la enfermedad.

Palabras clave

Atelerix albiventris, pólipo endometrial, leiomioma uterino

Abstract

The African pigmy hedgehog (*Atelerix albiventris*) has become an exotic pet. Therefore, interest on health and disease aspects of this species has increased. The aim of this study was to describe a case of uterine polyp and leiomyoma in an African pigmy hedgehog. In 2016, a 2 years old female came to the clinic presenting hematuria. Abdominal radiography and ultrasound were performed and revealed an intrauterine mass. An ovariectomy was performed and the presence of two tissue masses was observed. histopathological and histochemical analysis of the neoformations confirmed the diagnosis of uterine polyp and leiomyoma. The patient recovered completely. Twelve months post-intervention, the animal was clinically evaluated at an annual control in which clinical signs of the disease were not evidenced.

Key words

Atelerix albiventris, endometrial polyp, uterine leiomyoma

Introducción

El erizo pigmeo africano (*Atelerix albiventris*) es un mamífero del orden Erinaceomorpha de la familia Erinaceidae, subfamilia Erinaceinae. Nativo de África ecuatorial, habita estepas, sabanas, pastizales y campos agrícolas. En los últimos años ha sido domesticado, convirtiéndose en una mascota exótica. Esta especie alcanza la madurez sexual, en estado salvaje, alrededor del año de edad. *Atelerix albiventris* se reproduce bien en cautiverio, siendo sexualmente activo durante todo el año sin aparente temporada de apareamiento (Santana *et al.*, 2010). La esperanza de vida es de 1 a 4 años en estado silvestre. Sin embargo, con un buen asesoramiento nutricional y atención veterinaria adecuada ha ampliado su expectativa de vida en cautiverio (Heatley *et al.*, 2005; Santana *et al.*, 2010). La prevalencia de tumores en el erizo parece no estar relacionada con el sexo. Se ha comunicado un aumento de afecciones neoplásicas en erizos de más de 3 años de edad (Heatley *et al.*, 2005; Raymond & Garner, 2001). Generalmente, un 85% de los tumores son malignos. Los sistemas más frecuentemente involucrados incluyen el tegumentario, hemolinfático, digestivo, endocrino y reproductivo. Las neoplasias epiteliales son las más frecuentes, seguidas de las de células redondas y de células mesenquimáticas (Heatley *et al.*, 2005; Raymond & Garner, 2001). En las hembras, la neoplasia maligna más comúnmente encontrada es el adenocarcinoma, seguido por el sarcoma estromal y el leiomiocarcinoma. Generalmente, la edad de presentación es entre 2 y 4 años (Heatley *et al.*, 2005; Mikaelian & Reavill, 2004). Los signos clínicos típicos son: sangrado vaginal, hematuria y pérdida de peso. También los pólipos endometriales ulcerados o con necrosis pueden cursar con signos clínicos similares (Phillips *et al.*, 2005). La detección precoz con posterior tratamiento mejora el pronóstico a largo plazo en animales afectados (Heatley *et al.*, 2005; Mikaelian & Reavill, 2004).

El pólipo endometrial ha sido descrito en humanos, chimpancés, perros, gatos, caballos, elefantes, perros salvajes africanos, ratones y erizos, entre otras especies. El mismo se caracteriza por una protrusión nodular del endometrio constituido por tejido conectivo, estroma fibroso y glándulas dilatadas, pudiendo generar distensión segmentaria de los cuernos uterinos. Los pólipos pueden ser únicos o múltiples (Chambers *et al.*, 2018; McEntee & Nielsen, 1976; Schlafer & Miller, 2007).

Los leiomiomas son tumores benignos y han sido descritos en la vaca, perra, gata y erizo, entre otras especies. Se originan en el músculo liso del útero, cuello uterino o vagina y pueden ser únicos o múltiples. Por lo general, los tumores más pequeños son blandos, pero al aumentar de tamaño pueden adquirir una consistencia firme o dura. Los leiomiomas pueden ubicarse en el miometrio o proyectarse como masas redondeadas

u ovaladas hacia el lumen de la vagina, útero o cuello uterino. Histológicamente, el tumor está compuesto por haces de fibras musculares lisas arremolinadas y escaso tejido conectivo (McEntee & Nielsen, 1976; Schlafer & Miller, 2007). El tratamiento de elección es la ovariectomía. En la actualidad no existen datos sobre tratamiento médico en el erizo pigmeo africano (Heatley *et al.*, 2005; Mikaelian & Reavill, 2004). En la especie humana, los tratamientos médicos se instauran cuando se quiere preservar la fertilidad y evitar o retrasar la cirugía. Actualmente, los agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y los moduladores selectivos del receptor de progesterona son las terapias médicas más efectivas. Por lo general, el pronóstico en la mujer luego de la escisión quirúrgica es bueno (Sohn *et al.*, 2018).

Si bien se han comunicado varios trabajos en los cuales se registran neoplasias uterinas en el erizo pigmeo africano, hasta el momento no hemos encontrado ningún trabajo en el cual se haya comunicado la presentación en forma conjunta de un leiomioma con un pólipo endometrial. El objetivo del trabajo fue presentar un caso clínico de pólipo y leiomioma uterinos en una erizo pigmeo africano (*Atelerix albiventris*).

Presentación del caso

En el año 2016 se presentó a consulta un erizo pigmeo africano (*Atelerix albiventris*), hembra, de 2 años y 240 g de peso, con hematuria de 7 días de evolución. En el examen clínico se observó un estado general bueno y parámetros fisiológicos normales (frecuencia cardíaca de 230 [180-260], frecuencia respiratoria de 45 [25-50] y temperatura corporal de 37 °C [35,4-37 °C]). En la radiografía abdominal se observó una vejiga plétórica sin urolitos radiopacos y aumento de la radiopacidad circunscripta en mesogastrio con desplazamiento de órganos vecinos, sugerente de masa (Figura 1A). En la ecografía abdominal se constató una masa intrauterina de 15,4 mm de diámetro, de bordes irregulares, hipoeoica, con ecotextura granular gruesa y heterogénea a expensas de múltiples áreas anecoicas (Figura 1B). Se indicó la ovariectomía bajo anestesia inhalatoria. Se realizó un tratamiento postquirúrgico con enrofloxacin 5 mg/kg/día/V.O. durante 7 días y meloxicam 0,2 mg/kg/día/V.O. durante 3 días. Posteriormente, se seccionó el útero y se constató la presencia de dos masas, una de ellas pedunculada y la otra nodular. Se obtuvieron muestras de ambos cuernos uterinos y de las dos masas para histopatología. Las muestras se fijaron en formaldehído bufferado al 10 %, se procesaron mediante las técnicas de rutina y se colorearon con hematoxilina y eosina. En los cortes histológicos de ambos cuernos uterinos se observó la presencia de un infiltrado mononuclear compuesto principalmente por macrófagos y edema en el endometrio (Figura 2).

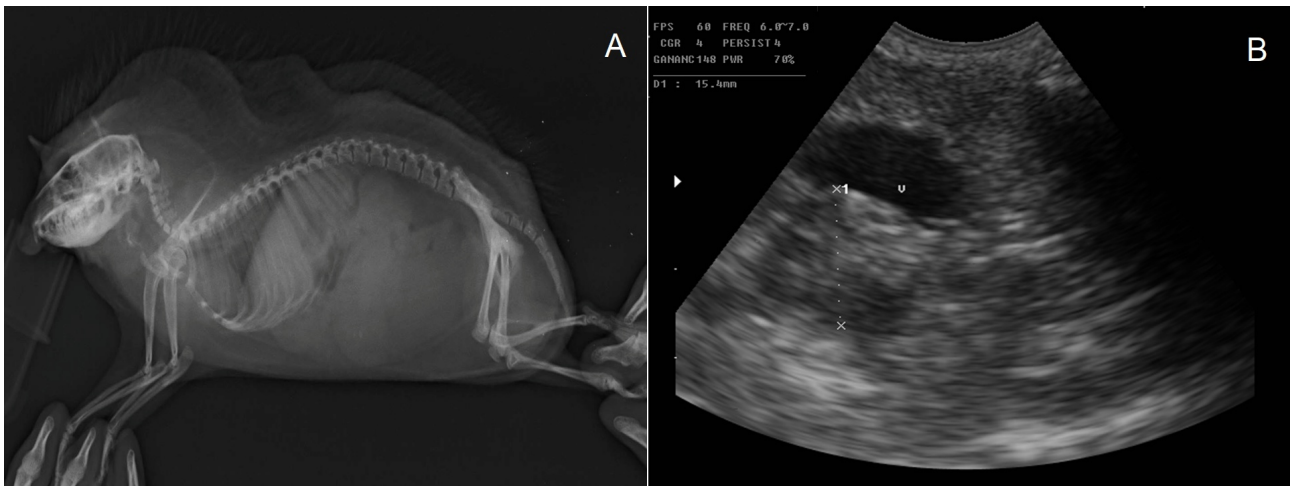


Figura 1. (A). Radiografía abdominal latero-lateral: vejiga pletórica sin urolitos radiopacos y aumento de la radiopacidad circunscripta en mesogastrio con desplazamiento de órganos vecinos, sugerente de masa. (B). Ecografía abdominal: neoformación intrauterina de 15,4 mm de diámetro. V: indica la vejiga urinaria.

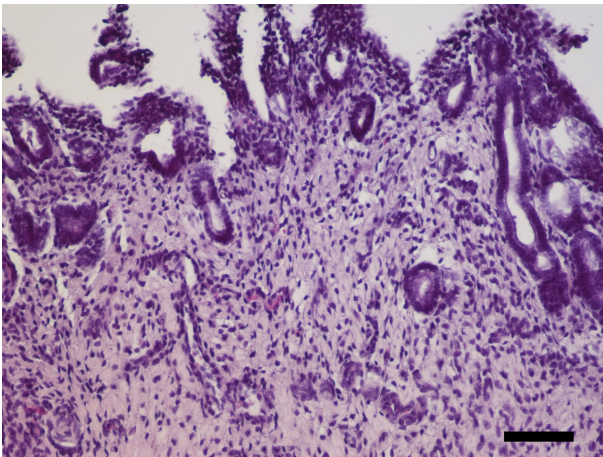


Figura 2. (A). Endometrio con edema e infiltrado mononuclear compuesto principalmente por macrófagos. H&E, Barra = 100 μ m.

La masa pedunculada estaba compuesta por tejido conectivo muy vascularizado, con fibroblastos, fibrocitos y macrófagos, y tapizada por células epiteliales normales (Figura 3A-B). La masa nodular estaba compuesta por abundante cantidad de células fusiformes, dispuestas en bandas entrelazadas, con un núcleo único, grande, central, redondo u oval con un patrón de cromatina en grumos y moderada cantidad de citoplasma. No se observaron figuras mitóticas (Figura 4A-B). Mediante la coloración especial de van Gieson se confirmó la presencia de abundantes fibras de musculo liso y escaso tejido conjuntivo (Figura 4C). Se formuló el diagnóstico de pólipo y leiomioma uterinos. Se otorgó el alta médico y quirúrgico a los 10 días de la intervención. La paciente se recuperó totalmente. Doce meses post-intervención la misma concurrió a consulta para realizar un control anual en el cual se no se evidenciaron signos clínicos de la enfermedad.

Discusión

En los últimos años se ha comunicado el hallazgo de diversas neoplasias uterinas en el erizo pigmeo africano. Raymond & Garner (2001) realizaron un estudio sobre erizos cautivos pudiendo observar que el 4,54 % (3/66) padecía enfermedad neoplásica del útero, presentándose dos casos de leiomiomas. En el trabajo realizado por Mikaelian & Reavill, (2004) comunicaron que 15 erizos presentaban afecciones uterinas únicas o múltiples, observando 4 hembras con pólipos endometriales, 2 con pólipo endometrial y adenosarcoma y una hembra con adenoleiomioma conjuntamente con sarcoma del estroma endometrial. Done *et al.*, (2007) comunicaron el caso de un erizo de 5 años de edad con hematuria debida a un pólipo endometrial y adenomiosis, siendo el tiempo de sobrevivida de 19 meses.

En otro estudio pudo observarse que un erizo de 5 años presentó una masa en caudolateral del flanco izquierdo correspondiente a un osteosarcoma extraesquelético. Aproximadamente 2 meses después de la cirugía, el paciente murió repentinamente. Durante la necropsia pudo hallarse una masa uterina compatible con un leiomioma (Phair *et al.*, 2011).

Tsai *et al.*, (2016) observaron que un erizo de 2 años y 7 meses de edad presentó una masa subcutánea en lateral del cuello, así como una masa intraabdominal encontrada durante la palpación. Una vez realizada la remoción quirúrgica pudo observarse en el miometrio células neoplásicas, siendo el diagnóstico definitivo sarcoma de estroma endometrial y liposarcoma.

Okada *et al.*, (2018) realizaron un estudio histológico de órganos reproductivos femeninos de erizos observando pólipos endometriales en 7 hembras (n=33), siendo estos de presentación única o múltiple. Asimismo, los pólipos fueron pedunculados y ocupaban la luz uterina. Los

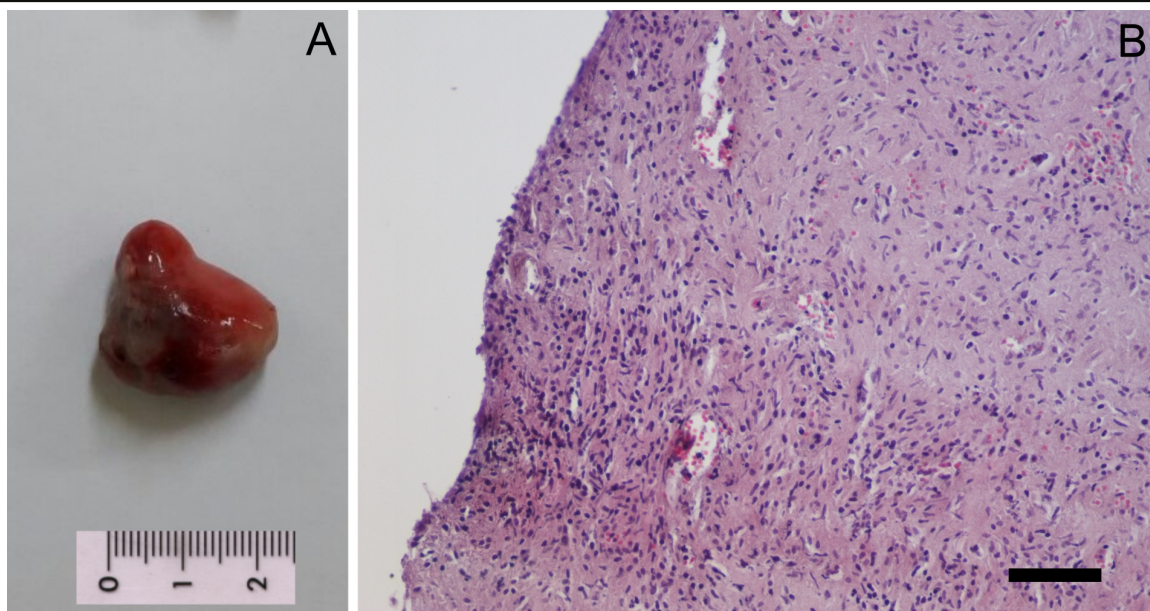


Figura 3. (A). Masa uterina pedunculada: Pólipo endometrial (B). Estroma muy vascularizado, con fibroblastos, fibrocitos y macrófagos. H&E. Barra = 100 μ m.

signos clínicos que se observaron fueron sangrado vaginal o hematuria (Okada *et al.*, 2018).

Recientemente, Chambers *et al.* (2018) examinaron 50 úteros de erizos con signos clínicos de enfermedad uterina. Siete animales (14%) presentaron pólipo endometrial y en 27 (54 %) se diagnosticó neoplasia endometrial. Al examen clínico la mayoría de las hembras presentaban hematuria o sangre adherida a la vulva. Las edades fueron 29,4-25,2 meses. Las neoplasias se clasificaron en 7 tumores mixtos endometriales, 12 nódulos del estroma endometrial y 8 sarcomas del estroma endometrial. Sin embargo, los nódulos estromales endometriales y los sarcomas del estroma endometrial a menudo fueron contiguos a un pólipo endometrial o a un tumor mixto. La tasa de supervivencia a los 180 días después de la ovario-

histerectomía fue del 100 % (4/4) en el pólipo endometrial y del 60 % (3/5) en el tumor endometrial mixto, 100 % (3/3) en nódulo estromal endometrial y 42,9 % (3/7) en el sarcoma estromal endometrial.

Si bien se han realizado diversos estudios que comunican la alta prevalencia de neoformaciones uterinas y pólipos endometriales en el erizo pigmeo africano, nuestro trabajo es el primero en comunicar la presentación, en forma conjunta, de un pólipo endometrial y un leiomioma uterino. Asimismo, en la mayoría de los trabajos estas neoformaciones resultan ser un hallazgo de necropsia, mientras que en muy pocos trabajos consignan la sobrevida del animal luego de la remoción quirúrgica.

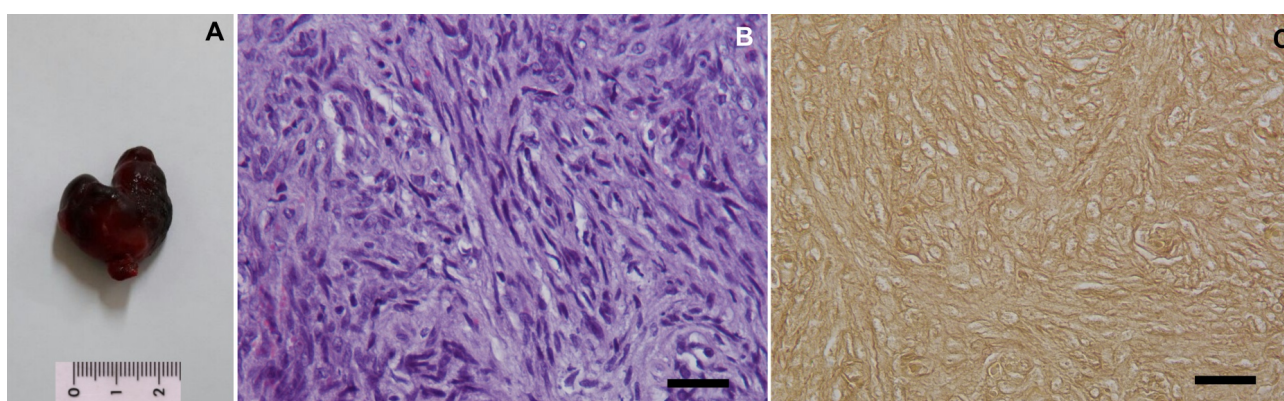


Figura 4. (A). Masa uterina nodular: Leiomioma (B). Abundante cantidad de células fusiformes, dispuestas en bandas entrelazadas. Las células presentan un núcleo único, grande, central, redondo u oval con un patrón de cromatina en grumos y moderada cantidad de citoplasma. H&E. Barra = 50 μ m. (C). Abundantes células musculares (amarillo) y escasas bandas de tejido conectivo (rojo). van Gieson. Barra = 50 μ m.

Conclusiones

La ovariectomía es el tratamiento de elección para neoplasias uterinas en el erizo, lo cual permite aumentar su expectativa de vida. Asimismo, se debería recomendar a los propietarios de los erizos pigmeos africanos hembras que realicen controles periódicos reproductivos, con el fin de realizar un diagnóstico precoz de este tipo de afecciones.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Servicio de Diagnóstico por Imágenes y al Servicio de Cirugía del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

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

Chambers JK, Shiga T, Takimoto H, Dohata A, Miwa Y, Nakayama H, Uchida K. 2018. Proliferative lesions of the endometrium of 50 four-toed Hedgehogs (*Atelerix albiventris*). *Veterinary Pathology* 55(4):562-71. doi: 10.1177/0300985818758467

Done LB, Deem SL, Fiorello CV. 2007. Surgical and medical management of a uterine spindle cell tumor in an African hedgehog (*Atelerix albiventris*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 38(4):601-3. doi: 10.1638/2006-0066R.1

Heatley JJ, Mauldin GE, Cho DY. 2005. A review of neoplasia in the captive African hedgehog (*Atelerix albiventris*). *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 14(3):182-92. doi: 10.1053/j.saep.2005.07.002

Kennedy PC. 1998. Histological classification of tumors of genital system of domestic animal. *World Health Organization International*

Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Second Series Vol. IV.

McEntee K, Nielsen SW. (1976). XVI. Tumours of the female genital tract. *Bulletin of the World Health Organisation*. 53(2-3):217-26.

Mikaelian I, Reavill DR. 2004. Spontaneous proliferative lesions and tumors of the uterus of captive African hedgehogs (*Atelerix albiventris*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 216-20. doi:10.1638/01-077

Okada K, Kondo H, Sumi A, Kagawa Y. 2018. A retrospective study of disease incidence in African pygmy hedgehogs (*Atelerix albiventris*). *The Journal of Veterinary Medical Science*. 80(10): 1504-10. doi: 10.1292/jvms.18-0238

Phair K, Carpenter JW, Marrow J, Andrews G, Bawa B. 2011. Management of an extraskeletal osteosarcoma in an African hedgehog (*Atelerix albiventris*). *Journal of Exotic Pet Medicine*. 20(2): 151-5. doi: 10.1053/j.jepm.2011.02.011

Phillips ID, Taylor JJ, Allen AL. 2005. Endometrial polyps in 2 African pygmy hedgehogs. *Canadian Veterinary Journal*. 46(6):524-7.

Raymond JT, Garner MM. 2001. Spontaneous tumours in captive African hedgehogs (*Atelerix albiventris*): a retrospective study. *Journal of Comparative Pathology*. 124(2-3):128-33. doi: 10.1053/jcpa.2001.0441

Santana EM, Jantz HE, Best TL. 2010. *Atelerix albiventris* (Erinaceomorpha: Erinaceidae) *Mammalian Species*. 42(857): 99-110. doi: 10.1644/857.1

Schlafer DH, Miller, RB. Female genital system. En: Maxie, MG. 2007. *Pathology of domestic animals*. Elsevier Sanders, Philadelphia, Pennsylvania. vol. 3, 5th ed. 429-564.

Sohn GS, Cho S, Kim YM, Cho CH, Kim MR, Lee SR. 2018. Current medical treatment of uterine fibroids. *Obstetrics & Gynecology Science*. 61(2): 192-201. doi: 10.5468/ogs.2018.61.2.192

Tsai FY, Chang HM, Chang HK, Kao JP, Liao JW. 2016. Case report: endometrial stromal sarcoma and liposarcoma in an African hedgehog (*Atelerix albiventris*). *Taiwan Veterinary Journal*. 42 (03): 181-6. doi: 10.1142/S1682648515720117

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 consignen 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 primer autor (seguido de la expresión *et al.*, si se trata de más de dos autores) y el año de publicación, separado por una coma, según el ejemplo. Si el artículo tiene solamente dos autores, 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, 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.

Artículos en publicaciones periódicas

Se citará la nómina completa de autores/as y sus iniciales, separados 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. 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. 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: 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: 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 organizadores 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 dentro del mismo volumen. 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, o animales con marcas específicas que permitan reconocerlos, excepto que se posea consentimiento por escrito de sus propietarios. Es responsabilidad de los autores 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” 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 o con control de cambios 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.