

ISSN 1668-4834

# REVISTA VETERINARIA



Volumen 34, número 1, 2023

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**  
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE  
CORRIENTES, ARGENTINA



Scientific Electronic Library Online



# Revista veterinaria

---

*Rev. Vet. 34: 1, 2023 - ISSN 1668-4834 (on line: ISSN 1669-6840)*

Registro de la Propiedad Intelectual 5343694 (*on-line*: 5343693). Indizada en LATINDEX (México, DF), INFOCYT-OEA (Chile), CAB Inter-national (Oxford, UK), Scopus (ELSEVIER, Holanda), Gale Cengage Learning (México), DOAJ ORG. (Lund, Suecia), J-Gate (India) y EBS- CO Publishing (USA). Publicación con índice de impacto registrado por Scimago-Scopus-Elsevier desde el año 2005. Incorporada a SciELO desde 2014 y a REDIB desde 2018. Se edita un volumen con dos números por año (mayo-setiembre). La revista se financia con aportes de la Universidad Nacional del Nordeste y la Facultad de Ciencias Veterinarias, así como aranceles de publicación abonados por los autores.

## **DIRECTOR**

Dr. David Roque Hernández

## **ADMINISTRADOR**

Dr. José Darío Álvarez

## **COMITÉ EDITORIAL**

Dra. Luciana Andrea Cholich. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina  
Dr. Marcos Gabriel Guidoli. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina  
Dr. José Luis Konrad. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina  
Dr. Walter Javier Lertora. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina  
Dra. Silvana Lucía Maruñak. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina  
Dra. Adriana Silvia Rosciani. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina  
Dra. Raquel Mónica Ruiz. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina  
Dr. Sebastián Sánchez. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina  
Dr. Juan José Santinón. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina  
Dra. Gladys Pamela Teibler. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina

## **ENCARGADOS DE ÁREAS**

Idioma inglés: Dr. Juan José Santinón

Diagramación y montaje: Lic. María Julia Caplan

Vínculos institucionales: Cra. Paola Salinas; Lic. Romina Medina

Equipo Técnico del Portal de Revistas de la UNNE

## **CUERPO DE CONSULTORES**

Dr. Agustín Martínez. Instit. Nac.Tecnol. Agropec. (INTA). Argentina  
Dra. Andrea Torres Luque. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina  
Dr. Andrés Maximiliano Attademo. Universidad Nacional del Litoral. Argentina  
Dr. Bernardo Baldisserotto. Universidad Federal de Santa María. Brasil  
Dra. Carla Zeppenfeld. Universidad Federal de Santa María. Brasil  
Dr. Claudio Antonio Pozo. Universidad Nacional de Formosa. Argentina  
DVM, PhD, Damiano Cavallini. University of Bologna. Italia  
Dr. Fabricio Andrés Vigliano. Universidad Nacional de Rosario. Argentina  
Dra. Ing. Agr. Gabriela Marcela Martínez. Instit. Nac.Tecnol. Agropec. (INTA). Argentina  
Dr. Juan Francisco Micheloud. Instit. Nac.Tecnol. Agropec. (INTA). Argentina  
Dr. Marcos Ferrante. Universidad Federal de Lavras. Brasil  
Dr. Pablo Martín Beldomenico. Universidad Nacional del Litoral. Argentina  
Dra. Paola Della Rosa. Instit. Nac.Tecnol. Agropec. (INTA). Argentina  
Dra. Patricia Criscioni Ferreira. Universidad Nacional de Asunción. Paraguay  
Dr. Pedro A. Zeinsteger. Universidad Nacional de la Plata. Argentina  
Dra. Nathalia Paula Scioscia. Universidad Nacional de Mar del Plata. Argentina  
Dra. Shyrley Paola Amarilla. Universidad Nacional de Asunción. Paraguay  
Dra. Silvia Plaul. Universidad Nacional de la Plata. Argentina  
Dr. Carlos Castrillo González. Universidad de Zaragoza. España  
Dra. Miriam Mabel Ribicich. Universidad de Buenos Aires. Argentina  
Dra. Mariana Pasqualetti. Universidad de Buenos Aires. Argentina  
Dr. Fernando A. Fariña. Universidad de Buenos Aires. Argentina

## UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

Rector: Prof. Dr. Gerardo Omar Larroza

Revista Veterinaria agradece el constante apoyo pecuniario  
brindado por la Universidad Nacional del Nordeste  
a través de la Secretaría General de Ciencia y Técnica

### FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Decano: Dra. María Fabiana Cipolini Galarza  
Vice-Decano: MV Enrique Celso Almirón  
Secretaria Académica: Dra. Adriana Silvia Rosciani  
Secretario de Estudios y Asuntos Estudiantiles: MV Ramón de Jesús Bordón  
Secretario de Extensión y Prestación de Servicios: Dr. Juan Pablo Roux  
Secretario de Investigación y Posgrado: Dr. David Roque Hernández  
Directora de Carrera de Doctorado: Dra. Lilian Cristina Jorge  
Secretaría Administrativa: Cra. Paola Gisele Salinas

Esta revista proporciona un acceso abierto inmediato a su contenido, basado en el principio de que ofrecer al público un acceso libre a las investigaciones ayuda a un mayor intercambio de conocimiento. Esta obra está bajo una licencia de *Creative Commons Reconocimiento - No Comercial 4.0 Internacional* (CC BY-NC)

*Revista veterinaria (Rev. Vet.)* tiene como objetivo difundir resultados de investigaciones científicas y actualizar el conocimiento de temas vinculados directa o indirectamente a las ciencias veterinarias. Publica trabajos referidos a animales de producción, de deporte y de compañía, sin excluir especies silvestres ni animales de laboratorio. Acepta colaboraciones originales de autores argentinos o extranjeros referidas a la morfología, fisiología, nutrición, patología, semiología, farmacología, microbiología, parasitología, inmunología, epidemiología, bromatología, cirugía, genética, producción animal y salud pública, efectuadas en idiomas español e inglés. Los manuscritos son sometidos a arbitraje. La revista aparece en formato convencional y *on-line* con periodicidad semestral (mayo y setiembre).

En 2018 nuestra revista fue incorporada a REDIB, Red Iberoamericana de Innovación y Conocimiento Científico.

*Revista Veterinaria (Rev. Vet.)* publishes worldwide contributions on all aspects of veterinary science and related issues, ranging in scope from production to sport and pet animals. Wildlife and laboratory animals are considered as well. Research areas include morphology, physiology, nutrition, pathology, semiology, pharmacology, microbiology, parasitology, immunology, epidemiology, bromatology, surgery, genetics, animal production and public health. Papers are published in Spanish and English. Manuscripts are submitted to referees prior to publication and they include Original Papers, Short Communications and Reviews. The conventional and *on-line* formats of *Revista Veterinaria* are available twice a year (May and September).

Los derechos de autor (copyright) de los trabajos publicados han sido cedidos a *Revista veterinaria*. Está permitida la reproducción parcial o total de los artículos con fines científicos, en tanto sea consignada la fuente original. Las opiniones vertidas son de exclusiva responsabilidad de los autores.

# ÍNDICE

Rev. Vet. 34: 1, 2023

## TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN






- Epidemiología de tumor venéreo transmisible canino en Reynosa Tamaulipas México.  
*Perez Cruz, N.L.; Rodríguez Castillejos, G.C.; Jiménez Becerril, M.F.; García León, I. ; Hernández Mendoza, J.L.; Lizarazo Ortega, C.*..... 1
- Detección de pacientes COVID-19 en muestras de sudor por medio del olfato canino: Estudio preliminar.  
*Álvarez G.; Carancci P.; De los Santos F.; Zapata A.; Lorenzo H.R.*..... 6
- Coproprevalencia de *Cystoisospora* spp. en canes domésticos (*Canis lupus familiaris*) del distrito de Cajamarca, Perú.  
*Bacilio-Gutiérrez, D.; Torrel-Pajares, T.S.; Vargas-Rocha L.A.; Rojas-Moncada, J.*..... 14
- Hematological, biochemical, and growth parameters of Sprague Dawley rat of the Scientific Research and High Technology Services Institute of Panama.  
*Quintero, A. Del C.; De Jesús, R.*..... 19
- Microplásticos e imposex en el caracol marino *Thaisella chocolata* procedente de la costa central marina del Perú.  
*Torres-Zevallos, U.; Arenas-Valeriano, A.D.; Alvariano, L.; Iannacone, J.*..... 25
- Efecto de dos temperaturas de dilución sobre la calidad de semen en ganado cebuino del Trópico Peruano.  
*Segura Portocarrero, G.T.; Quispe-Ccasa, H.A.; Saucedo-Urriarte, J.A.; Poclín Rojas, A.Y.; Murga Valderrama, N.L.; Cortez Polanco, J.V.; Ampuero Trigoso, G.*..... 33
- Fructooligosacáridos, extracto de *Cynara scolymus* y cloruro de colina como suplementos dietario en la crianza de pollos parrilleros (*Gallus gallus*).  
*Ocaña, J.G.; Mazzuca Pizetti, A.J.; Sarmiento, R.O.; Sánchez Negrette, O.*..... 40
- Influence of irrigation type in the prevalence of bovine fasciolosis, Cajamarca-Peru.  
*Torrel-Pajares, T.S.; Rojas-Moncada, J.; Vargas-Rocha, L.A.; Murga-Moreno, C.A.*..... 47
- Caracterización y potencial aplicación industrial de extractos enzimáticos de pacú (*Piaractus mesopotamicus*).  
*Acevedo Gomez, A.V.; Gomez, G.N.; Medina, D.M.; Bogado, C.; Bustillo, S.; Leiva, L.N.*..... 52
- Estudio preliminar de algunas variables de crecimiento y fertilidad en ratones de Bioterio.  
*Romero Vidomlansky, P.R.; Vargas Schiro, F.L.; Rigoni, E.; Todaro, J.S.; Rigoni, R.G.; Aguirre, M.V.*..... 62

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Uso de fármacos en la hembra canina preñada.  
*Landoni, M.F.*..... 67
- Instrucciones a los autores**..... 77
- Instructions to authors**..... 80



## Epidemiología de tumor venéreo transmisible canino en Reynosa Tamaulipas México

Perez Cruz, N.L.<sup>1</sup>; Rodríguez Castillejos, G.C.<sup>2</sup>; Jiménez Becerril, M.F.<sup>1</sup>; García León, I.<sup>3</sup>; Hernández Mendoza, J.L.<sup>3</sup>; Lizarazo Ortega, C.<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Licenciatura en Médico Veterinario Zootecnista, Instituto de Ciencias y Estudios Superiores de Tamaulipas, A. C. Calle, Venustiano Carranza 2020, Industrial, 88590 Reynosa, Tamaulipas México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa Aztlán. Laboratorio de Biotecnología. Calle16 y Lago de chápala, Aztlán, 88740, Reynosa, Tamaulipas, México.

<sup>3</sup>Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional, Boulevard del Maestro S/N esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, C.P. 88710, Cd. Reynosa, Tamaulipas. México. E-mail: clizarazu@ipn.mx

### Resumen

El CTVT por sus siglas en inglés (Canine Transmissible Venereal Tumor) se transmite principalmente a través de contacto sexual siendo las hembras las más expuestas a la patología; el sulfato de vincristina es actualmente la terapia más eficaz. En el presente trabajo se analizaron 28 caninos, en su mayoría de raza indefinida; se realizó diagnóstico por reconocimiento físico completo y se realizaron encuestas a sus propietarios para determinar factores de riesgo. La proporción de la enfermedad fue similar en hembras y machos menores de 5 años pero considerablemente mayor en machos adultos con respecto a hembras; solo el 25% de los mayores de 5 años fueron hembras. La incidencia de este tumor en animales no esterilizados fue un 28% mayor con respecto a los esterilizados. La presencia del tumor fue considerablemente más alta en machos no rescatados con respecto a hembras en la misma condición (73 y 27%). Finalmente, el 89% de los casos reportados presentaron las lesiones en la región genital. El objetivo del presente trabajo fue identificar factores asociados a persistencia de CTVT en la ciudad de Reynosa Tamaulipas.

**Palabras clave:** tumor, canino, factores de riesgo, epidemiología

## Epidemiology of canine transmissible venereal tumor in Reynosa Tamaulipas Mexico

**Abstract.** The CTVT is transmitted mainly through sexual contact, with females being the most exposed to the pathology; vincristine sulfate is currently the most effective therapy. In the present work, 28 canines were analyzed, mostly of indefinite breed. A diagnosis was made by complete physical examination and surveys were carried out on their owners to determine risk factors. The proportion of the disease was similar in females and males under 5 years of age, but considerably higher in adult males than in females; only 25% of those older than 5 years were female. The incidence of this tumor in non-sterilized animals was 28% higher than in sterilized ones. The presence of the tumor was considerably higher in non-rescued males compared to females in the same condition (73 and 27%). Finally, 89% of the reported cases presented lesions in the genital region. The objective of this work was to identify factors associated with the persistence of CTVT in the city of Reynosa Tamaulipas.

**Key words:** tumor, canine, risk factors, epidemiology

### INTRODUCCIÓN

El CTVT también conocido como sarcoma venéreo o tumor de sticker, es una inflamación mediada por tumores reticuloendoteliales que infecta genitales en caninos

(Awaluddin et al. 2021). Su primer caso conocido data de 1810 en Inglaterra, sin embargo, las células somáticas que originaron por primera vez el CTVT datan de unos 11.000 años. Su distribución global demuestra la capacidad de los genomas de células somáticas de adaptarse y persistir

en diferentes nichos ecológicos a pesar de la vida relativamente corta de los caninos (Murchison et al. 2014). Se transmite a través de contacto sexual directo, mucosas o piel lesionada; el sangrado natural en el contacto facilita el proceso. Las hembras sin embargo están más expuestas a la patología (Stockmann et al. 2014). Una vez iniciado el contagio, las lesiones iniciales son superficiales y varían de coloración rosa a rojo y miden de 1 a 3 mm de diámetro. Posteriormente, los nódulos se fusionan formando masas friables, rojas hemorrágicas y con forma de coliflor; dichas masas pueden ser de 5 a 7 cm de diámetro para finalmente progresar en la mucosa multilobulillar con tamaños que pueden alcanzar los 10 a 15 cm (Purohit 2009).

Es importante mencionar que la apariencia clínica del tumor depende del tejido y órgano de localización; las masas tienden a sangrar debido a la ulceración de la superficie epitelial. La protrusión genital del tejido tumoral, que depende del tamaño del tumor, es más evidente en hembras, mientras que el agrandamiento de los ganglios linfáticos inguinales se observa a menudo en machos con tumores de pene. El tamaño del tumor puede variar de 3 a 12 cm de diámetro; los signos clínicos de las lesiones genitales son secreción vaginal o prepucial sanguinolenta, lesiones cutáneas ulcerativas intermitentes o persistentes, hinchazón genital y lamido excesivo del área genital con olor no placentero; esto puede ser detectado por el cuidador (Nak et al. 2005, Park et al. 2006, Mello Martins et al. 2015).

Se conocen diversos tratamientos tanto invasivos como no invasivos, que incluyen cirugía, inmunoterapia, radioterapia y quimioterapia. Los tumores pequeños se pueden extirpar quirúrgicamente, pero en casos de tumores invasivos grandes, la tasa de recurrencia puede ser tan alta como 50 - 68%; el sulfato de vincristina es actualmente la terapia más eficaz (Awaluddin et al. 2021).

La patología se considera endémica en países tropicales y subtropicales con altas poblaciones de perros callejeros, ya que esto permite su propagación y dificulta tratamientos efectivos. Se considera que la incidencia de CTVT es comparativamente mayor en invierno y los animales jóvenes con mayor actividad sexual están más afectados por la patología (Abeka 2019). La prevalencia de la enfermedad puede llegar hasta el 10% (Strakova y Murchison 2014); sin embargo, su crecimiento no espontáneo lo hace particularmente importante en animales en condición de calle y elevar su prevalencia hasta un 28% (Faccini et al. 2019, Abedin 2020).

La falta de campañas de esterilización y la no existencia de una legislación sobre las condiciones sanitarias en esta especie facilita la proliferación (Sánchez et al. 2020). De otro lado, la esterilización de perros conlleva beneficios como la prevención de camadas no deseadas, disminución de neoplasias, y aumento de la esperanza de los animales. Es importante que, los animales castrados pueden estar más predispuestos a la obesidad; por lo que se debe implementar un manejo nutricional adecuado calculando sus requerimientos de energía a través de la dieta adecuada (Vendramini 2020).

El objetivo del presente estudio fue identificar factores asociados a la persistencia del tumor venéreo transmisible en caninos atendidos en una clínica-refugio veterinaria del centro de la ciudad de Reynosa Tamaulipas, México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

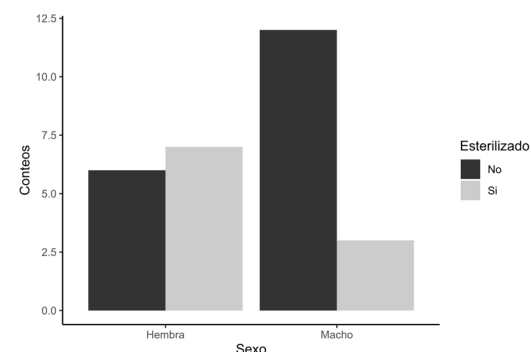
En un refugio animal situado en la ciudad de Reynosa, estado de Tamaulipas, en el noreste de México, en un lapso de tiempo de 8 meses, se lograron documentar 28 animales con diagnóstico de CTVT; del total, 18 animales eran criollos, cinco pit bull, dos chihuahua y uno de las razas, belgian shepered, labrador, y schnauzer. Del total de los animales diagnosticados, 15 fueron hembras y 13 machos; 20 animales eran menores de 5 años (11 hembras y 9 machos) y 8 mayores de 5 años (2 hembras y 6 machos). Se tomaron en cuenta mascotas que acudieron a consulta, con diagnóstico previo para realizar las quimioterapias en la clínica.

El diagnóstico se realizó por reconocimiento físico completo con palpación cuidadosa de ganglios linfáticos regionales (inguinal, iliaco externo, iliaco interno, y sacro), palpación digital vía vaginal o rectal y exploración vaginoscópica en las hembras y, exposición del pene en machos. Todos los pacientes positivos al diagnóstico morfológico fueron iniciados en la quimioterapia.

Un médico veterinario realizó la encuesta a los dueños de la mascota que incluyó, el nombre del animal, la edad, sexo, raza, si fue esterilizado, si fue rescatado, si fue cruzado, cómo detectó el propietario el problema, que primera conclusión dio el propietario al problema y región del tumor; de la misma manera se incluía información sobre el acceso de los animales a la calle. De la misma manera se preguntó a los propietarios signos de alarma para la consulta que podían incluir sangrado, visualización de la malformación o si la consulta fue la que comprobó el problema. La encuesta no aclaró si animales rescatados tenían cruzamiento previo y si tenían contacto con otras mascotas. Se utilizó la plataforma RStudio versión 4.03 para el análisis de las proporciones utilizando la distribución de chi cuadrado y para la salida gráfica.

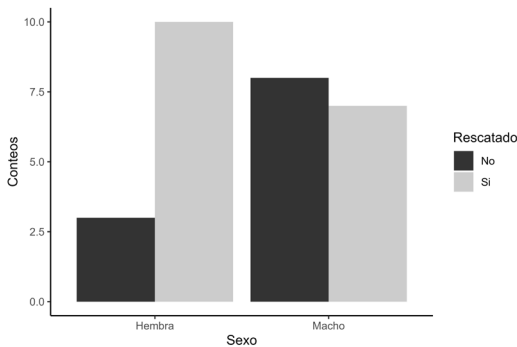
## RESULTADOS

En la Figura 1 se presenta la proporción de animales esterilizados y no esterilizados; la proporción de machos no esterilizados que presentó el tumor fue considerablemente mayor ( $p < 0,05$ ) que en hembras no esterilizadas (80 y 20%); por lo contrario, esa proporción fue mayor en hembras esterilizadas comparadas con los machos (70 y 30%); sin embargo, esa diferencia no fue significativa ( $p > 0,05$ ). En total 18 animales esterilizados presentaron el tumor y 10 no esterilizados también los presentaron ( $p > 0,05$ ).



**Figura 1.** Proporción de hembras y machos con y sin esterilización que presentaron CTVT

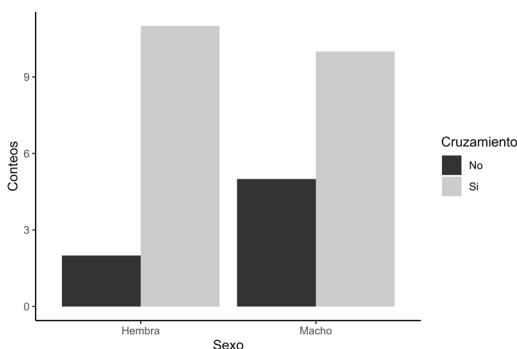
Otro factor que se relaciona con la presencia de la patología es la falta de cuidado, lo que lleva a los animales a vivir en la calle; en la Figura 2 se presenta la proporción de animales rescatados y no rescatados que presentaron el tumor.



**Figura 2.** Proporción de hembras y machos no y rescatados que presentaron CTVT

La presencia del tumor fue considerablemente más alta en machos no rescatados con respecto a hembras en la misma condición (73 y 27%). La proporción para animales rescatados fue de 59 y 41% para hembras y machos respectivamente. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativa ( $p > 0,05$ ). En total de 28 animales con el tumor el 57% fueron rescatados y 43% no lo fueron.

Por otro lado, se evaluó la presencia de CTVT en animales cruzados y no cruzados (Figura 3).

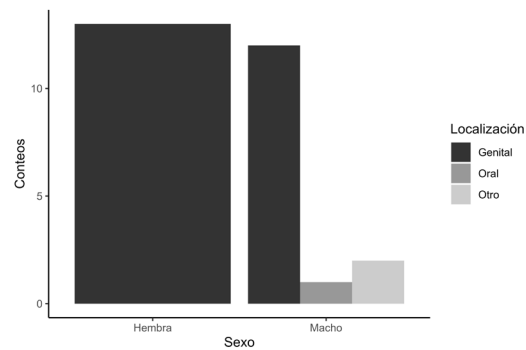


**Figura 3.** Proporción de hembras y machos no y cruzados que presentaron CTVT

En el presente estudio, la presencia del tumor fue considerablemente más alta ( $p < 0,008$ ) en animales cruzados en comparación con animales no cruzados (75 y 25% respectivamente). Al comparar por sexo, los porcentajes de hembras cruzadas con presencia del tumor fue ligeramente mayor comparada con machos (53 y 47%). Para animales no cruzados dicho porcentaje fue mayor en machos que en hembras (71 y 29%); sin embargo, por sexo y cruzamientos las diferencias no fueron significativas ( $p > 0,05$ ).

Con la encuesta aplicada se analizaron los signos de alarma para la detección del tumor por parte de los propietarios; los resultados mostraron que no se presentaron diferencias estadísticas en los signos de alarma; los mencionados fueron el sangrado, la consulta al veterinario o la visualización directa del tumor ( $p > 0,05$ ). En cuanto a la localización del tumor, lo más común fueron lesiones en la región genital (Figura 4), 25 de 28 animales afectados

las presentaron en esa zona ( $p < 0,05$ ). La presentación oral y otras presentaciones del tumor solo fueron evidenciadas en machos.



**Figura 4.** Localización más frecuente de CTVT

## DISCUSIÓN

El CTVT ha sido reportado prácticamente en todos los continentes; es menos frecuente en Europa del Norte y Central y en América del Norte, esto se atribuye al control de las poblaciones de perros callejeros, los exámenes minuciosos previos a los programas reproductivos y el tratamiento eficaz de los casos clínicos; por lo que esta enfermedad es más común particularmente en el sur de los Estados Unidos, Centro y Sur América (Ganguly et al. 2010).

Cómo en este estudio, la observación clínica todavía se usa ampliamente para diagnosticar CTVT; sin embargo, la citología ha ganado importancia como método para el diagnóstico de la enfermedad. Un estudio basado en encuestas a veterinarios, arrojó que el 47,4% mencionó como método diagnóstico principal la citología, seguido de la observación clínica y la histopatología con un 26,3 y un 13,1%, respectivamente (Awaluddin et al. 2021).

En cuanto a la relación del sexo del animal con la enfermedad, varios estudios coinciden con una mayor presencia de CTVT en hembras que en machos. Un estudio realizado en México, menciona que de 303 perros callejeros sacrificados, el tumor se presentó en el 3% de las hembras y 2,18 de los machos; todos los individuos fueron igual o menores a 4 años (Ortega-Pacheco et al. 2003). De otro lado, también en México, la tendencia fue mayor en machos que en hembras aunque sin diferencias significativas (19% y 17%); en dicho estudio la edad con mayor presencia de la enfermedad fue la comprendida entre los 3 a 4 años con el 21% (Cruz et al. 2010).

Lo anterior se atribuye a que las hembras pueden proparar más fácilmente la enfermedad cuando se encuentran en celo (Abeka 2019) y se reporta que los perros castrados y las hembras esterilizadas registran menor prevalencia del tumor (Strakova y Murchison 2014). En el estudio de encuestas mencionado anteriormente, 28 de los veterinarios encuestados (18,4%) respondieron que la mayoría de sus animales tratados por la patología estaban castrados y los 124 restantes (81,6%) informaron que estos animales no lo estaban (Arcila-Villa et al. 2018)

Otro factor determinante parece ser la presencia de los animales en las calles, esto aumenta su exposición y por ende el riesgo de contraer la enfermedad. Investigadores



reportaron que caninos mestizos, razas grandes, machos sexualmente activos (1 a 5 años) y los perros callejeros, aun cuando se les había reportado un propietario, son los más afectados (Grandez et al. 2011). En la india en un estudio que involucró 38 animales, 21% de castrados/esterilizados y un 79% estaban enteros, se comparó con casos-controles y se determinó un OR de 0,7 como factor de protección de los animales castrados (Kabuusu et al. 2010). Sin embargo, la castración no elimina por completo el riesgo de que el perro contraiga CTVT extragenital, dichos contagios pueden ocurrir por un comportamiento de socialización no relacionado necesariamente con el apareamiento (Nalubamba 2015), la enfermedad se puede transmitir fácilmente dentro de un hogar por la llegada de perro nuevo, incluso si otros perros en el hogar están castrados o esterilizados (Das et al. 2020).

Si bien el tumor venéreo transmisible es una neoplasia que se encuentra principalmente en la zona genital, se puede encontrar en otros sitios como una lesión única (Lima et al. 2013). En el presente trabajo la mayoría de los casos mostraron lesiones en el área genital, encontrándose solo un caso con presencia en la zona oral. El tumor se ha observado en nariz, la boca, ojos, así como la piel y los ganglios linfáticos superficiales; incluso se ha reportado recientemente un caso en el que el tumor produjo un aumento de volumen en la región periorbitaria, desplazamiento ocular lateral izquierdo, epistaxis excesiva en fosa nasal izquierda, estornudos recurrentes, tos y signos de dolor (Silva et al. 2022). De la misma manera, una masa rojiza en la órbita derecha fue reportada en un perro mestizo de 4 años. La masa invadía la cámara anterior del ojo derecho, el diagnóstico de CTVT se confirmó en la histopatología (Do Amaral et al. 2012). El tumor también se ha observado en glándulas mamarias inguinales derecha e izquierda acompañado de sangrado vulvar (Dos Santos et al. 2014). En pacientes con estado inmune anormal el tumor puede migrar a órganos internos; investigadores reportaron hallazgos en bazo (Romero et al. 2010) y también reportaron múltiples nódulos en cuerpo, vulva, mucosa ocular y encías (Faccini et al. 2019). Por otro lado, en Brasil se reportaron como los sitios mayor frecuencia de CTVT en más de 3.000 pacientes fueron el área genital (86%), piel (21,8%), nasal (10%) y en menor proporción región linfática (<10%) seguido de lesión oral, anal, perianal y ocular (Pimentel et al. 2021).

El número de animales con acceso a la calle y no castrados, es alto en México; lo anterior aunado a la falta de una política de protección animal eficiente incrementan el riesgo a CTVT; el presente trabajo reafirma la importancia de la esterilización, el cruzamiento controlado, como estrategias para disminuir el riesgo de la enfermedad; así como el papel del cuidador para la detección temprana del tumor y con ello un tratamiento inmediato para evitar lesiones mayores.

## ORCID

Rodríguez Castillejos, G.C. <https://orcid.org/0000-0003-0205-9340>

Jiménez Becerril, M.F. <https://orcid.org/0000-0003-4764-8325>

García León, I. <https://orcid.org/0000-0002-7876-1219>.

Hernández Mendoza, J.L. <https://orcid.org/0000-0002-1233-0133>

Lizarazo Ortega, C. <https://orcid.org/0000-0002-0010-9386>

## REFERENCIAS

1. Abedin SN. Canine transmissible venereal tumor: A review. *J. Entomol. Zool. Stud.* 2020; 8: 596-599.
2. Abeka YT. Review on Canine Transmissible Venereal Tumor (CTVT). *Cancer. Ther. Oncol. Int. J.* 2019; 14: 86-94.
3. Arcila-Villa A, Dussán-Lubert C, Pedraza-Ordoñez F. Distribution and prevalence of transmissible venereal tumor in the Colombian canine population. *Rev. Colom. Cienc. Pec.* 2018; 31: 180-187.
4. Awaluddin A, Etriwati E, Habiburrahman SN, Rusyidi R, Balqis U, Iskandar CD, Hasan DI. Diagnose Enforcement of Case Canine Transmissible Venereal Tumor (CTVT) on Domestic Dog. In *2nd International Conference on Veterinary, Animal, and Environmental Sciences (ICVAES 2020)*. Atlantis Press. 2021; pp. 157-162.
5. Cruz JP, Núñez CR, Martínez GDM, Contreras CAG. Tumor venéreo transmisible en caninos del área metropolitana de la ciudad de México. *Revista Científica.* 2010; 20: 362-366.
6. Das D, Kumthekar S, Manikantha KGV, Achary KH. Sticker tumour (Transmissible venereal tumour) in dog. *J. Pharm. Innov.* 2020; 9: 126-130.
7. do Amaral AVC, de Oliveira RF, da Silva ADS, Baylão ML, Luz LDC, de Sant'Ana FJF. Intraocular transmissible venereal tumor in a dog-case report. *Vet Zootec.* 2012; 19(1): 779-785.
8. Dos Santos Horta R, Da Fonseca LS, Miranda DFH, Quessada AM, De Rocha Neto HJ, De Sousa Silva SMM. Tumor venéreo transmissível (TVT) com metástase para a glândula mamária. *Acta. Sci. Vet.* 2014; 42: 1-6.
9. Faccini LS, Legramanti WM, De Castro LT, Coelho ACB, Teixeira MC, Shild AL, Pereira CM. Multiple metastases of a transmissible venereal tumor in a dog. *Acta. Sci. Vet.* 2019. 47.
10. Ganguly B, Das U, Das AK. Canine transmissible venereal tumour: a review. *Vet. Comp. Oncol.* 2016; 14: 1-12.
11. Grandez R, Miguel de Priego C, Yi P, Torres L. Tumor venéreo transmisible canino extragenital: estudio retrospectivo de 11 casos. *Rev. Investig. Vet. Peru.* 2011; 22: 342-350.
12. Kabuusu RM, Stroup DF, Fernandez C. Risk factors and characteristics of canine transmissible venereal tumours in Grenada, West Indies. *Vet. Comp. Oncol.* 2010; 8: 50-55.
13. Lima TB, Marinho PVT, Lira RN, Jark PC, Melo JFP, Oliveira LCR. Canine transmissible venereal tumor in a dog with single extragenital location/Apresentacao atípica de tumor venereo transmissível cutâneo em um cão/Localización cutánea de tumor venereo transmisible en un perro. *Vet. Zootec.* 2013; 20: 57-62.

14. Mello Martins M I, Ferreira de Souza F., Gobello C. The canine transmissible venereal tumor: etiology, pathology, diagnosis and treatment. In: *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. (Concannon, P.W., England, G., Veretegen, J. and Linde-Forsberg, C. eds.), International Veterinary Information Service, Ithaca NY ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)) Apr 25, 2005: A1233.0405.
15. Murchison EP, Wedge DC, Alexandrov LB, Fu B, Martincorena I, Ning Z, Stratton MR. Transmissible dog cancer genome reveals the origin and history of an ancient cell lineage. *Science*. 2014; 343(6169): 437-440.
16. Nak D, Nak Y, Cangul IT, Tuna B. A Clinico pathological study on the effect of vincristine on transmissible venereal tumour in dogs. *J. Vet. Med. A*. 2005; 52(7): 366-370.
17. Nalubamba KS. Unusual Presentation of Extra-Genital Canine Transmissible Venereal Tumor in an Adult Cross-Breed Dog—Palatine and Rectal Lesions without Primary Genital Lesions. *J. Vet. Sci. Med Diagn*. 2015; 4: 2.
18. Ortega-Pacheco A, Acevedo-Arcique M, Sauri-Arceo C, Bolio-González M, Gutiérrez-Blanco E. Prevalencia de tumor venéreo transmisible en perros callejeros de la ciudad de Mérida, Yucatán, México. *Revista Biomédica* 2003; 14: 83-87.
19. Park M, Kim Y, Kang M, Oh S, Cho D. Disseminated trans-missible venereal tumor in a dog. *J. Vet. Diag. Invest*. 2006; 18: 130-133.
20. Pimentel PA, Oliveira CS, Horta RS. Epidemiological study of canine transmissible venereal tumor (CTVT) in Brazil, 2000–2020. *Prev. Vet. Met*. 2021; 197: 105526.
21. Purohit GN. Canine Transmissible Venereal Tumors: A review. *The Internet J. Vet. Med*. 2009; 6: 1-10.
22. Romero RR, De Jalón Ciercoles JAG, Garza AMN, Tovar LER. Tumor venéreo transmisible con metástasis a un hemangioma esplénico en una perra. *Vet. Mex*. 2010; 41: 305-310.
23. Sánchez IGQ, Nuñez ACE, Sánchez FHS. Tratamientos alternativos em tumor venéreo transmissível em caninos. *Ces. Med. Vet. Zootec*. 2020; 15: 25-40.
24. Silva I, Marinho AFS, Da Fonseca T, Tôres LAG, De Carvalho EDSP, Marques LC, Paredes LJA. Nasal Transmissible Venereal Tumor (TVT) with Bone Metastasis in a Dog. *Acta. Sci. Vet*. 2022; 50.
25. Stockmann D, Ferrari HF, Andrade HL, Lopes RA, Cardoso TC, Luvizotto MCR. Canine transmissible venereal tumor; aspects related to programmed cell death, Brazil. *J. Vet. Pathol*. 2011; 4: 67-75.
26. Strakova A, Murchison EP. The changing global distribution and prevalence of canine transmissible venereal tumour. *BMC Vet. Res*. 2014; 10:1-11.
27. Vendramini TH, Amaral AR, Pedrinelli V, Zafalon RV, Rodrigues RB, Brunetto MA. Neutering in dogs and cats: current scientific evidence and importance of adequate nutritional management. *Nutr. Res. Rev*. 2020; 33: 134-144.

## Revista Veterinaria obtuvo el máximo nivel de categorización delCAICYT–CONICET

Tras el pertinente proceso de evaluación según criterios de calidad editorial, en setiembre de 2005 CAICYT–CONICET ha clasificado a nuestra publicación con Categoría 1 (nivel superior de excelencia), con lo cual pasa a integrar el Catálogo Latindex (folio 14022). La Dirección de Revista Veterinaria agradece a quienes colaboraron para obtener tan importante distinción.

Ver: <http://www.latindex.unam.mx/busquedas/catalogotitulo.html>



## Detección de pacientes COVID-19 en muestras de sudor por medio del olfato canino: Estudio preliminar

Álvarez G.<sup>1\*</sup> ; Carancci P.<sup>2</sup> ; De los Santos F.<sup>2</sup> ; Zapata A.<sup>3</sup> ; Lorenzo H.R.<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Carrera de Esp. en Bienestar Animal. <sup>2</sup>Secretaría de Extensión. <sup>3</sup>Escuela de Adiestramiento Canino. Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad de Buenos Aires, Chorroarín 280 CABA. Argentina.

\*E-mail: guadalupealvarez@fvvet.uba.ar

### Resumen

Los componentes orgánicos volátiles generados por cambios en el metabolismo de un individuo han sido utilizados para el diagnóstico de enfermedades a través del olfato canino. Hay evidencias sobre la generación de dichos componentes en la infección por SARS-COV-2. El objetivo del trabajo fue determinar la capacidad canina para discriminar a pacientes positivos y negativos a COVID-19 a través de muestras de sudor axilar. Se utilizaron muestras de sudor axilar de 102 pacientes hospitalizados tanto COVID-19 positivos (31) como negativos (71), todos diagnosticados mediante la prueba de RT-PCR. Por cada ronda de detección se colocó una única muestra positiva y el resto de las muestras (sean 1, 2, 3, 4 o 5) negativas. La sensibilidad y especificidad global fue de 93,11% ( $\pm 3,14\%$ ) y 88,52% ( $\pm 4,64\%$ ) respectivamente. La alta sensibilidad pudo deberse al entrenamiento más prolongado aumentando así, la exactitud en la detección de muestras positivas. La especificidad fue menor a otra publicada pudiéndose deber a que las muestras negativas provenían de personas internadas por otras patologías o eran acompañantes de familiares internados por lo que todas poseían olor hospitalario. La detección de pacientes COVID-19 mediante el olfato canino ha demostrado ser una prueba tamiz confiable y prometedora.

**Palabras clave:** COVID-19, componentes orgánicos volátiles, olfato canino.

## Detection of COVID-19 patients in sweat samples using canine sense of smell: Preliminary study

**Abstract.** Volatile Organic Compounds generated by changes in the metabolism of an individual have been used for the diagnosis of diseases through canine sense of smell. There is evidence of the generation of these compounds in SARS-COV-2 infection. The objective of the work was to determine the canine capacity to discriminate between positive and negative patients with COVID-19 through samples of axillary sweat. Axillary sweat samples were used from 102 hospitalized patients both COVID-19 positive (31) and negative (71), all diagnosed by rt-PCR test. For each round of detection, a single positive sample was placed and the rest of the samples (whether 1, 2, 3, 4, or 5) were negative. The overall sensitivity and specificity were 93.11% ( $\pm 3.14\%$ ) and 88.52% ( $\pm 4.64\%$ ) respectively. The high sensitivity could be due to the longer training thus increasing the accuracy in the detection of positive samples. The specificity was than lower another published and may be due to the fact that the negative samples came from people hospitalized for other pathologies or were companions of hospitalized family members, so that all had a hospitable odor. Detecting COVID-19 patients using canine smell has proven to be a reliable and promising sieve test.

**Key words:** COVID-19, volatile organic components, canine sense of smell.

### INTRODUCCIÓN

La participación de canes en el campo de la detección mediante el olfato se ha ampliado extensamente, siendo la salud humana la más beneficiada. Enfermedades de origen

oncológico, bacteriano, viral, parasitario, metabólico, neurológico, etc., han sido detectadas en pacientes, a través del olfato de perros entrenados (Helton et al. 2009, Moser 2010, Bijland et al. 2013, Bomers et al. 2014, Angle et al. 2016b, Guest et al. 2019, Heather Junqueira et al. 2019, Kasstan et al. 2019).

Cientos de componentes orgánicos volátiles (COVs) o biomarcadores son emitidos por el cuerpo reflejando la condición metabólica de un individuo. Por lo tanto, contraer una enfermedad infecciosa, metabólica, u otras; frecuentemente resulta en un cambio del olor corporal (Shirasu et al. 2011, Angle et al. 2016a, Ibrahim et al. 2021). La presencia de los denominados COVs (o por sus siglas en inglés VOC's Volatile Organics Compounds) en pacientes que cursan con enfermedades, ha sido descrita en multiplicidad de trabajos científicos publicados en revistas reconocidas mundialmente (Shirasu et al. 2011, Horvath et al. 2013, Angle et al. 2016a, Biehl et al. 2019, Heather Junqueira 2019, Course et al. 2021). En el caso de las enfermedades virales de origen respiratorio, Aksenov et al. (2014) revelaron que los patrones de COV en respuesta a la infección de tres subtipos de virus de Influenza aviar y humana [H9N2 (aviar), H6N2 (aviar) y H1N1 (humana)] fueron únicos para cada cepa, mientras que otros COV no específicos fueron producidos luego de la infección con las tres cepas del virus.

La participación de canes en la detección de la infección en humanos por SARS-CoV-2 tuvo un amplio crecimiento tanto en términos de investigación como en implementación durante la pandemia. Países como Argentina, México, Chile, Brasil, Colombia, Estados Unidos, Alemania, Francia, Bélgica, Reino Unido, Finlandia, Australia, Emiratos Árabes, Líbano y Ruanda iniciaron investigaciones de diferente alcance en la temática. En algunos casos, se utilizaron canes entrenados para propósitos médicos como la detección de enfermedades, tal fue el caso de Alemania y Líbano. En otros países, como en Argentina y Francia, participaron canes pertenecientes a divisiones de las fuerzas del orden público entrenados para detección de explosivos, para rescate de personas y de rastro.

El ensayo en Argentina fue ejecutado en el año 2020 con la asesoría técnica del Dr. Granjean, de la Universidad de Alfort en Francia. Se siguieron los estándares del grupo de investigación francés y al momento de la ejecución pocos países habían hecho sus publicaciones de sus resultados. Investigadores alemanes, utilizaron 8 perros de detección que fueron entrenados durante 1 semana para detectar SARS-CoV-2 en saliva y secreción traqueobronquial obteniendo una sensibilidad del 82,63% y una especificidad del 96,35% (Jendmy et al. 2020). Por otra parte, los investigadores franceses y libaneses en un trabajo conjunto utilizaron 6 canes (perros detectores de explosivos, de rescate y detectores de cáncer de colon) entrenados durante 1 a 3 semanas para detectar SARS-CoV-2 en muestras de sudor (Grandjean et al. 2020).

El adiestramiento para la detección de olores se realiza a partir de un aprendizaje asociativo (Helton et al. 2009) mediante el cual el perro aprende que donde están las partículas odorantes se encuentra el elemento de recompensa, el cual acciona como reforzador positivo (éste puede ser desde una pelota o en algunos casos, alimento). El entrenamiento para la detección del SARS-CoV-2 a través de las diversas matrices utilizadas, consistió en todos los casos, en exponer al olfato canino las muestras en dispositivos diseñados para tal fin. Los dispositivos varían en tecnología y presentación, pero en todos los casos, cuentan con un

“cono de olfacción” y un sitio de colocación de la muestra. Las muestras utilizadas por los diferentes grupos de investigadores fueron saliva, secreciones respiratorias, sudor (y/o olor corporal), aliento de exhalación y orina.

En relación con la situación sanitaria mundial actual, donde un nuevo coronavirus denominado SARS-COV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome – Coronavirus -2) responsable de una enfermedad respiratoria severa en el ser humano llamada COVID-19 por sus siglas en inglés Coronavirus Disease 19 (enfermedad por coronavirus – 19) ha generado una pandemia de gran envergadura a nivel mundial.

Los métodos de diagnóstico para la detección de SARS-COV 2 se basan en la búsqueda y amplificación del material genético (ARN) del agente viral, utilizando para tal fin la técnica de PCR, y en la detección de antígenos y/o anticuerpos en muestras séricas (test serológicos) que demuestran que el individuo bajo estudio tomó contacto con el virus (Moser et al. 2010).

La alta tasa de contagios que se han registrado en algunos países ha requerido un testeo masivo en sectores o áreas vulnerables que han demandado tiempo y recursos cuantiosos. Esta realidad plantea mayores esfuerzos y desafíos a la comunidad científica para lograr la detección del virus con mayor celeridad en personas que transitan por distintos ámbitos de un territorio (barrios, aeropuertos, centros urbanos, centros comerciales, etc.), y a menores costos.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la capacidad de detección de pacientes COVID-19 positivos, a través de muestras de sudor, mediante el sentido del olfato de caninos entrenados. A partir de los resultados obtenidos se determinan los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y porcentaje de detección para esta técnica diagnóstica. Adicionalmente se comparan los resultados con otros autores con ensayos de metodología similar.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron 102 muestras de sudor axilar mediante dispositivos de gasa tubular hidrófila estéril de 10 x 10 cm, de 31 pacientes COVID-19 positivos (con síntomas clínicos de la enfermedad) y 71 negativos; ambos confirmados por RT-PCR para SARS-CoV-2. Las muestras se identificaban al arribar desde la institución hospitalaria con la letra P (positivas a COVID-19) y la letra N (negativas a COVID-19) seguida de un número de orden. Los pacientes se encontraban hospitalizados al momento de la toma de muestra e incluían a personas de ambos sexos y cualquier edad. Las muestras fueron tomadas por el personal de salud perteneciente al Hospital de Clínicas de la Universidad de Buenos Aires y acondicionadas en bolsas de cierre hermético para su traslado. Con el propósito de generar un mayor margen de seguridad ante la manipulación de las muestras, cada una de ellas fue almacenada por 72 h previo a su utilización en el ensayo. En la Tabla 1 se muestran la distribución de muestras positivas y negativas según la edad y género.

**Tabla 1.** Distribución de las muestras de sudor axilar según género y edad.

Edad	Muestras Positivas		Muestras Negativas	
	Género			
	FEMENINO	MASCULINO	FEMENINO	MASCULINO
0 – 19 años	0	0	7	2
20 – 29 años	0	1	27	3
30 – 39 años	5	2	11	5
40 – 49 años	3	2	3	5
50 -59 años	4	4	1	2
60 – 69 años	3	2	1	2
70 – 79 años	3	2	2	0
TOTAL	18	13	52	19

Se seleccionaron 9 perros mayores de 2 años, machos y hembras con entrenamiento previo en materia de detección de explosivos pertenecientes a Instituciones Nacionales vinculadas a las fuerzas de seguridad. También fueron incluidos dos perros de adiestradores particulares con entrenamiento en la búsqueda de rastro. En la Tabla 2 se muestran los canes participantes en el ensayo.

Entre el mes de noviembre y diciembre del 2020 se llevó a cabo el ensayo para la detección mediante el olfato canino de muestras de sudor axilar de pacientes con COVID-19 en dependencias de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UBA).

Los perros durante las jornadas de trabajo fueron conducidos por sus respectivos guías. El binomio se mantuvo

**Tabla 2.** Datos de identificación de los perros participantes en el estudio.

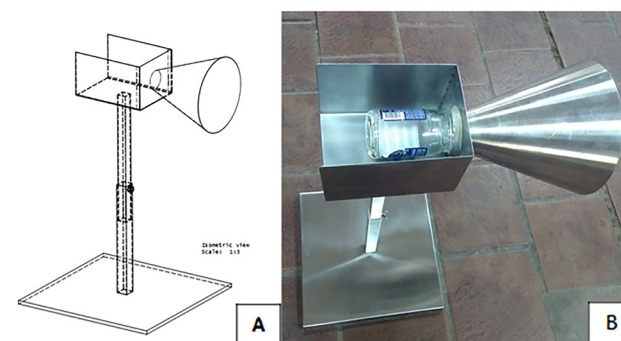
N°	Nombre	Raza	Sexo	Edad	Trabajo
1	IRU	Pastor Alemán	Macho (estéril)	2 años	Rastro
2	AKIRA	Pastor Alemán	Hembra	2 años	Detección explosivos (Policía PBA)
3	APOLO	Pastor Belga	Macho	2,5 años	Detección explosivos (Policía PBA)
4	ARGOS	Pastor Belga	Macho	2 años	Detección explosivos (Policía PBA)
5	KINDU	Pastor Alemán	Macho	2 años	Detección explosivos (Policía PBA)
6	ODIN	Pastor Belga (Mallinois)	Macho (estéril)	2 años	Rastro
7	MAIA	Pastor Belga	Hembra	4,5 años	Detección explosivos (Gendarmería)
8	FUSER	Mestizo	Macho (estéril)	7,5 años	Rastro
9	THOR	Labrador	Macho	2 años	Detección explosivos (Prefectura)

*PBA: Provincia de Buenos Aires.*

a lo largo de todo el ensayo. Los canes tuvieron un período de  $28 \pm 2$  días de adaptación previo al ensayo para lograr nivelar el desempeño del grupo y homogeneizar el modo de trabajo. Durante este tiempo se ejercitó en la disciplina necesaria para ejecutar la modalidad de trabajo elegida (olfación en dispositivos dispuestos en línea, tipo de refuerzos positivos), puntualizando en aspectos vinculados a la estabilidad emocional del can, fomentando la motivación por la búsqueda, y poniendo en práctica un sistema de marcación pasiva con focalización en la fuente odorante. Por otra parte, se evaluó y se reentrenó al conductor, solo en casos necesarios, para lograr tener control permanente de su perro, saber interpretar las señales corporales relacionadas a los estados emocionales de este, poder conducirlo en una búsqueda punto por punto, y tener habilidad suficiente para otorgar el refuerzo.

Las muestras se dispusieron en frascos de vidrio y colocados en soportes de acero inoxidable. Dichos dispositivos

fueron fabricados para el entrenamiento en detección por olfacción, de los canes seleccionados. Las características de dichos soportes se grafican en la Figura 1.



**Figura 1.** A: Esquema de dispositivo para entrenamiento en detección mediante el olfato. B: Dispositivo de acero inoxidable utilizado durante los entrenamientos.

La ubicación de las muestras en los dispositivos fue de manera aleatoria, con el completo desconocimiento de los guías y los canes en cuanto a su ubicación (ensayo ciego). Un tercer participante (jefe de adiestradores) que se situó por fuera del circuito de detección conocía la ubicación de las muestras. Utilizando un generador de número aleatorios, el jefe de adiestramiento escogía una muestra positiva por ronda de detección y completaba el resto de los dispositivos de olfacción, con muestras negativas elegidas de la misma manera. Se registró toda aquella información vinculada a las muestras y a los resultados de su detección por personal auxiliar que no interfirió con el trabajo de los canes. El guía vocalizaba la marcación que su can realizaba frente a los dispositivos que contenían las muestras. Se tomaba nota de dicha marcación por parte del personal auxiliar que luego de terminada la jornada clasificaba los resultados junto con la información suministrada por el jefe de adiestramiento que conocía la posición de la muestra positiva en cada ronda.

Para cada ronda de detección se registró el número de verdaderos positivos (VP), falsos positivos (FP), verdaderos negativos (VN) y falsos negativos (FN). Los canes realizaron, por jornada de trabajo, entre 3 y 16 rondas de detección durante 18 días de entrenamiento como máximo y 11 como mínimo. En cada ronda se colocaba una única muestra positiva con otras negativas, que podían variar desde 1 a 5 muestras. El refuerzo ante el acierto en la detección de la muestra positiva durante cada ronda fue a través del juego por medio del lanzamiento de una pelota.

Para el análisis estadístico, dichos resultados se ponderaron con el número de muestras positivas de pacientes con COVID-19 y muestras negativas que se ofrecían para cada jornada de trabajo. A partir de estos valores se calcularon la sensibilidad (SE), especificidad (ES), valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y el porcentaje de detección (precisión de la prueba).

Para el análisis estadístico se utilizaron los softwares STATISTIX® Inc. e Infostat® versión 2020. Se realizó un test de Normalidad (Shapiro Wilks) para las variables calculadas tomando los valores obtenidos el día 1 del ensayo propiamente dicho (excluyendo los días previos de adaptación). Según su distribución, se comparó mediante un Análisis de Varianza de una vía (Test de Medidas Repetidas de una vía), la diferencia de medias de las variables bajo

estudio teniendo en cuenta los factores tiempo (días en entrenamiento) e individuos participantes (canes detectores). Luego del análisis de varianza se realizó un post-ANOVA mediante comparaciones múltiples utilizando el Test de Tukey. Se comparó a través del Test T-Student los valores de SE, ES, VPP, VPN y el porcentaje de detección con aquellos publicados por otros autores (Jendry et al. 2020). Los resultados obtenidos se expresaron mediante la media aritmética  $\pm$  el desvío estándar (DE) y se construyeron intervalos de confianza (95%) para las variables estudiadas. El nivel de significación utilizado fue del 5%.

Con el propósito de evaluar el bienestar animal (BA) durante todo el ensayo (período de adaptación y entrenamiento), se generaron primariamente, indicadores directos e indirectos vinculados a la actividad. Se conformó una planilla de sencilla (Figura 2) respuesta que fue utilizada para evaluar BA en cada perro participante por cada día de trabajo durante el ensayo. La tarea fue llevada adelante por observación directa, y su interpretación estuvo a cargo de un veterinario con conocimiento en BA que participó las jornadas de trabajo. Los indicadores utilizados comprendieron aspectos vinculados a; tiempos y espacios de trabajo y descanso, disponibilidad de agua durante el trabajo, manifestaciones del comportamiento (relación con su guía, conductas de exploración, manifestación de frustración, miedo, ansiedad, angustia, aburrimiento) y presencia de lesiones y enfermedades. Se elaboró una planilla que contenía los indicadores seleccionados para la evaluación de bienestar animal

El proyecto contó con la aprobación del CICUAL (Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación), bajo el número de protocolo 2020/10.

## RESULTADOS

Los resultados de VP, FP, VN y FN obtenidos en las rondas de detección para cada uno de los perros se muestran en la Tabla 3. El total de muestras presentadas a los canes en las rondas de detección durante todo el ensayo fueron de 3.959 de las cuales 1.277 fueron positivas y 2.682 negativas. En la Tabla 3, se exponen la cantidad de muestras positivas que se presentaron para cada can detector durante todo el trabajo.

**Tabla 3.** Resultados obtenidos durante las rondas de detección para cada canino participante.

ID	PERRO	VP	FP	VN	FN	MUESTRA	MUESTRA	TOTAL DE MUESTRAS
						POSITIVAS	NEGATIVAS	
1	IRU	144	52	303	16	160	355	515
2	ODIN	145	29	335	14	159	364	523
3	FUSER	156	14	315	4	160	329	489
4	THOR	109	34	167	14	123	201	324
5	MAIA	146	46	202	10	156	248	404
6	KINDÚ	130	47	308	13	143	355	498
7	ARGOS	129	32	310	11	140	342	482
8	APOLO	122	28	271	10	132	299	431
9	AKIRA	102	17	172	2	104	189	293
	<b>TOTAL</b>	<b>1183</b>	<b>299</b>	<b>2383</b>	<b>94</b>	<b>1277</b>	<b>2682</b>	<b>3959</b>

ID: identificación can. VP: verdadero positivo. FP: falso positivo. VN: verdadero negativo. FN: falso negativo

De estos resultados se calcularon las variables porcentaje de detección, SE, ES, VPP y VPN. El porcentaje de detección obtenido a lo largo del ensayo, fue del 90,07%  $\pm$  3,72% (IC 95%: 87,64-92,50%). La sensibilidad y especificidad global fue de 92,64% ( $\pm$  3,21%) y 88,85% ( $\pm$  4,64%) respectivamente. El intervalo de confianza del 95% para la SE fue de 90,54-94,74% y para la especificidad fue de 85,82-91,88%. Los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) también fueron evaluados. El VPP fue de 79,82  $\pm$  6,11% con un IC de 75,82-83,82 %. El VPN fue de 96,21  $\pm$  1,99% con un IC de 94,91-97,51%.

El test de normalidad (Test de Shapiro Wilks) mostró que todas las variables bajo estudio. Se distribuyeron normalmente ( $p > 0,05$ ).

Con el propósito de analizar el efecto del tiempo de entrenamiento y de los canes detectores sobre las variables bajo estudio, se utilizó un Análisis de Varianza para medidas repetidas y luego un Test de Tukey para comparaciones

múltiples. Los resultados muestran una diferencia significativa vinculada a los días en entrenamiento en todas las variables ( $p < 0,05$ ) observando un incremento en los valores de las mismas conforme transcurren los días de trabajo. En cuanto a los canes, también se evidenció diferencias entre ellos pudiéndose observar que tres fueron los que se destacaron en la obtención de mejores resultados en todas las variables (Fuser, Akira y Odín). El efecto del factor «días de entrenamiento» sobre las variables en estudio puede observarse en la Figura 2. El factor “can” también tuvo impacto en los resultados, permitiendo confirmar que existe una diferencia en el desempeño entre los individuos participantes.

Esta parte del protocolo debe dar mayor a 2. Si da inferior a dos, dos días seguidos, el perro pasara a reevaluación (ver si puede seguir formando parte del proyecto bajo evaluación)					
			SI	NO	Observaciones
Expresión de comportamiento	Responde bien al entrenamiento	¿Responde a un entrenamiento básico, al manejo?	1	0	
	Interacción con su entrenador	El animal tiene una relación positiva con su guía?	1	0	
	Exploración	¿Manifiesta una conducta exploratoria ante nuevos estímulos?	1	0	
	Tiempo que mantiene el entrenamiento entre descansos	Mantiene atención plena en el entrenamiento?	1	0	
Esta parte del protocolo debe dar menor a 2. Si da superior a dos días seguidos, el perro pasara a reevaluación (ver si puede seguir formando parte del proyecto bajo evaluación)					
			SI	NO	Observaciones
Expresión de comportamiento	Frustración, aburrimiento, ansiedad	Reacciona negativamente ante la posibilidad de no encontrar el objeto para el cual se lo está entrenando?	1	0	
		Se presenta ansioso o con incapacidad de concentración en los ejercicios que se les están presentando?	1	0	
		En los periodos fuera del entrenamiento, ¿permanece inactivo?	1	0	
Esta parte del protocolo debe dar menor a 1. Si da superior a uno dos días seguidos, el perro pasara a reevaluación (ver si puede seguir formando parte del proyecto bajo evaluación)					
			SI	NO	Observaciones
Miedo y angustia	Vocalizaciones que demuestran agresión o miedo	Realiza el ejemplar vocalizaciones que demuestran agresión o miedo?	1	0	
	Posturas físicas que denotan agresión o miedo	El ejemplar adopta posturas físicas que denotan agresión o miedo?	1	0	
	Esteretotipias	Se observan movimientos repetitivos, invariables sin función aparente?	1	0	

Esta parte del protocolo debe dar mayor a 3. Si da inferior a 3, el perro pasara a reevaluación (ver si puede seguir formando parte del proyecto bajo evaluación)

			SI	NO	Observaciones
Lesiones y enfermedades	Pelaje	¿Se encuentra el pelaje en condiciones adecuadas? (considerar cantidad, brillo e integridad)	1	0	
	Lesiones/heridas	¿El animal aparece libre de lesiones o heridas? (considerar alopecia, abrasión, sangrado, hematomas)	1	0	
	Locomoción	Deambula el animal sin dificultades (no hay claudicaciones, reticencia al caminar, saltar)	1	0	
	Signos de enfermedad	El animal parece sano a la observación directa, libre de enfermedad	1	0	
Incomodidad	Área de descanso/refugio	El animal cuenta con una apropiada área de descanso y refugio para descansos entre sesiones de entrenamiento, ¿la utiliza?	1	0	
Alimentación	Disponibilidad de agua	¿Cuenta con agua accesible y suficiente en todo momento? ¿Se observa tomar agua de alguno de los bebederos?	1	0	

Figura 2. Indicadores directos e indirectos para la evaluación del bienestar animal de los perros detectores participantes en el ensayo.

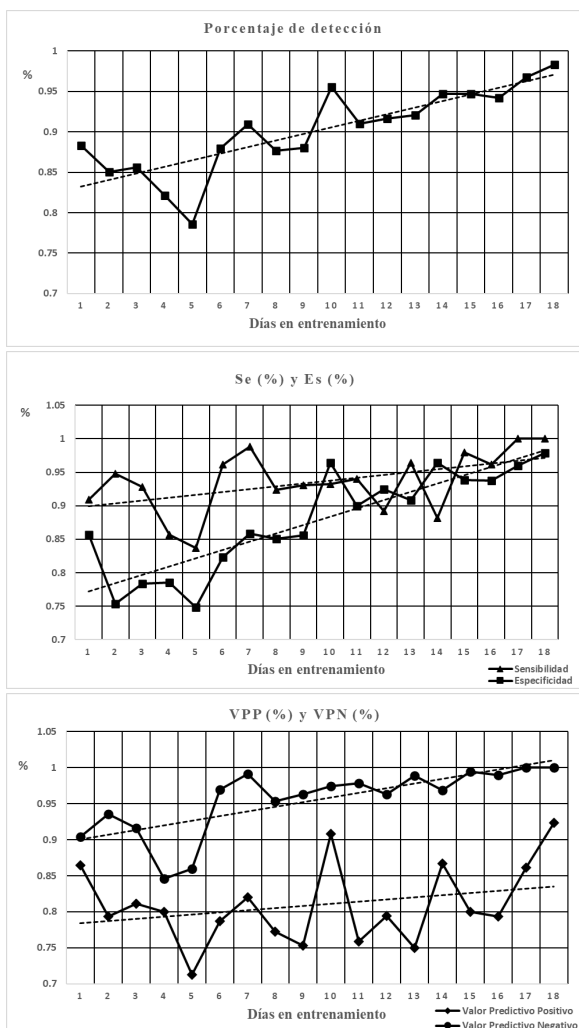


Figura 3. Valores de porcentajes de detección, sensibilidad (Se), especificidad (Es), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) durante los días en entrenamiento.

El porcentaje de detección obtenido en el presente ensayo resultó menor al publicado por Jendry et al. (2020), ( $94 \pm 3,4\%$ ) al compararlos mediante la prueba de T de Student para una media ( $p = 0,0070$ ). La prueba de T de Student para la media de la SE y ES al compararla con los valores publicados por los investigadores antes mencionados se presentan en la Tabla 4. La SE resultó ser significativamente superior en el trabajo de Jendry et al. (2020), aunque la especificidad fue menor. El VPP de este trabajo fue significativamente menor al VPP al publicado por los otros autores, en cambio el VPN de ambos ensayos fueron coincidentes (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación del porcentaje de detección, la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el valor predictivo negativo entre el presente estudio y aquel de Jendry et al. (2020).

Variable	Media $\pm$ DE	Hipótesis	Jendry et al. (2020)	P-value
% de detección	90,07 $\pm$ 3,72%	H0: $\mu = 94\%$ H1: $\mu < 94\%*$	94%	$p = 0,0070$ Rechazo H0
Sensibilidad	93,11 $\pm$ 3,14%	H0: $\mu = 83\%$ H1: $\mu > 83\%*$	83%	0,0000 Rechazo H0
Especificidad	88,52 $\pm$ 4,64%	H0: $\mu = 96\%$ H1: $\mu < 96\%*$	96%	0,0006 Rechazo H0
VPP	80,16 $\pm$ 6,12%	H0: $\mu = 84\%$ H1: $\mu < 84\%*$	84%	0,0482 Rechazo H0
VPN	96,32 $\pm$ 1,99%	H0: $\mu = 96\%*$ H1: $\mu \neq 96\%$	96%	0,6479 No rechazo H0

\* hipótesis que no fueron rechazadas por la prueba de T-Student para una media. VPP: Valor predictivo positivo. VPN: Valor Predictivo Negativo



A lo largo del entrenamiento se observó que la SE, ES, VPP y VPN se estabilizaban en valores máximos demostrando que prolongar el periodo de adiestramiento canino supone mayor precisión en la detección.

Los resultados de la evaluación de los indicadores en bienestar animal mostraron que, durante el ensayo, los canes, no manifestaron modificaciones en su comportamiento vinculadas a estrés, ansiedad o frustración.

## DISCUSIÓN

La generación de componentes orgánicos volátiles producidos por la interacción del virus con las células de sus huéspedes permite la existencia de un olor específico que puede ser utilizado con fines diagnósticos (Shirasu et al. 2011, Aksenov et al. 2014, Angle et al. 2016b). Las sustancias odoríferas desprendidas del organismo que cursa con COVID-19 han podido ser detectadas por perros entrenados para tal fin. Este hecho pone de manifiesto que es posible discriminar individuos que cursan con la enfermedad de aquellos que no, permitiendo de este modo reducir la diseminación del agente dentro de la población, ya que permite adoptar medidas de manera precoz. La utilización de canes entrenados para poder detectar individuos COVID-19 resulta en una estrategia útil, económica y rápida si se la concibe como una prueba tamiz o screening. El análisis integral de los resultados obtenidos del uso del olfato canino para la detección de muestras positivas de COVID-19 mostró ser una técnica útil como prueba diagnóstica tamiz. Trabajos precedentes han publicado resultados similares y concluyen que es posible utilizar caninos entrenados en terreno para el diagnóstico de personas infectadas por SARS-COV-2 (Grandjean et al. 2020). El porcentaje de detección, la SE, la ES, el VPP y el VPN que arrojó nuestro trabajo son valores aceptables para considerar al uso del olfato canino como técnica diagnóstica. La variabilidad individual de los caninos entrenados otorga la posibilidad de elección de aquel animal que haya obtenido valores altos de las variables calculadas. Aquellos individuos que su performance no ha sido óptima, pueden continuar con su entrenamiento a fin de conseguir los resultados esperados. Sin perjuicio de ello, el uso del olfato canino ha demostrado ser una técnica precisa y robusta para ser utilizada en lugares estratégicos (aeropuertos, estadios, ingresos a lugares de alta concentración de persona, etc.). Con ella se puede testear en un tiempo extremadamente breve y a un costo insignificante, a un alto número de personas. Otros países del mundo han comenzado con su utilización en lugares públicos (Alemania, Chile, Arabia Saudita, Finlandia).

La obtención de una SE mayor a la publicada pudo deberse a que los canes permanecieron un tiempo más prolongados bajo entrenamiento. Esto significó un aumento de la exactitud en la detección de muestras positivas de pacientes COVID-19. Jendry et al. (2020) (utilizaron un protocolo de trabajo de 2 semanas de adaptación a los positivos de detección, 5 días de entrenamiento previo a cuantificar resultados y 7 días para el ensayo. En el presente trabajo, el tiempo dedicado a la adaptación/nivelación y al ensayo fueron superiores que el empleado en el trabajo alemán. La especificidad cuyo valor promedio fue menor

al publicado podría deberse a que las muestras negativas fueron provistas, mayoritariamente por personas internadas por otras patologías e incluso por individuos que permanecían en la entidad hospitalaria acompañando a sus familiares. Esta circunstancia generaba que el olor ambiental (“olor a hospital”) estuviera presente en ambos tipos de muestras (positivas y negativas).

Las razas, las edades y los antecedentes de trabajo de los canes que participaron en los ensayos en Argentina, Alemania y Francia fueron prácticamente los mismos. Grandjean y colaboradores utilizaron la raza Pastor Belga Mallinois con edades que fluctuaban entre 1 año y 3 meses hasta los 12 años, situándose la mayoría de ellos en algo menos de 5 años de edad. Jendry et al. (2020) utilizaron las razas: Pastor alemán, Mallinois, Labrador y Cocker Spaniel y las edades fueron en promedio de 5 años. Los perros utilizados en los ensayos francés y alemán fueron canes detectores de explosivos y de rescate en su gran mayoría. Estas características en los canes fueron prácticamente idénticas a aquellas en Argentina. Por lo tanto, se puede suponer que la diferencia de resultados con investigadores alemanes pudo deberse al tiempo empleado en la nivelación previa al ensayo, sumado a los días de entrenamiento. La nivelación permitió realizar con mayor eficiencia, más orden y menos frustración por parte de los canes el ensayo a posteriori de dicha etapa. Los días en entrenamiento permitieron que los canes pudieran fijar el olor de COV's provenientes de las muestras de pacientes con SARS-CoV-2, logrando afianzar su memoria olfativa.

Se concluyó que el factor “días en entrenamiento” tuvo un impacto estadísticamente significativo mostrando una tendencia al aumento de los valores de las variables bajo estudio conforme el entrenamiento se prolongaba.

Finalmente, el análisis de los indicadores de bienestar animal permitió concluir que no existió impacto negativo en los perros por las actividades de trabajo que se ejecutaron durante del proyecto.

La detección de pacientes COVID-19 mediante el olfato canino ha demostrado ser una prueba tamiz confiable y prometedora. Su bajo costo y rapidez en determinar un diagnóstico inicial, hace de esta prueba una alternativa efectiva ante enfermedades de alta contagiosidad y su diagnóstico en terreno.

**Agradecimientos:** Al Hospital de Clínicas (UBA) por su aporte de muestras y su compromiso con el proyecto. A la Sección explosivos (subsección canes) de las fuerzas de seguridad de la Nación; Policía de la Provincia de Buenos Aires, Gendarmería Nacional y Prefectura Naval Argentina; y a la Escuela de Adiestramiento canino de la Fac. Cs Veterinarias (UBA); por su trabajo impecable con canes y guías durante la ejecución del proyecto.

## ORCID

Álvarez, G.: [ID https://orcid.org/0009-0007-7998-9163](https://orcid.org/0009-0007-7998-9163).  
Carancci, P.: [ID https://orcid.org/0009-0008-9863-7531](https://orcid.org/0009-0008-9863-7531).  
De los Santos, F.: [ID https://orcid.org/0009-0003-0165-2967](https://orcid.org/0009-0003-0165-2967).  
Zapata, A.: [ID https://orcid.org/0009-0009-3912-6384](https://orcid.org/0009-0009-3912-6384).  
Lorenzo, H.R.: [ID https://orcid.org/0009-0003-8160-0824](https://orcid.org/0009-0003-8160-0824)

## REFERENCIAS

1. Aksenov AA, Sandrock CE, Zhao W, Sankaran S, Schivo M, Harper R, Davis CE. Cellular scent of influenza virus infection. *Chembiochem.* 2014; 15(7): 1040.
2. Angle C, Waggoner LP, Ferrando A, Haney P, Passler T. Canine detection of the volatilome: a review of implications for pathogen and disease detection. *Front. Vet. Sci.* 2016a; 3: 47.
3. Angle TC, Passler T, Waggoner PL, Fischer TD, Rogers B, Galik PK, Maxwell HS. Real-time detection of a virus using detection dogs. *Front. Vet. Sci.* 2016b; 2: 79.
4. Biehl W, Hattesoehl A, Jörres RA, Duell T, Althöhn U, Koczulla AR, Schmetzer H. VOC pattern recognition of lung cancer: a comparative evaluation of different dog-and eNose-based strategies using different sampling materials. *Acta Oncol.* 2019; 58(9): 1216-1224.
5. Bijland LR, Bomers MK, Smulders YM. Smelling the diagnosis, a review on the use of scent in diagnosing. *Neth. J. Med.* 2013; 71: 300-307.
6. Bomers MK, van Agtmael MA, Luik H, Vandembroucke-Grauls CM, Smulders YM. A detection dog to identify patients with *Clostridium difficile* infection during a hospital outbreak. *J. Infect.* 2014; 69(5): 456-461.
7. Course CW, Watkins J, Muller C, Odd D, Kotecha S, Chakraborty M. Volatile organic compounds as disease predictors in newborn infants: a systematic review. *J. Breath. Res.* 2021; 15(2): 024002.
8. Grandjean D, Sarkis R, Lecoq-Julien C, Benard A, Roger V, Levesque E, Desquilbet L. Can the detection dog alert on COVID-19 positive persons by sniffing axillary sweat samples? A proof-of-concept study. *PLoS One.* 2020; 15(12): e0243122.
9. Guest C, Pinder M, Doggett M, Squires C, Affara M, Kandeh B, Lindsay SW. Trained dogs identify people with malaria parasites by their odour. *Lancet Infect. Dis.* 2019; 19(6): 578-580.
10. Heather Junqueira CVT, Quinn TA, Biringer R, Hussein M, Smeriglio C, Barrueto L, Ying X. Accuracy of canine scent detection of non-small cell lung cancer in blood serum. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 2019; 119(7): 413.
11. Helton WS, Feltovich PJ, Velkey AJ. Skill and Expertise in Working Dogs a Cognitive Science Perspective. In: *Canine Ergonomics: The Science of working dogs.* Ed. CRC Press. c2009. 17-36.
12. Horvath G, Andersson H, Nemes S. Cancer odor in the blood of ovarian cancer patients: a retrospective study of detection by dogs during treatment, 3 and 6 months afterward. *BMC Cancer.* 2013; 13(1): 396.
13. Ibrahim W, Carr L, Cordell R, Wilde MJ, Salman D, Monks PS, Greening NJ. Breathomics for the clinician: the use of volatile organic compounds in respiratory diseases. *Thorax.* 2021; 76(5): 514-521.
14. Jendry P, Schulz C, Twele F, Meller S, von Köckritz-Blickwede M, Osterhaus ADME, Volk HA. Scent dog identification of samples from COVID-19 patients—a pilot study. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20(1): 1-7.
15. Kasstan B, Hampshire K, Guest C, Logan JG, Pinder M, Williams K & Lindsay SW. Sniff and tell: the feasibility of using Bio-Detection Dogs as a mobile diagnostic intervention for asymptomatic malaria in sub-Saharan Africa. *J. Biosoc. Sci.* 2019; 51(3): 436-443.
16. Moser E, McCulloch M. Canine scent detection of human cancers: A review of methods and accuracy. *J. Vet. Behav.* 2010; 5(3): 145-152.
17. Ortiz-Prado E, Simbaña-Rivera K, Gómez-Barreno L, Rubio-Neira M, Guaman LP, Kyriakidis NC, López-Cortés A. Clinical, molecular, and epidemiological characterization of the SARS-CoV-2 virus and the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), a comprehensive literature review. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 98(1): 115094.
18. Shirasu M, Touhara K. The scent of disease: volatile organic compounds of the human body related to disease and disorder. *J. Biochem.* 2011; 150(3): 257-266.



## Coproprevalencia de *Cystoisospora* spp. en canes domésticos (*Canis lupus familiaris*) del distrito de Cajamarca, Perú

Bacilio-Gutiérrez, D.<sup>1</sup> ; Torrel-Pajares, T.S.<sup>1</sup> ; Vargas-Rocha L.A.<sup>1,2\*</sup> ; Rojas-Moncada, J.<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Laboratorio de Parasitología Veterinaria y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca, Av. Atahualpa Km. 3, 06003 Cajamarca, Perú. <sup>2</sup>Círculo de Estudios e Investigación en Ciencias Veterinarias - CEICIVET, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca, Av. Atahualpa Km. 3, 06003 Cajamarca, Perú. E-mail: [lvargasr17\\_1@unc.edu.pe](mailto:lvargasr17_1@unc.edu.pe)

### Resumen

La cistoisoporosis es la infección producida por un coccidio que invade el aparato digestivo provocando severos trastornos anatomopatológicos del vertebrado infectado. Esta parasitosis se encuentra desatendida o subestimada en perros de la región Cajamarca, Perú. El objetivo del presente estudio fue determinar la coproprevalencia de *Cystoisospora* spp. y su morfometría de ooquistes en perros de la zona Oeste del distrito de Cajamarca. Mediante el método de Faust se analizaron 246 muestras fecales de perros con dueños de ambos sexos, divididos en tres grupos etarios (n = 87 cachorros: 0 a 6 meses, n=43 juveniles: 6 a 12 meses y n=116 adultos: > 12 meses). A los resultados, se encontró una coproprevalencia general a *Cystoisospora* spp. de 15,04%. En los cachorros muestreados se encontró 24,14% de positividad; 20,93% para juveniles y 6,03% en perros mayores de 12 meses. Los ooquistes observados presentaron color verde amarillento, con ausencia de micropilo y forma ovoide divididos en dos grupos, el primero con  $36,63 \pm 5,05$  por  $35,90 \pm 7,71$   $\mu\text{m}$  y el segundo con  $38,54 \pm 4,38$  por  $33,74 \pm 4,15$   $\mu\text{m}$ . Se concluye que, la prevalencia de *Cystoisospora* spp. es baja, con mayor presencia en los cachorros, el mismo que va disminuyendo conforme avanza la edad. Además, según sus características morfométricas se trataría de *C. canis*, el mismo que requiere de estudios moleculares para su identificación definitiva.

**Palabras clave:** *Cystoisospora*, coproparasitología, morfometría, perros, prevalencia

## Copro-prevalence of *Cystoisospora* spp. in domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) in Cajamarca district, Peru

**Abstract.** Cystoisoporosis is the infection produced by a coccidian that invades the digestive tract causing severe anatomopathological disorders in the infected vertebrate. This parasitosis is neglected or underestimated in dogs in the Cajamarca region, Peru. The objective of the present study was to determine the copro-prevalence of *Cystoisospora* spp. and its oocyst morphometry in dogs from the western zone of the district of Cajamarca. Using the Faust method, 246 fecal samples were analyzed from dogs with owners of both sexes, divided into three age group (n=87 puppies: 0 to 6 months, n=43 juvenile: 6 to 12 months, and n=166 adults: > 12 months). The results showed an overall prevalence of 15.04% for *Cystoisospora* spp. of which 24.14% corresponded to the puppies, 20.93% to juveniles, and 6.03% to dogs older than 12 months. The oocysts observed presented yellowish green color, with the absence of micropyle and ovoid shape divided into two groups, the first with  $36.63 \pm 5.05$  by  $35.90 \pm 7.71$   $\mu\text{m}$  and the second with  $38.54 \pm 4.38$  by  $33.74 \pm 4.15$   $\mu\text{m}$ . It is concluded that the prevalence of *Cystoisospora* spp. is low, with a higher presence in puppies, which decreases with age. In addition, according to its morphometric characteristics, it would be *C. canis*, which requires molecular studies for its definitive identification.

**Key words:** *Cystoisospora*, coproparasitology, morphometry, dogs, prevalence.

## INTRODUCCIÓN

La cistoisoporosis es la infección producida por el parásito protozoario *Cystoisospora*, también denominado *Isospora* (phylum Apicomplexa). Los perros y los gatos son los hospedadores definitivos en todo el mundo (Buehl et al. 2006). El contagio se da mediante la ingestión de ooquistes esporulados junto al alimento en el ambiente o por la ingestión de tejidos de hospedadores intermediarios vertebrados infectados (Mitchell et al. 2007). Incluso se pueden infectar si consumen hospedadores paraténicos como moscas, cucarachas o escarabajos coprófagos que transportan ooquistes esporulados (Saitoh y Itagaki 1990).

La *Cystoisospora* parasita principalmente a animales jóvenes, debilitados e inmunocomprometidos. Causa desórdenes gastrointestinales, además puede generar vómitos, molestias abdominales, inapetencia y diarreas acuosas sanguinolentas que a menudo se confunde con infecciones bacterianas enteropatógenas o infecciones por nematodos u otro tipo de protozoarios (Saari et al. 2019). Dependiendo de la edad del animal y la carga de parásitos, puede ocurrir una deshidratación severa y la muerte por lo que su diagnóstico mediante coprología, el tratamiento farmacológico y prevención son de suma importancia a pesar de no ser zoonótico (Lappin 2013).

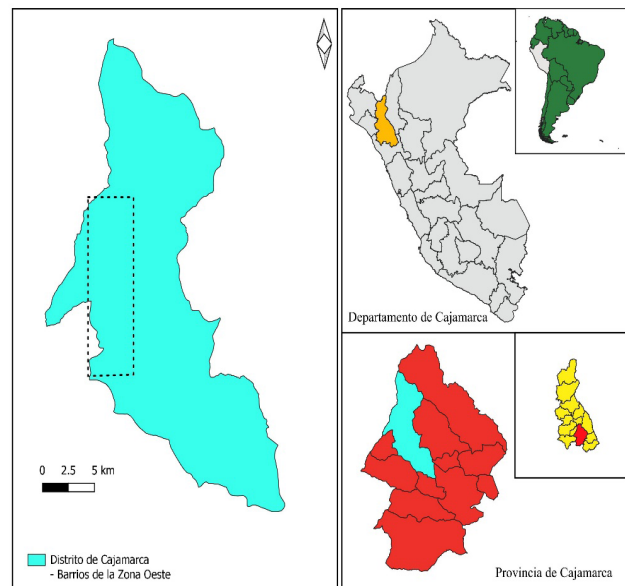
En perros se reportan como parásitos específicos a *Cystoisospora canis*, *C. ohioensis*, *C. neorivolta* y *C. burrowsi* (Dubey et al. 2009). Todas las *Cystoisospora* se replican en el intestino delgado de los animales infectados y culmina el ciclo con el paso de ooquistes no esporulados en las heces. En este transcurso generan atrofia de las vellosidades, dilatación de los conductos e hiperplasia de los ganglios linfáticos en las placas de Peyer. Las regiones con mayor infección varían según la especie al igual que el tiempo de duración de los periodos prepatente y patente (Lappin 2013).

En la ciudad de Cajamarca, Perú, las parasitosis por protozoarios en perros están desatendidas o subestimadas. Las mascotas se desparasitan sin previo análisis parasitológico o antigénico; además, no se realizan estudios dirigidos a la presencia de coccidios, los nematodos y cestodos toman mayor importancia por lo que se desconocen los tipos de protozoarios que infectan a sus mascotas. Por esta razón, el objetivo del presente estudio fue identificar mediante morfología y calcular la prevalencia de *Cystoisospora* spp. en heces de perros domésticos, ubicados en la zona Oeste del distrito de Cajamarca.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en un sector (Oeste) de la ciudad de Cajamarca, comprendido por seis barrios (San Pedro, Cumbemayo, Santa Apolonia, Urubamba, Dos de Mayo y La Merced) (Figura 1). Se estimó un tamaño muestral de 246 muestras fecales de perros de ambos sexos y diferentes edades, en función de una población no conocida; fijando un  $p$  valor de 0,20, nivel de confianza del 95% y error de 5% (Martínez y Valdivia 2022). La edad se determinó mediante observación de la arcada dentaria

(Huidekoper 1981) y, se clasificó a los animales en tres categorías: cachorros (0 a 6 meses), juveniles (6 a 12 meses) y adultos (> 12 meses).



**Figura 1.** Ubicación del lugar de estudio

Las muestras se extrajeron directamente del recto con estimulación del esfínter anal utilizando el dedo índice de la mano cubierta con guante quirúrgico lubricado con glicerina. Las heces se depositaron en bolsas rotuladas de polietileno de 18 x 25 cm y estas en una caja de poliestireno expandido con geles refrigerantes. Finalizado el muestreo por día se transportaron al Laboratorio de Parasitología Veterinaria y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca, para su procesamiento respectivo.

El análisis coproparasitológico se realizó mediante el método de Faust (Girard de Kaminsky 2014). La observación de los ooquistes fue en microscopio óptico a 40X. La identificación morfológica se realizó mediante contrastación de las características de *Cystoisospora* spp. de otros estudios publicados (Rocha y Lopes 1971, Miró 1999). Utilizando un ocular micrométrico a 40X y multiplicado por el factor de corrección 1,64 se obtuvieron las dimensiones de largo y ancho.

Finalmente, los datos obtenidos se registraron y ordenaron en hojas de cálculo para determinar la prevalencia. Se aplicó el estadístico Ji Cuadrado ( $\chi^2$ ) para la heterogeneidad e independencia de la prevalencia por edades de los canes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 246 muestras fecales colectadas (41 muestras por barrio), 87 fueron de cachorros, 43 de juveniles y 116 de adultos. Los resultados indican que la prevalencia de *Cystoisospora* spp. en perros fue 15,04%, con mayor presencia en cachorros, seguido de los juveniles y adultos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Coproprevalencia de *Cystoisospora* spp. en los perros.

Canes: edad (meses)	n mues-tral	Positivos	
		n	% ± IC95%
0 a 6	87	21	24,14 ± 8,99
6 a 12	43	9	20,93 ± 12,16
> 12	116	7	6,03 ± 4,33
<b>Total</b>	<b>246</b>	<b>37</b>	<b>15,04 ± 4,47</b>

Proporciones desiguales entre las edades ( $\chi^2$ : <0,05)

Los animales más jóvenes de la ciudad de Cajamarca, Perú, presentaron mayor prevalencia de *Cystoisospora* spp. Hallazgo parecido se reportó en muestras fecales de perros enviados al Instituto de Parasitología y Zoología - Universidad de Medicina Veterinaria de Viena (8,7%; 312/3590), de los cuales el 78% (244) correspondió a cachorros de hasta 4 meses de edad, los mismos que presentaron diarrea hemorrágica (Buehl et al. 2006). También se ha demostrado la presencia de *Isoospora* sp. en perros adultos. En seis distritos de Puno (ubicado en la serranía peruana) se halló una frecuencia de  $11,9 \pm 3,4\%$  de un total de 352 perros pastores cruzados y la edad no fue un factor de riesgo (Cruz et al. 2012).

Según algunos estudios hechos en Perú, tanto en la Sierra como en la Costa se puede encontrar cistisporosis en canes y la edad no es un factor determinante. En el Centro Poblado "Supte San Jorge" (Huánuco), se determinó una prevalencia de  $6,70 \pm 4,62\%$  a *Isoospora* sp. en 194 perros criollos analizados. No se encontró relación estadística entre la edad de los perros y los parásitos ( $p > 0,01$ ) (Orbezo-Campos et al. 2016). En otra región de la serranía peruana (Junín), la presentación de *Isoospora* (2,8%; 2/71) junto a otros parásitos estuvo relacionado a la falta de costumbre y desconocimiento de las desparasitaciones de las mascotas y la crianza fuera de casa (Minaya y Serrano 2016).

En la Costa peruana también la presencia del protozoario puede ser variado. De un análisis retrospectivo de pruebas parasitológicas en el Laboratorio de Parasitología de la FAVEZ-UPCH (Lima), *Isoospora* spp. fue el segundo protozoario con mayor frecuencia, con 37 positivos de un total de 476 muestras (Serrano-Martínez et al. 2014). En la misma región Lima se evaluaron caninos comercializados menores de seis meses y, de 97 muestras de heces, *Isoospora canis* se presentó en el 98,78%, sin demostrar asociación con la edad (Vega et al. 2014). En una comunidad de un distrito limeño (Huaral) como único factor de riesgo de parasitismo fue el lugar de alimentación, la calle

(OR=7,11; X<sup>2</sup>=5,23;  $p = 0,03$ ), a pesar que la prevalencia de *Cystoisospora canis* fue baja, con apenas dos casos (4,3%) (Naupay et al. 2019).

De manera similar, en perros pastores y de caza en la prefectura de Serres (Norte de Grecia), la presencia de *Cystoisospora* spp. alcanzó un porcentaje de 3,9% (11/281), siendo mayor en perros juveniles (hasta 6 meses de edad) que en perros adultos de 6 meses a 10 años ( $p < 0,05$ ) (Papazahariadou et al. 2007). En el mismo país heleno, en la ciudad de Tesalónica, otro estudio reportó que los perros jóvenes tenían 5,15 veces más probabilidades de estar infectados por *Cystoisospora* spp. en comparación con los perros adultos ( $p < 0,001$ , IC 95%, 3,01-8,85); además, los perros vagabundos tendían a ser menos parasitados por *Cystoisospora* spp. que los perros con dueño (Symeonidou et al. 2017). La susceptibilidad a las parasitosis de los animales más jóvenes estaría determinada por la insuficiente exposición y sensibilización del sistema inmune (Hart 1990). Por otro lado, la pobre limpieza de las camas de los perros en casa podría permitir que el ciclo biológico de la *Cystoisospora* se perpetúe sin complicaciones, a diferencia de los perros vagabundos que defecan en diferentes lugares y las madres que viven en estas condiciones tienen mejor desarrolladas sus habilidades maternas, acuden a la coprofagia con el fin de no exponerse a sí mismas y a sus crías a la infección por parásitos (Hart y Hart 2018)

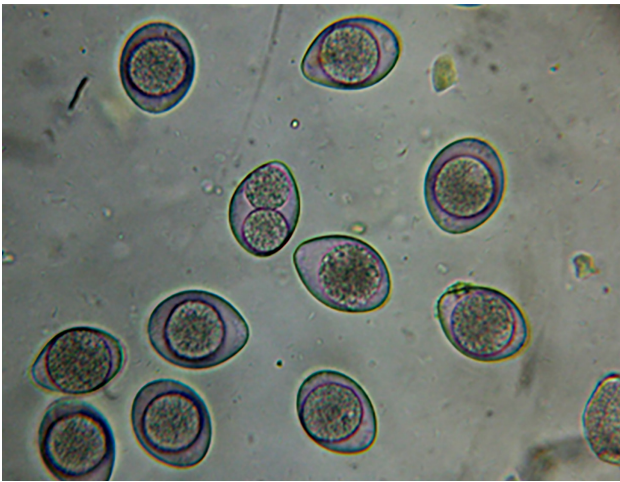
En otros países sudamericanos también se ha demostrado la presencia de *Cystoisospora* spp. en perros, mayormente en cachorros. Se ha encontrado en Brasil, con mayor presencia en perros mestizos callejeros ( $p < 0,05$ ) (Oliveira-Sequeira et al. 2002); en Argentina (Nemeséri 1960), Venezuela (Ramírez-Barrios et al. 2004), Colombia (Sarmiento-Rubiano et al. 2018). A su vez, en diferentes países alrededor del mundo igualmente se han reportado presencia de *Cystoisospora* spp. en perros callejeros y domésticos, de raza y mestizos, con mayor presencia en perros jóvenes (Barutzki y Schaper 2013, Johnson et al. 2015, Sommer et al. 2017).

A nivel morfológico se pudo observar que los ooquistes hallados presentaron forma ovoide (Tabla 2 y Figura 2). Las medidas de los ooquistes se ubican dentro de los valores reportados para *Cystoisospora canis* (34 - 40 × 28 - 32  $\mu$ m) (Miró 1999). También en otros países *C. canis* dio valores cercanos; en Hungría 36 - 44 × 29 - 36  $\mu$ m (Nemeséri 1960), Brasil 32 - 40 × 23-35  $\mu$ m (Rocha y Lopes 1971), Egipto 40 - 50 × 25 - 40  $\mu$ m (Abdel-Magied et al. 1982), Estados Unidos 35 - 39 × 27 - 32  $\mu$ m (Mitchell et al. 2007).

**Tabla 2.** Características morfológicas de las *Cystoisosporas* spp. observadas.

Estructura	n	Forma	Color	Dimensiones: $\mu$ m ( $\bar{x}$ )		Micropilo
				Largo	Ancho	
Ooquiste	28	Ovoide	Verde amarillento	38,54±4,38 <sup>a</sup>	33,75±4,15 <sup>b</sup>	Ausente
	9			36,63±5,05 <sup>a</sup>	35,90±7,71 <sup>b</sup>	

<sup>a,b</sup>Letras similares en una misma columna indican similitud ( $F > 0,05$ ).



**Figura 2.** Ooquistes ovoides de *Cystoisospora* spp. 40X

A pesar que las claves taxonómicas brindan gran acercamiento en la identificación de parásitos, para un diagnóstico definitivo se requieren de estudios moleculares que permitan establecer el género y especie del agente involucrado. Por lo tanto, los resultados del presente estudio podrían considerarse como preliminares si se busca determinar la especie del protozooario observado, aunque esto no resta importancia a la presencia de coccidios desatendidos en perros del distrito de Cajamarca (Perú), el cual podría deberse al desconocimiento del parásito por la falta de estudios, tal como sucedió en Jauja (Minaya y Serrano 2016).

## ORCID

Bacilio-Gutiérrez, D.  <https://orcid.org/0009-0007-8326-1247>

Torrel-Pajares, T.S.  <https://orcid.org/0000-0002-2720-1959>

Vargas-Rocha, L.A.  <https://orcid.org/0000-0002-8571-6416>

Rojas-Moncada, J.  <https://orcid.org/0000-0001-6943-4112>

## REFERENCIAS

1. Abdel-Magied S, Ali M, Abo-Shady A, El-Kholy S. Canine coccidiosis in Dakahlia Governorate, Egypt. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 1982; 12(2): 409-11.
2. Añamuro CE, Watanabe R, Vilca de Diaz F, Suárez F. 2019. Prevalencia de enteroparásitos en cachorros comercializados en Puno, Perú. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 2019; 30(1): 309-19.
3. Barutzki D, Schaper R. Age-dependant prevalence of endoparasites in young dogs and cats up to one year of age. *Parasitol. Res.* 2013; 112(1): 119-31.
4. Buehl I, Prosl H, Mundt HC, Joachim A. Canine isosporosis-epidemiology of field and experimental infections. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 2006; 53(10): 482-87.
5. Cruz L, Chávez A, Falcón N, Fernández V, Huamán H, Li O, Huanca W. Helminthiasis gastrointestinal en perros pastores de comunidades ganaderas de Puno, Perú. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 2012; 23(1): 72-9.
6. Dubey J, Lindsay D, Lappin, M. Toxoplasmosis and Other Intestinal Coccidial Infections in Cats and Dogs. *Vet. Clin. of North. Am. Small. Anim. Prac.* 2009; 39(6): 1009-34.
7. Girard de Kaminsky R. Flotación por sulfato de zinc (SO<sub>4</sub>Zn). En: Girard de Kaminsky R, editor. Manual de Parasitología. Técnicas para Laboratorios de Atención Primaria de Salud y para el Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas, 3ª ed. Honduras: Papelería e Imprenta Honduras, c2014. p. 61-3.
8. Hart BL, Hart LA. How mammals stay healthy in nature: the evolution of behaviours to avoid parasites and pathogens. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2018; 373(1751): 20170205.
9. Hart BL. Behavioral adaptations to pathogens and parasites: five strategies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1990; 14(3): 273-94.
10. Huidekoper R. Age of the dog. In: Huidekoper R, editor. Age of the domestic animals, 1<sup>st</sup> ed., Philadelphia: F.A. Davis. c1981. p. 194-202.
11. Johnson S, Gakuya D, Mbuthia P, Mande J, Maingi N. Prevalence of gastrointestinal helminths and management practices for dogs in the Greater Accra region of Ghana. *Heliyon.* 2015; 1(1): e00023.
12. Lappin M. Infection in Small Intestine. In: Lappin M, editor. Canine and Feline Gastroenterology, 1<sup>st</sup> editor. Elsevier: Saunders; c2013. p. 651-728.
13. Martínez AJ, Valdivia FJ. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en caninos (*Canis lupus familiaris*) menores de 12 meses, atendidos en el Laboratorio Clínico Nucleovet, septiembre 2019 a marzo 2020. Tesis de Grado, Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. 2022. p. 32.
14. Minaya A, Serrano M. Identificación y frecuencia de parásitos gastrointestinales en canes de la SAIS Túpac Amaru en el distrito de Canchayllo, Jauja, Perú. *Salud tecnol. Vet.* 2016; 4(1): 15-9.
15. Miró G. Parasitosis del perro y del gato. En: Cordeiro del Campillo M, Rojo F, Sánchez C, Hernández S, Navarrete I, Díez P, Quiroz H, Carvalho M, editores. Parasitología veterinaria, 1ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; c1999. p. 615-20.
16. Mitchell S, Zajac A, Charles S, Duncan R, Lindsay D. 2007. *Cystoisospora canis* Nemeséri, 1959 (syn. *Isoospora canis*), infections in dogs: clinical signs, pathogenesis, and reproducible clinical disease in beagle dogs fed oocysts. *J. Parasitol.* 2007; 93(2): 345-52.
17. Naupay A, Castro J, Tello M. Prevalencia de parásitos intestinales con riesgo zoonótico en *Canis lupus familiaris* de la localidad de Retes, Lima, Perú. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 2019; 30(1): 320-29.
18. Nemeséri L. Beiträge zur Ätiologie der Coccidiose der Hunde. I. *Isoospora canis* sp. n. *Acta. Vet.* 1960; 10: 95-9.
19. Oliveira-Sequeira T, Amarante A, Ferrari T, Nunes L. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2002; 103(1-2): 19-27.
20. Orbezo-Campos SC, Tafuer-Zevallos LR, Hernández-Russo MH, Iannacone J, del Águila-Pérez CA,

- Wetzel E, Cárdenas-Callirgos JM. Prevalencia de geohelmintiasis zoonótica canina y su importancia en probable impacto zoonótico en el centro poblado "Supte San Jorge" (Tingo Maria, Huanuco). V Congreso Internacional de Parasitología Neotropical (V COPANEO), Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú. 2016. p. 56.
12. Papazahariadou M, Founta A, Papadopoulos E, Chliounakis S, Antoniadou-Sotiriadou K, Theodorides Y. Gastrointestinal parasites of shepherd and hunting dogs in the Serres Prefecture, Northern Greece. *Vet. Parasitol.* 2007; 148(2): 170-173.
  13. Ramírez-Barríos R, Barboza-Mena G, Muñoz J, Angulo-Cubillán F, Hernández E, González F, Escalona F. Prevalence of intestinal parasites in dogs under veterinary care in Maracaibo, Venezuela. *Vet. Parasitol.* 2004; 121(1-2): 11-20.
  14. Rocha E, Lopes C. 1971. Comportamento da *Isoospora canis*, *Isoospora felis* e *Isoospora rivolta* em infecções experimentais em cães e gatos. *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro.* 1971; 1: 65-70.
  15. Saari S, Näreaho A, Nikander S. 2019. Protozoa. In: Saari S, Näreaho A, Nikander S, editors. *Canine Parasites and Parasitic Diseases*, 1<sup>st</sup> editors. Elsevier: Academic Press; c2019. p. 5-34.
  16. Saitoh Y, Itagaki H. Dung beetles, *Onthophagus* spp., as potential transport hosts of feline coccidia. *Nihon Juigaku Zasshi.* 1990; 52(2): 293-7.
  17. Sarmiento-Rubiano L, Delgado L, Ruiz J, Sarmiento M, Becerra J. Parásitos intestinales en perros y gatos con dueño de la ciudad de Barranquilla, Colombia. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 2018; 29(4): 1403-10.
  18. Serrano-Martínez E, Tantaleán M, Castro V, Quispe M, Casas G. Estudio retrospectivo de frecuencia de parásitos en muestras fecales en análisis rutinarios de laboratorio. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 2014; 25(1): 113-16.
  19. Sommer M, Zdravković N, Vasić A, Grimm F, Silaghi C. Gastrointestinal parasites in shelter dogs from Belgrade, Serbia. *Vet. Parasitol. Reg. Stud.* 2017; 7: 54-57.
  20. Symeonidou I, Gelasakis A, Arsenopoulos K, Schaper R, Papadopoulos E. Regression models to assess the risk factors of canine gastrointestinal parasitism. *Vet. Parasitol.* 2017; 248: 54-61.
  21. Vega S, Serrano-Martínez E, Grandez R, Marco MP. Parásitos gastrointestinales en cachorros caninos provenientes de la venta comercial en el Cercado de Lima. *Salud tecnol. Vet.* 2014; 2(2): 71-7.



## Revista Veterinaria ingresa a SciELO Scientific Electronic Library Online

Revista Veterinaria, publicación oficial de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste (Corrientes, Argentina), ha logrado acceder al Núcleo Básico de Revistas Científicas Argentinas (Nivel 1), luego de calificar adecuadamente en el Centro Argentino de Información Científica y Tecnológica (CAICYT), según Resolución 2485/14 del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Sobre un puntaje máximo de 33 se obtuvieron 32 puntos. Tal calificación constituye "una garantía de la excelencia de la publicación" (sic) y queda expedita la vía del Portal SciELO (Scientific Electronic Library Online) para los artículos publicados.

En tal calificación gravitó positivamente la circunstancia de haber aumentado el índice de impacto (Scimago-Elsevier) y haber disminuido las autocitaciones. También se tuvieron en cuenta aspectos como la amplia cobertura de la revista, la calidad científica del Comité Editorial, los criterios de evaluación de los artículos, el origen de los autores (locales 60%, nacionales 13%, extranjeros 24%, en idioma inglés), el adecuado balance entre trabajos científicos originales y reseñas bibliográficas (ambos con alta calidad), así como el estricto cumplimiento de la periodicidad semestral y la favorable acogida por indizadores como Cab, J-Gate, Doaj, Ebsco, Gale Cengage, Infocyt, Latindex y Scopus.

Se consolida de esta manera la continuidad de "Revista Veterinaria", que en su acontecer registra más de 50 años de existencia en nuestra Facultad de Ciencias Veterinarias, entidad que en 2019 cumplió el 99° aniversario de su fundación.



## Hematological, biochemical, and growth parameters of Sprague Dawley rat of the Scientific Research and High Technology Services Institute of Panama

Quintero, A. Del C.<sup>1</sup> ; De Jesús, R.<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Department of Animal Production and Welfare, Faculty of Veterinary Medicine, University of Panama, 3366/4 Panama City. <sup>2</sup>Scientific Research and High Technology Services Institute of Panama, City of Knowledge, PO Box 0843-01103 Panama City. E-mail: [angelina.quintero@up.ac.pa](mailto:angelina.quintero@up.ac.pa)

### Abstract

The Sprague-Dawley rat is used as an experimental model in neuroscience research, among others, developed at the Scientific Research and High Technology Services Institute of Panama; being important to have reference values of some parameters such as: growth (weight-length), hematological and blood biochemical parameters. In this trial, from weaning to 8 weeks, the weight gains and growth in length of 10 females and 10 males were measured. At 8 weeks, some hematological parameters were measured, such as hemoglobin, hematocrit, white blood cells, and their differential cell count. Some biochemical blood parameters were also measured, such as glucose, cholesterol, GOT, and GPT. The sample size used was calculated considering the total population of the colony. The parameters measured were compared between sexes, finding significant differences in weight gain ( $p=0.01$ ), height ( $p=0.02$ ), hemoglobin ( $p=0.03$ ), total leukocytes ( $p=0.05$ ), monocytes ( $p<0.001$ ), neutrophils ( $p=0.02$ ), GPT ( $p=0.02$ ) and GOT ( $p=0.01$ ), where males presented higher values in weight, height, total leukocytes, monocyte, neutrophils, GPT and GOT, while females presented higher values in hemoglobin. The values found in this trial can be used as data bases for different studies allowing the reproducibility of the experimental results at regional and global scope. In addition to applying the R's of Reduction and Refinement of ethics in the use of laboratory animals.

**Key words:** Rats, growth, hematology, biochemistry, ethics, welfare.

## Parámetros hematológicos, bioquímicos y de crecimiento en ratas del Bioterio del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá

**Resumen.** La rata Sprague-Dawley es usada como modelo experimental en investigaciones de neurociencia, entre otras, desarrolladas en el Instituto de Investigaciones Científica y Servicios de Alta Tecnología de Panamá; siendo importante contar con valores de referencia de algunos parámetros tales como: crecimiento (peso-talla), hematológicos y bioquímicos sanguíneos. Se midieron, en este ensayo, desde el destete hasta las 8 semanas, la ganancia de peso y el crecimiento en talla de 10 hembras y 10 machos. A las 8 semanas se midieron algunos parámetros hematológicos, como la hemoglobina, el hematocrito, los glóbulos blancos, y su recuento celular diferencial. Igualmente se midieron algunos parámetros bioquímicos sanguíneos como: la glucosa, el colesterol, la GOT y la GPT. El tamaño de muestra usado fue calculado considerando la población total de la colonia. Los parámetros medidos se compararon entre sexos, encontrándose diferencias significativas en el aumento de peso ( $p=0,01$ ), talla ( $p=0,02$ ), hemoglobina ( $p=0,03$ ), leucocitos totales ( $p=0,05$ ), monocitos ( $p<0,001$ ), neutrófilos ( $p=0,02$ ), GPT ( $p=0,02$ ) y GOT ( $p=0,01$ ), donde los machos presentaron valores más altos en peso, talla, leucocitos totales, monocitos, neutrófilos, GPT y GOT, mientras que las hembras presentaron valores más altos en hemoglobina. Los valores encontrados en el ensayo



pueden ser utilizados como datos bases para diferentes estudios permitiendo la reproducibilidad de los resultados experimentales a nivel regional y mundial. Además de aplicar las erres de Reducción y Refinamiento de la ética en el uso de los animales de laboratorio.

**Palabras clave:** ratas, crecimiento, hematología, bioquímica, ética, bienestar.

## INTRODUCTION

The use of rodents in the development of different models for biomedical research is due to the similarity that their DNA has with human DNA among other important characteristic (Zhao et al. 2004). Of the numerous rodent models developed, those using the Sprague Dawley (SD) rat are preferred for studies in neuroscience, nutrition, oncology, pharmacology, and others, due to the behavioral characteristics of this outbred line (Ku et al. 2016, Rybnikova et al. 2018, Gileta et al. 2022). In Panama, this animal model is widely used by different institutions. Among them is the Scientific Research and High Technology Services Institute of Panama (INDICASAT AIP), which supplies SD rats to different projects throughout the country.

The progenitors of the SD rats of the INDICASAT AIP animal facility were obtained in 2018 from an international supplier. Since 2018, this colony has remained a close colony, currently breeding the 8th generation in non-inbred conditions, which can compromise the genetic variability expected in non-inbred lines (Benavides and Guénet 2003). Furthermore, using reference values reported by international studies or comparing with the ones reported by the supplier could lead to inaccurate conclusions, because of the differences in housing and handling conditions that can cause phenotypic changes in the colony, including variations in the values of physiological, hematological, and biochemical parameters (Kelada et al. 2012). Studying physiological parameters such as weight (g) and length (cm) can evaluate these animal's development; hematological parameters such as hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), total white blood cell (WBC), and differential white blood cell count: neutrophils (Neut), basophils (Baso); lymphocytes (Lym); monocytes (Mono) and eosinophils (Eos); and biochemical parameters, such as glucose (Glu), cholesterol (CL) and transaminases: glutamic pyruvic aminotransferase (GPT) and glutamic oxaloacetic aminotransferase (GOT) belong to the group of basic parameters used as reference values in the animals colonies (Enesco and Leblond 1962, Harris et al. 1998, Gross 2009, Delwatta et al. 2018).

The objective of this study was to establish values for selected hematological, biochemical, and physiological parameters for the colony of Sprague Dawley rats produced in the INDICASAT AIP, in order to be used as reference for the different studies carried out in the institution.

## MATERIALS AND METHODS

This research was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) INDICASAT AIP, code CICUA-19-011.

**Animals and housing.** Ten female and ten male Sprague Dawley (SD) rats were randomly selected from all

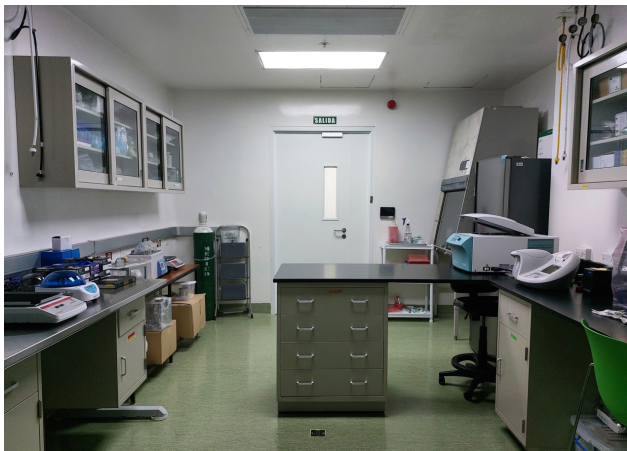
offspring born of the different couples in the foundation nucleus during the ongoing eighth generation acquired from the supplier. The sample was calculated considering what was reported in a similar study (Delwatta et al. 2018), due to the size of the colony at the INDICASAT AIP animal facility. Each of the 20 rats was considered an experimental unit. After weaning, the animals were housed in 3 groups: 2 groups of 4 animals per cage and 1 group of 2 animals, which were identified by cards and kept in the same rack during the study. None of them were mated during the study. The animals were temporarily identified by marking their tails. These animals were kept in "Specific Pathogen Free" (SPF) conditions, inside ventilated racks (Tecniplast, Blue Line, 129H (Figure 1), in standardized conditions. The cages were prepared with bedding (Bed-o'Cobs 1/4") and different types of enrichment, such as PVC or cardboard tubes, as well as paper towels. The microbiological status of the colony is verified every six months. The room was maintained at a temperature of 68.4°F (20.2°C) and a relative humidity of 56.7%. The photoperiod was 12 hours of light and 12 hours of darkness; noise did not exceed 85 dB. Food (DietLab 5001) and filtered water were sterilized by autoclaving and offered *ad libitum*.



**Figure 1.** Ventilated racks where animals were housed during the research at INDICASAT AIP.

**Experimental design.** Completely random design (CRD).

**Procedures.** At PD8, physical assessment of growth, weight (g), with an OHAUS Model VIIP6 scale, precision: 0.001 kg/0.002 lb; and length (cm), using a conventional ruler, with a maximum length of 30 cm, was started until the eighth week. These measurements were taken at 7:00 a.m. once a week. In the eighth week, intracardiac blood extraction was performed with the thorax cavity close and under anesthesia with Isoflurane, USP (TERRELL®) (Weiss et al. 2000, Kumar et al. 2017), in an anesthetic chamber, to collect an adequate volume of blood. The hemoglobin (Hb), glutamic oxaloacetic aminotransferase (GOT), and cholesterol (CL) were analyzed using the Semi-automatic analyzer BTS-350 Biosystems; the hematocrit was analyzed using the LW Scientific Zip-IQ PCV Digital 24 Place Hematocrit Centrifuge. The total white blood cell (WBC) count was analyzed using a Motic BA310E Microscope and a Neubauer Chamber (Hausser 1492 Bright-line, 0.1mm deep), and a Turk solution was used to prepare the sample. The differential WBC count was assessed using a blood smear and Giemsa stain at 10%. The Abaxis VetScan VS2 was used to measure glucose (Glu) and glutamic pyruvic aminotransferase (GPT) (Figure 2). The equipment used to process each parameter was calibrated by the providers to process rat and mouse blood samples, using the reference values reported by the supplier. Euthanasia was performed after blood extraction by anesthetic overdose (the animals did not wake up from it) (Leary et al. 2013).



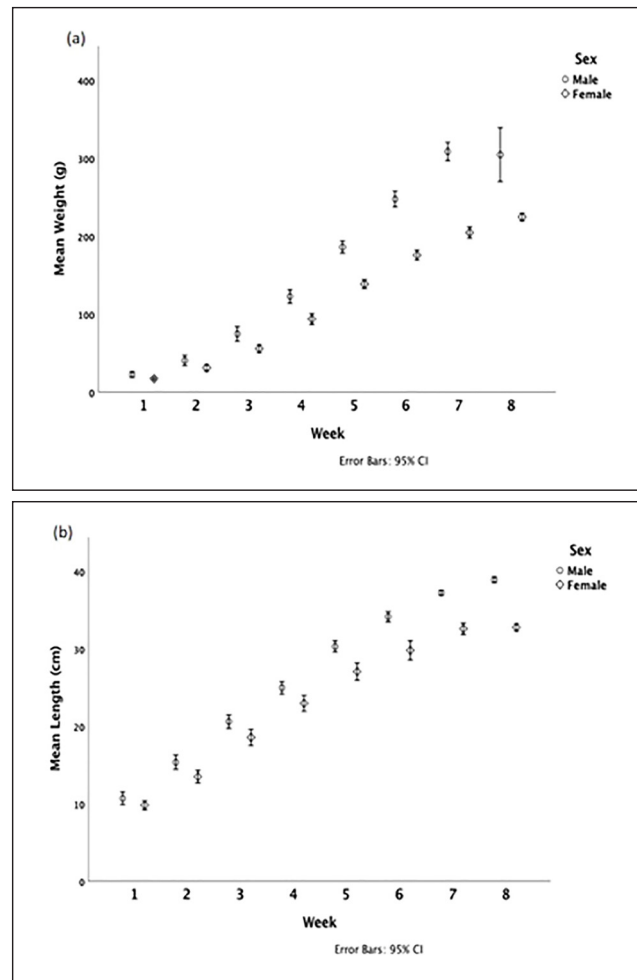
**Figure 2.** Experimental Laboratory where samples were processed at INDICASAT AIP.

**Statistics.** Statistics were analyzed using IBM SPSS V.24 and a statistically significant difference was considered for all analyses using a significance level of  $p < 0.05$ . The Kolmogorov-Smirnov test was used to determine the normality of the data. The test indicated that the distribution of length and weight of males and females was not normal; therefore, the non-parametric analysis used was the Kruskal-Wallis test. For the analysis of differences in the measurements of hematological and biochemical parameters, the Mann-Whitney U test was used. In this study, all selected animals were included in the analysis.

**RESULTS AND DISCUSSION**

The continuous growth tendency in weight and length of the study animals during the 8 weeks of measurements

are presented growth in Figures 1a and 1b. Both showed significant differences with  $p=0.01$  and  $p=0.02$ , respectively. A decrease in weight was observed between weeks 7 and 8 in males; this was not observed in females (Figure 1a).



**Figure 3.** (a)Weight and (b) length of female and male SD rats of the INDICASAT AIP.

The reference values for weight and length of the INDICASAT-AIP Sprague Dawley rats from weeks 1 to 8 are presented in Table 1 and 2 with their respective Standard deviation per week.

**Table 1.** Reference values for the weight of the SD rats of the INDICASAT AIP animal facility.

Age (weeks)	Body Weight (g)			
	Male		Female	
	Mean	SD	Mean	SD
1	22.6	±5.19	17.4	±2.22
2	40.6	±9.35	31.2	±5.75
3	74.8	±13.16	55.9	±7.03
4	122.9	±11.98	93.9	±9.68
5	186.3	±10.95	138.8	±7.94
6	247.9	±14.07	175.9	±8.90
7	309.0*	±16.43	204.9	±10.13
8	304.9	±48.36	224.9	±6.8

\*Weighing performed at a different time of the day

**Table 2.** Reference values for the length of the SD rats of the INDICASAT AIP animal facility.

Age (weeks)	Body length (cm)			
	Male		Female	
	Mean	SD	Mean	SD
1	10.71	± 1.12	9.83	± 0.79
2	15.38	± 1.30	13.51	± 1.13
3	20.64	± 1.21	18.59	± 1.47
4	25.00	± 1.11	23.00	± 1.43
5	30.34	± 1.01	27.09	± 1.54
6	34.19	± 0.92	29.84	± 1.71
7	37.27	± 0.46	32.62	± 1.04
8	38.96	± 0.56	32.81	± 0.66

These results evaluated during the first 56 days of growth of male and female SD rats, collect the data of the first, second and part of the third phase of growth which has been described previously (Enesco and Leblond 1962); during the first (0-17 days) and second phase (17-48 days) there is a cell proliferation and growth in most of the organs in the young rats which is reflected in the weight of the an-

imal (Enesco and Leblond 1962). This coincides with the results of this study, since in both females and males, the greatest weight gain occurred between the third and fourth week (21-28 days).

Figures 1a and 1b clearly show the trend of the males gaining more weight and length than females. Figure 1a presents a decrease in weight gain of the males between week 7 and week 8, this may be due to the difference in the weighting schedule since the weight can be different throughout the day (Kawamura et al. 2020).

The growth observed had the same tendency as that reported by the commercial company that supplies these animals (Charles River Laboratories 2011) and the difference between sexes that has been reported by other studies (Pahl 1969, Slob and Bosch 1975).

When comparing the values obtained in the hematological parameters between sexes, significant differences was observed in the values of hemoglobin ( $p=0.03$ ), total white blood cells ( $p=0.05$ ), monocytes ( $p<0.001$ ), and neutrophils ( $p=0.02$ ). Concerning biochemical parameters, significant differences were observed in the values of GOT ( $p=0.01$ ) and GPT ( $p=0.02$ ) (Table 3).

**Table 3.** Hematological and biochemical reference values for the SD rats of the INDICASAT AIP animal facility.

Hematological and Biochemical selected parameters	Age: 8 Weeks			
	Male		Female	
	Mean	SD	Mean	SD
*Hemoglobin (g dL <sup>-1</sup> )	17.07	± 2.12	19.49	± 2.19
Hematocrit (%)	47.20	± 3.40	45.15	± 1.16
Total White Blood Cell (Cell / mm <sup>3</sup> )	4961.25	± 1221.19	3925.00	± 974.43
*Monocytes (Cell / mm <sup>3</sup> )	189.31	± 95.26	37.39	± 38.70
Lymphocytes (Cell / mm <sup>3</sup> )	4418.66	± 1163.72	3684.24	± 935.66
*Neutrophils (Cell / mm <sup>3</sup> )	304.12	± 188.48	136.25	± 82.57
Eosinophils (Cell / mm <sup>3</sup> )	24.04	± 33.94	60.63	± 96.85
Basophils (Cell / mm <sup>3</sup> )	20.00	± 37.50	6.49	± 13.75
Cholesterol (mg dL <sup>-1</sup> )	395.45	± 191.71	328.30	± 47.53
Glucose (mg dL <sup>-1</sup> )	136.80	± 21.79	148.80	± 17.80
*Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) (U/I)	48.90	± 12.34	33.30	± 9.91
*Glutamic pyruvic transaminase (GPT) (U/I)	71.10	± 37.82	47.50	± 6.59

\* $p \leq 0.05$

There are some causes during the procedures such as hemolysis and the used of isoflurane that can alter hemoglobin values (Kato et al. 1992, Campbell 2012). However, these findings were in agreement with those reported between sexes by other authors (Bush 1992, Lillie et al. 1996, Maeda et al. 2000, Kohn and Clifford 2002, León Goñi et al. 2011, He et al. 2017). The mean difference between females and males in relation to white blood cell count has been reported in other studies (Kohn and Clifford 2002, Schnell et al. 2002, Delwatta et al. 2018), which may be a result of the different ages and different routes used for sampling, as it had been reported before to affect blood parameters (Schnell et al. 2002).

The values of neutrophils and monocytes were higher in males than in females, presenting significant differenc-

es. Higher neutrophil values have been reported previously (Charles River Laboratories 2011, Stöppeler et al. 2013). However, higher neutrophil values have been reported in females (Delwatta et al. 2018), which do not match our results. In addition, higher monocyte values in males have been reported before (Kohn and Clifford 2002, Schnell et al. 2002, Delwatta et al. 2018).

Regarding the values of biochemical parameters, significant differences were found in GOT and GPT, with the mean being higher in males than in females. Higher values in GOT and GPT were in agreement with higher values reported in males by other studies and vendors (Han et al. 2010, Charles River Laboratories 2011, He et al. 2017). It is considered that GOT and GPT values may be altered by the type of anesthetic used (Soubhia et al. 2011, Campbell 2012).

## CONCLUSIONS

The characterization carried out in this essay serves as a database not only for the institute's researchers who use this animal model, but also for all those who, through this publication, can use them as a basis for their studies, not only to verify but also to improve research analysis which consequently will lead to better science. But we agreed that further research with a higher sample must be needed.

**Acknowledgement.** The authors would like to thank Professor Emilio Romero from the Physiology and Animal Behaviour Department of the Faculty of Exact Natural Sciences and Technology of the University of Panama for his collaboration in the statistical analysis. Additional thanks to all administrative personnel, researchers, and technicians of the Scientific Research and High Technology Services Institute of Panama for their collaboration.

## ORCID

Quintero, A. Del C.  <https://orcid.org/0000-0001-8692-6004>

De Jesús, R.  <https://orcid.org/0000-0001-9670-291X>

## REFERENCE

- Benavides FJ, Guénet JL. 2003. Manual de genética de roedores de laboratorio: principios y aplicaciones. Madrid: Universidad de Alcalá de Henares; 2003. p. 310.
- Bush BM. Interpretation of Laboratory Results for Small Animal Clinicians. 1st ed. Oxford (UK): Blackwell Scientific Publications Ltd; 1992. p. 528.
- Campbell T. Mammalian Hematology: Laboratory Animals and Miscellaneous Species. In: Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW, editors. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. 2nd ed. USA: John Wiley & Sons; c2012. p. 225-237.
- Charles River Laboratories. CD ® IGS Rats CD ® IGS Rats [Internet]. [Place unknown]. 2011 - [cited 2022 June 15]. Available from: <https://www.criver.com/sites/default/files/resources/CDIGSRatModelInformationSheet.pdf>.
- Delwatta SL, Gunatilake M, Baumans V, Seneviratne MD, Dissanayaka ML, Batagoda SS, Udagedara AH, Walpola PB. Reference values for selected hematological, biochemical and physiological parameters of Sprague-Dawley rats at the Animal House, Faculty of Medicine, University of Colombo, Sri Lanka. *Anim. Model Exp. Med.* 2018; 1: 250-254.
- Enesco M, Leblond CP. Increase in Cell Number as a Factor in the Growth of the Organs and Tissues of the Young Male Rat. *Development.* 1962; 10: 530-562.
- Gileta AF, Fitzpatrick CJ, Chitre AS, St. Pierre CL, Joyce EV, Maguire RJ, McLeod AM, Gonzales NM, Williams AE, Morrow JD, Robinson TE, Flagel SB, Palmer AA. Genetic characterization of outbred Sprague Dawley rats and utility for genome-wide association studies. *PLoS Genetics.* 2022; 18(5): 1-29.
- Gross D. Animal Models in Cardiovascular Research. 3rd ed. New York: Springer; 2009. p. 457.
- Han ZZ, Xu HD, Kim KH, Ahn TH, Bae JS, Lee JY, Gil KH, Lee JY, Woo SJ, Yoo HJ, Lee HK, Kim KH, Park CK, Zhang HS, Song SW. Reference Data of the Main Physiological Parameters in Control Sprague-Dawley Rats from Pre-clinical Toxicity Studies. *Lab. Anim. Res.* 2010; 26(2): 153-164.
- Harris RB, Zhou J, Youngblood BD, Rybkin II, Smagin GN, Ryan DH. Effect of repeated stress on body weight and body composition of rats fed low- and high-fat diets. *Am. J. Physiol.* 1998; 275(6): 1928-1938.
- He Q, Su G, Liu K, Zhang F, Jiang Y, Gao J, Liu L, Jiang Z, Jin M, Xie H. Sex-specific reference intervals of hematologic and biochemical analytes in Sprague-Dawley rats using the nonparametric rank percentile method. *PLoS One.* 2017; 12: 1-18.
- Katoh M, Ozawa M, Akima T, Ikeda H, Fujii T, Ishii M. Hematological and serum biochemical changes with age in term fetuses, offspring and dams in normal Sprague-Dawley rats. *Jikken Dobutsu.* 1992; 41(3): 329-337.
- Kawamura S, Yamazoe H, Hosokawa Y. Diurnal Gain and Nocturnal Reduction of Body Weight in Young Adult Rabbits: The Reverse of the Circadian Rhythm Observed in Rats and Mice. *J. Toxicol. Cur. Res.* 2020; 4: 16.
- Kelada SN, Aylor DL, Peck BC, Ryan JF, Tavarez U, Buus RJ, Chesler DR, Threadgill DW, Churchill GA, Pardo Manuel de Villena F, Collins FS. Genetic analysis of hematological parameters in incipient lines of the collaborative cross. *G3 (Bethesda).* 2012; 2(2): 157-165.
- Kohn D, Clifford C. Biology and Diseases of Rats. In: Fox J, Anderson L, Loew F, Quimby F, editors. Laboratory Animal Medicine. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press; c2002. p 121-165.
- Ku KM, Weir RK, Silverman JL, Berman RF, Bauman MD. Behavioral phenotyping of juvenile long-evans and sprague-dawley rats: Implications for preclinical models of autism spectrum disorders. *PLoS One.* 2016; 11: 1-25.

17. Kumar M, Dandapat S, Prasad Sinha M, Kumar A, Raipat BS. Different blood collection methods from rats: A review. *Balneo Res. J.* 2017; 8: 46-50.
18. Leary SL, Underwood WJ, Anthony R, Cartner SC, Corey D, Grandin T, Greenacre CB, Gwaltney-Bran S, Mccrackin MA, Meyer RE, Miller DS, Shearer JK, Yanong, RP. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition; 2013, p. 45.
19. León Goñi A, Blanco D, Peña A, Ronda M, Gonzalez B, Arteaga ME, Banda AM, Gonzalez Y, Mancebo A. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cenp: SPRD. *Revista Electronica Veterinaria.* 2011; 12(11).
20. Lillie LE, Temple NJ, Florence LZ. Reference values for young normal Sprague-Dawley rats: Weight gain, hematology and clinical chemistry. *Hum. Exp. Toxicol.* 1996; 15(8): 612-616.
21. Maeda K, Ohkura S, Tsukamura H. Physiology of Reproduction. In: George J Krinkle, editor. *The Handbook of Experimental Animals: The Laboratory Rat.* 1st ed Academic Press; c2000. p. 145-176.
22. Pahl PJ. Growth curves for body weight of the laboratory rat. *Aust. J. Biol. Sci.* 1969; 22(4): 1077-1080.
23. Rybnikova EA, Vetrovoi OV, Zenko MY. Comparative Characterization of Rat Strains (Wistar, Wistar-Kyoto, Sprague Dawley, Long Evans, LT, SHR, BD-IX) by Their Behavior, Hormonal Level and Antioxidant Status. *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2018; 54: 374-382.
24. Schnell MA, Hardy C, Hawley M, Propert KJ, Wilson JM. Effect of blood collection technique in mice on clinical pathology parameters. *Hum. Gene. Ther.* 2002; 13(1): 155-161.
25. Slob AK, Bosch JJ. Sex differences in body growth in the rat. *Physiol. Behav.* 1975; 14: 353-361.
26. Soubhia AF, Lauz S, Frasson E, Montero DS, Menezes A, Mespaque LB, Facin E. El Efecto de los Anestésicos Inhalatorios Halotano y Sevoflurano en un Modelo Experimental de Lesión Hepática. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 2011; 61: 324-330.
27. Stöppeler S, Palmes D, Fehr M, Hölzen JP, Zibert A, Sjaq R, Schmidt HHJ, Spiegel HU, Bahde R. Gender and strain-specific differences in the development of steatosis in rats. *Lab. Anim.* 2013; 47(1): 43-52.
28. Weiss J, Taylor G, Zimmermann F, Nebendahl K. Collection of Body Fluids. In: George J Krinkle, editor. *The Handbook of Experimental Animals: The Laboratory Rat.* 1st ed Academic Press. c2000; p. 485-510.
29. Zhao S, Shetty J, Hou L, Delcher A, Zhu B, Osoegawa K, Jong P de, Nierman WC, Strausberg RL, Fraser CM. Human, mouse, and rat genome large-scale rearrangements: Stability versus speciation. *Genome Res.* 2004; 14 (10A): 1851-1860.

## **Revista Veterinaria obtuvo el máximo nivel de categorización delCAICYT-CONICET**

Tras el pertinente proceso de evaluación según criterios de calidad editorial, en setiembre de 2005 CAICYT-CONICET ha clasificado a nuestra publicación con Categoría 1 (nivel superior de excelencia), con lo cual pasa a integrar el Catálogo Latindex (folio 14022). La Dirección de Revista Veterinaria agradece a quienes colaboraron para obtener tan importante distinción.

Ver: <http://www.latindex.unam.mx/busquedas/catalogotitulo.html>



## Microplásticos e imposex en el caracol marino *Thaisella chocolata* procedente de la costa central marina del Perú

Torres-Zevallos, U.<sup>1,2</sup>; Arenas-Valeriano, A.D.<sup>1</sup>; Alvarino, L.<sup>3</sup>; Iannacone, J.<sup>1,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Zoología. Grupo de Investigación “One Health”. Facultad de Ciencias Biológicas (FCB). Universidad Ricardo Palma (URP). Av. Benavides 5440, Santiago de Surco, Lima, Perú. <sup>2</sup>Departamento de Zoología. Museo de Historia Natural “Vera Alleman Haeghebaert”, Universidad Ricardo Palma (URP). Av. Benavides 5440, Santiago de Surco, Lima, Perú. <sup>3</sup>Laboratorio de Ecología y Biodiversidad Animal (LEBA), Museo de Historia Natural de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Grupo de Investigación de Sostenibilidad Ambiental (GISA), Escuela Universitaria de Posgrado (EUPG), Universidad Nacional Federico Villarreal, Jr. Río Chepén 290, El Agustino, Lima, Perú. <sup>4</sup>COEPERU-Coastal Ecosystems of Peru Research Group. Laboratorio de Ingeniería Ambiental. Escuela de Ingeniería Ambiental. Universidad Científica del Sur, Panamericana Sur Km 19, Villa, Lima, Perú. \*E-mail: joseiannacone@gmail.com

### Resumen

La contaminación por microplásticos (MP) y por la presencia de imposex (IMP) en caracoles de consumo humano se ha convertido en un tema de preocupación mundial en los ecosistemas marinos. El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia de MP y de IMP en el caracol marino *Thaisella chocolata* en cuatro localidades y dos temporadas del año de la costa central del Perú. Los sitios seleccionados fueron las caletas de Chorrillos, y de Cerro Azul, y los puertos marítimos menores de Chancay y de Huacho, del departamento de Lima, Perú. Individuos de *T. chocolata* fueron colectados en cada localidad y en dos temporadas del 2021. Los caracoles fueron examinados para la cuantificación de MP, de acuerdo a su forma y coloración, y en las hembras fue determinado el IMP y calificado porcentualmente. El análisis global muestra una Frecuencia de Ocurrencia (FO%) de MP de  $97,86\% \pm 3,34$  (rango de 90,90 al 100%), y la abundancia (micropartículas de MP/individuo) fue de  $9,07 \pm 4,71$  (rango 4,72 a 17,82). Los colores de los MP negro, azul y magenta fueron los dominantes. La FO%, y la abundancia de micropartículas de MP no mostraron diferencias entre ambas temporadas. Los mayores valores de detección de MP ocurrieron en los individuos de Cerro Azul. Los microfragmentos de MP presentaron las mayores abundancias y el color negro fue el dominante. El IMP fue calificado mayormente como alto en un 50% de los caracoles hembras. No se observaron diferencias en la FO% ni en la abundancia de micropartículas de MP entre temporadas. El IMP no se asoció con la FO% ni con la abundancia de MP en *T. chocolata*. La abundancia de MP en *T. chocolata* se relacionó negativamente con los nitritos, nitratos, y amonio, y positivamente con el oxígeno disuelto del agua de mar. Los hallazgos indican que el caracol marino *T. chocolata* es un organismo adecuado para el monitoreo de la contaminación por MP y del IMP.

**Palabras clave:** caracol marino, microfibras, microfragmentos, microplástico, imposex, *Thaisella chocolata*.

## Microplastics and imposex in the sea snail *Thaisella chocolata* from the central marine coast of Peru

**Abstract.** Contamination by microplastics (MP) and the presence of imposex (IMP) in snails for human consumption has become an issue of global concern in marine ecosystems. The objective of this study was to evaluate the presence of MP and IMP in the sea snail *Thaisella chocolata* in four locations and two seasons of the year on the central coast of Peru. The selected sites were the coves of Chorrillos and Cerro Azul, and the minor seaports of Chancay and Huacho, in the department of Lima, Peru. Individuals of *T. chocolata* were collected in each location and in two seasons of 2021. The snails were examined for the quantification of MP, according to their shape and color, and in the females, the IMP was determined and qualified as a

percentage. The global analysis shows a Frequency of Occurrence (FO%) of MP of was  $97.86\% \pm 3.34$  (range from 90.90 to 100%), and the abundance (MP microparticles/individual) was  $9.07 \pm 4.71$  (range 4.72 to 17.82). The colors of the black, blue and magenta MPs were the dominant ones. The FO%, and the abundance of MP microparticles did not show differences between both seasons. The highest MP detection values occurred in individuals from Cerro Azul. The MP micro-fragments presented the highest abundance and the black color was the dominant one. The IMP was rated as high in 50% of the female snails. No differences were observed in FO% or in the abundance of MP microparticles between seasons. The IMP was not associated with the FO% or with the abundance of MP in *T. chocolata*. The abundance of MP in *T. chocolata* was negatively related to nitrites, nitrates, and ammonium, and positively related to dissolved oxygen in seawater. The findings indicate that the marine snail *T. chocolata* is a suitable organism for monitoring MP and IMP contamination.

**Key words:** sea snail, micro-fibers, micro-fragments, microplastic, imposex, microplastic particles, *Thaisella chocolata*.

## INTRODUCCIÓN

Un problema ambiental emergente de la actualidad, es la creciente presencia de plásticos en el medio marino, los cuales son alterados por la erosión física y química en la dinámica del mar y por la radiación solar; a estos se suma la existencia de otros contaminantes que los modifican a partículas de un diámetro menor a cinco mm denominados microplásticos (MP) (Manullang 2018, Oberbeckmann 2018, Mearns et al. 2019, Hale et al. 2020).

Los efectos de los MP han venido reportándose desde hace un par de décadas, y desde entonces, han recibido diferentes categorías, MP primarios y secundarios (Cordova y Hernawan 2018). Los MP pueden causar daños a diversos recursos hidrobiológicos; además de causar problemas en la cadena alimentaria debido a la posible biomagnificación que puede ocurrir y por lo tanto, alterar a consumidores finales como a los humanos (Iannacone et al. 2021, Kleinschmidt y Janosik 2021, Iannacone et al. 2022).

Los MP han sido detectados en los tejidos de diferentes organismos marinos y sus efectos se relacionan a la absorción de metales pesados y otras sustancias nocivas (Kolandhasamy et al. 2018, Mearns et al. 2019, Wang et al. 2019, Kleinschmidt y Janosik 2021). Los MP en los ambientes marinos se originan tanto en fuentes terrestres como marinas y pueden llegar a los hábitats marinos mediante la escorrentía, la actividad industrial, las actividades humanas como el turismo y las industrias textiles, así como también, por las plantas de tratamiento de aguas residuales (Manullang 2018, Kleinschmidt y Janosik 2021).

Otra problemática de contaminación marina emergente es la presencia de tributilo de estaño (TBT). El 70 a 80% de la flota mercante mundial utiliza el TBT, un componente químico componente de la pintura anti-incrustante colocado en los cascos de los barcos, muelles y boyas (van Gesselten et al. 2018, Uogintè et al. 2022). La función del TBT es evitar la adhesión de organismos bentónicos suspensívoros (crustáceos, poliquetos y/o moluscos, entre otros) y de macroalgas a las superficies vertidas (Ragagnin y Turra 2022). Este componente xenobiótico, ha tenido efectos subletales y letales en microorganismos, invertebrados y vertebrados (Castro et al. 2021, Beyer et al. 2022). Los daños reportados van desde alteraciones en el ADN y ARN, neurotoxicidad, teratogenia, inmunotoxicidad, incluso ha conllevado a la extinción de especies de gasterópodos (Chamorro-García et al. 2021, Mendes et al. 2022, Sadan et al. 2022).

Los compuestos organoestañosos como el TBT, tienen un efecto particular sobre los gasterópodos marinos, que es el de causar el fenómeno denominado imposex (IMP) (Castro et al. 2018, Beyer et al. 2022). Este fenómeno implica el desarrollo de órganos sexuales masculinos en las hembras, lo cual, puede ocasionar en estos moluscos, el fracaso reproductivo y una posterior extinción de las poblaciones locales (Castro et al. 2012, van Gesselten et al. 2018, Enrique et al. 2019, Luna-Pacompea et al. 2022, Ragagnin y Turra 2022, Uogintè et al. 2022).

*Thaisella chocolata* es un gasterópodo que presenta una distribución en toda América del Sur, y está vinculado a sustratos duros (Enrique et al. 2019). Es una especie de interés comercial por su consumo local y de exportación (Luna-Pacompea et al. 2022). Si bien no tiene la misma demanda que los peces pelágicos, durante el 2021, se ha realizado un desembarque entre el 2012 al 2021 de 24.079 tn de caracol para consumo humano directo (PRODUCE 2021, Villegas et al. 2021). Este gasterópodo ha sido muy utilizado en ensayos experimentales como bioindicador y bioacumulador, en especial, para la evaluación de los efectos del disruptor endocrino TBT y de los MP (Castro et al. 2018, Villegas et al. 2021, Luna-Pacompea et al. 2022).

Al respecto, hasta hace poco tiempo, se pensaba que los puertos internacionales y de alto tráfico marino de grandes embarcaciones, eran la fuente principal de contaminación por MP y TBT; sin embargo, las recientes investigaciones han encontrado que los puertos artesanales tendrían aportes más frescos principalmente de TBT, causando altos niveles de IMP en las poblaciones (Enrique et al. 2019). La alteración hormonal generada por el TBT en las hembras de gasterópodos, ocasiona que estos individuos se vuelvan estériles (Luna-Pacompea et al. 2022), reduciendo considerablemente la densidad poblacional, y llegando a la desaparición de esta especie a nivel local, al afectar el equilibrio del ecosistema marino (Enrique et al. 2019).

En ese contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar los niveles de MP e IMP en el caracol marino *T. chocolata* procedentes de cuatro localidades, de dos caletas marinas, Chorrillos y Cerro Azul, y de dos puertos marinos menores de Chancay y de Huacho de la costa central marina de Lima, Perú.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Área de Estudio.** Los sitios seleccionados fueron las caletas de Chorrillos ( $12^{\circ}09'23''\text{LS}$ ;  $77^{\circ}01'55''$

LO), Provincia de Lima, y de Cerro Azul (13°01'14''LS; 76°23'08''LO), Provincia de Cañete, que son lugares habilitados u ocasionales de embarque y desembarque de mercadería, y dos puertos marítimos menores de Chancay (11°34'30''LS; 77°16'25''LO), Provincia de Huaral y de Huacho (11°06'38''LS, 77°37'13'' LO), Provincia de Huaura que son utilizados solo para exportar en el departamento de Lima, Perú (Figura 1). Los muestreos se realizaron entre el 27 al 30 de septiembre del 2021 (primavera: primer muestreo) y entre el 27 al 31 de diciembre del 2021 (verano: segundo muestreo).

*Thaisella chocolata*. Se recolectaron especímenes de *T. chocolata*, correspondientes a cada una de las cuatro localidades evaluadas y en ambas temporadas durante el 2021. El procedimiento de recolección siguió el método de buceo con snorkel una profundidad entre los 0,6 y 10 m, y a una distancia de la línea de marea de hasta 50 m y se seleccionaron ejemplares con medidas entre 40 a 70 mm (Castro y Fillman 2012).

**Microplásticos.** Se efectuó la extracción de MP por cada ejemplar de caracol marino, en tres etapas: secado, digestión y filtración. El secado se realizó por 48 h en una estufa a 60°C. Para la obtención de MP se realizó la etapa de digestión con una solución de KOH al 10% por 24 h a una temperatura de 60°C, y se dejó reposar la muestra hasta no observar turbidez en el sobrenadante. Finalmente, el sobrenadante fue tamizado a través de un filtro de nitrocelulosa de 47 mm de diámetro y 6 µm de poro, ayudado por una bomba de vacío (Rocker 400®) (Hale et al. 2020, Iannacone et al. 2022).

Los MP se caracterizaron de acuerdo a su forma (microfibra «MP delgado, fibroso y recto», microfilamento «MP muy significativamente más largo que ancho en dos dimensiones (relación longitud-diámetro), no fibroso», microfragmento «partícula de MP duro e irregular», gránulo «partícula en forma de esfera o esferoide de MP con cada punto en su superficie con una distancia similar desde el centro», micropelícula «MP endeble, plano e irregular» o espuma «MP poroso o plástico celular expandido») y coloración. Esta última descripción fue útil para identificar fuentes potenciales de contaminación y se clasificó en negro, rojo, azul, verde, magenta, amarillo y blanco (Hartmann et al. 2019, Alvarez-Zeferino et al. 2020, Buwono et al. 2021). Para monitorear u observar los MP se estandarizó todo el protocolo para evitar errores de selección, tales como (1) ausencia de estructuras celulares o biológicas aparentes; (2) las fibras tienen el mismo grosor hacia abajo y no deben estrecharse en los extremos; (3) las micropartículas coloreadas tienen un color uniforme; (4) las fibras en cinta no están segmentadas y no parecen dobladas; (5) las micropartículas no son brillantes (Buwono et al. 2021).

**Imposex.** Para la determinación del IMP se siguió el método de Castro et al. (2018). Los ejemplares fueron anestesiados con una disolución de cloruro de magnesio al 3,5%. La longitud de la concha del gasterópodo fue medida usando un vernier ( $\pm 0,01$  mm de grado de precisión) desde el ápex hasta la base del caracol. La identificación

sexual fue evidenciada por la presencia de la glándula de cápsula y ovarios en los ejemplares femeninos; y la presencia de testículos y vesícula seminal, en los ejemplares masculinos, (Castro y Fillman 2012). El IMP en las hembras (I%) fue determinado como  $I\% = (\text{hembras con IMP}) / (\text{total de hembras}) \times 100$ . El IMP fue calificado en cuatro categorías: ausente (% de IMP = cero), bajo (% de IMP = 0,1 a 33%), medio (% de IMP = 33,1 a 66) y alto (% de IMP = 66,1 a 100%) (Luna-Pacompea et al. 2022, Ragagnin y Turra 2022).



**Figura 1.** Mapa cartográfico de los cuatro sitios evaluados (caletas y puertos marítimos menores) del departamento de Lima, Perú.

**Parámetros Físico-Químicos.** Fueron determinados la temperatura superficial del mar (°C) y el pH con un termómetro y pHmetro digital, respectivamente (Hanna HI 98128®), y el oxígeno disuelto (OD) ( $\text{mg L}^{-1}$ ) fue obtenido con el kit (“Salifert Dissolved Oxygen Test Kit”). El amonio ( $\text{mg L}^{-1}$ ), nitritos ( $\text{mg L}^{-1}$ ), nitratos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) y fosfato ( $\text{mg L}^{-1}$ ) fueron obtenidos con un kit multitest colorimétrico usando las instrucciones del fabricante y las hojas técnicas de seguridad de cada parámetro (Seachem Laboratories, Inc., USA). Los parámetros Físico-Químicos fueron determinados entre el 27 al 30 de septiembre del 2021 (primavera: primer muestreo) y entre el 27 al 31 de diciembre del 2021 (verano: segundo muestreo) para cada una de las dos caletas y para los dos puertos marítimos menores. En cada localidad y en cada temporada fue tomado un solo análisis fisicoquímico.

**Análisis de datos.** Los resultados descriptivos para la determinación de MP y presencia de IMP son expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar (DE). La distribución normal de los datos de MP e IMP se verificaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk con la corrección de Lilliefors, y la prueba de Levene se usó para evaluar la homogeneidad de varianzas. En el caso de cumplir con estos dos supuestos se emplearon las pruebas paramétricas. De esta manera, se emplearon los siguientes estadígrafos: (1) para comparar la Frecuencia de Ocurrencia (FO%) y la abundancia de micropartículas de MP entre temporadas fue usada la prueba de t de student (t); (2) para comparar la abundancia de micropartículas de MP entre las localidades evaluadas fue usada la prueba de ANOVA con base



al estadístico F con posterior prueba de Tukey; (3) de igual manera, para comprobar las diferencias significativas entre la abundancia de partículas MP por gasterópodo entre caletas y puertos marítimos, se utilizó la prueba de t de Student; (4) la presencia de IMP en *T. chocolata* fue comparado entre temporadas y entre localidades (caletas versus puertos marítimos menores) con base a la t de student, (5) el grado de asociación entre el % IMP y cada una de las cuatro localidades fue evaluado mediante la prueba de  $X^2$ ; (5) un análisis de correlación de Pearson ( $r_p$ ) fue realizado para evaluar la relación de la FO% y de la abundancia de MP del gasterópodo con el IMP; finalmente (6) la FO%, abundancia de MP e IMP fueron correlacionados ( $r_p$ ) con cada uno de los parámetros físico-químicos de calidad de agua marina. Al no cumplirse con la normalidad o con la homogeneidad de varianzas se usó pruebas no paramétricas. De esta forma se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis (H) para comparar las diferencias en la abundancia de micropartículas de MP totales, por color negro, azul y magenta según su forma, con posterior prueba de Bonferroni. Todos los análisis fueron realizados con un nivel de confiabilidad del 95% en el software estadístico SPSS ver 26,00 y el PAST software 4.1.

**Aspectos éticos.** Se aplicaron todas las normativas de la institucional peruana e internacionales en base a las autorizaciones, normas de bioseguridad y descarte de sustancias de naturaleza química y biológica. En el laboratorio fue seguido lo señalado en la guía para la gestión y eliminación de residuos del Laboratorio de Zoología de la Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.

## RESULTADOS

**Microplásticos.** Las variaciones en la FO%, abundancia de MP (micropartículas/individuo) con base al color en *T. chocolata* es indicada para las dos temporadas y para las cuatro localidades del departamento de Lima (Tabla 1). La FO% de MP y la abundancia (micropartículas de MP/individuo) en el total de caracoles evaluados ( $n=265$ ) se resume en la Tabla 1. La FO% de MP fue entre un 90 a 100% ( $97,86\% \pm 3,34$ ), y la abundancia varió entre 4,72 a 17,82 ( $9,07 \pm 4,71$ ). Los colores dominantes en toda la muestra fueron: negro > azul > magenta > rojo > blanco > verde > amarillo (Tabla 1). No se observaron diferencias en la FO% de MP ( $t=0,89$ ,  $p>0,05$ ), en abundancias de micropartículas de MP totales ( $t=0,36$ ,  $p>0,05$ ), o por los colores azul, negro y magenta ( $t=0,30-0,52$ ,  $p>0,05$ ) entre las dos temporadas de muestreo.

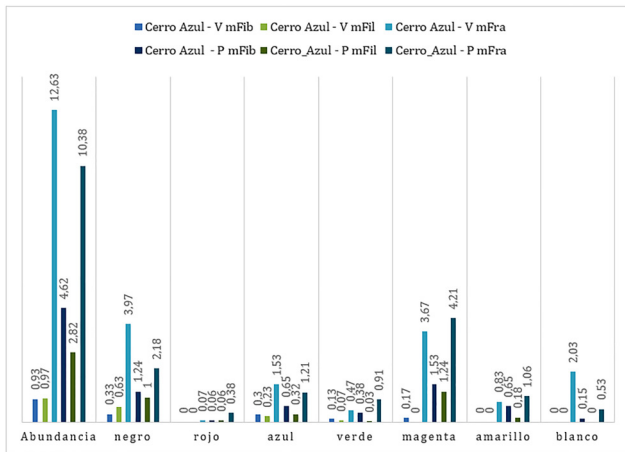
No se observó diferencias en la FO% de MP entre las dos temporadas evaluadas ( $t=0,89$ ,  $p>0,05$ ), tampoco entre las abundancias de micropartículas de MP totales, o por los colores azul, negro y magenta entre las dos temporadas ( $t=0,30-0,52$ ,  $p>0,05$ ). Se encontraron diferencias entre las abundancias de micropartículas de MP entre las cuatro localidades evaluadas ( $F=26,68$ ;  $p<0,05$ ), observándose diferencias entre Cerro Azul con las otras tres localidades. Finalmente, se notó una mayor abundancia de micropartículas de MP en *T. chocolata* en las dos caletas (Cerro Azul y Chorrillos,  $12,42 \pm 4,57$ ) en comparación a los dos puertos marítimos menores (Chancay y Huacho,  $5,71 \pm 1,03$ ) ( $t=2,86$ ;  $p<0,05$ ).

**Tabla 1:** Variaciones en la Frecuencia de Ocurrencia (FO%) y en la abundancia de MP (micropartículas/individuo) según color en *Thaisella chocolata* en primavera-2021 y verano-2021 en cuatro localidades del Departamento de Lima, Perú.

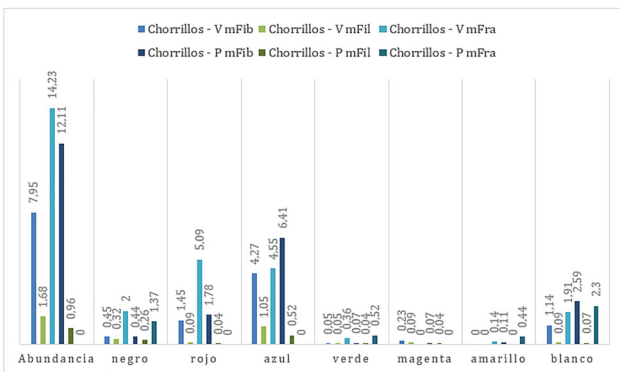
Localidad	Temporada	n	FO%	abundancia	negro	rojo	azul	Verde	magenta	amarillo	blanco
Cerro Azul	Primavera	34	100	17,82	4,41	0,50	2,18	1,32	6,97	1,88	0,68
Cerro Azul	Verano	30	100	14,53	4,93	0,07	2,07	0,67	3,83	0,83	2,03
Chorrillos	Primavera	27	100	9,40	0,69	2,38	3,86	0,21	0,17	0,19	1,65
Chorrillos	Verano	22	100	7,95	0,92	2,21	3,29	0,15	0,11	0,05	1,05
Chancay	Primavera	47	95,74	4,72	2,01	0,14	0,59	0,93	0,26	0,23	0,55
Chancay	Verano	80	96,25	5,22	1,76	0,61	1,13	0,55	0,45	0,15	0,57
Huacho	Primavera	12	100	7,11	2,89	1,06	0,42	1,03	1,08	0,22	0,42
Huacho	Verano	11	90,90	5,82	0,88	1,70	2,21	0,00	0,18	0,00	0,85

Las Figuras 2 al 5 nos indica la abundancia (micropartículas de MP/individuo) de *T. chocolata* en dos temporadas y en cuatro localidades del departamento de Lima según forma de MP. Se observa un predominio en todas las localidades de los microfragmentos, luego las microfibras y finalmente los microfilamentos. Siendo los colores predominantes azul, negro y magenta (Figuras 2-5). Se observaron diferencias significativas entre la abundancia de MP según la forma ( $H=14,55$ ,  $p<0,05$ ). La abundancia total de MP fue igual entre microfibras y microfilamentos, pero ambas fueron diferentes con los microfragmentos de MP según la prueba de Tukey. Este mismo patrón fue observado para la abundancia de MP de color negro ( $H=13,79$ ,  $p<0,05$ ).

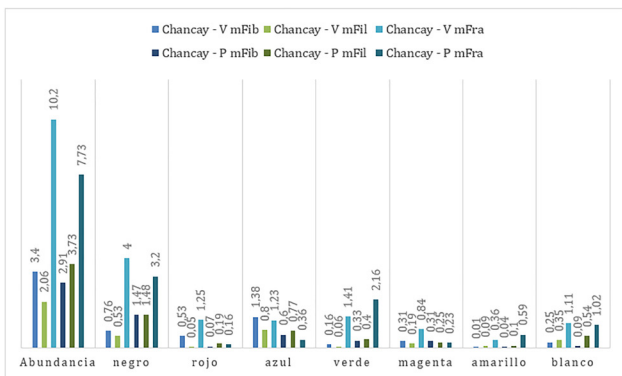
La abundancia de las micropartículas de MP color azul, fueron mayores en la forma de microfilamento y microfragmentos, respecto a las otras formas ( $H=7,24$ ,  $p<0,05$ ). Sin embargo, cuando se compararon las abundancias con a base a la forma de MP para el color magenta no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $H=2,49$ ,  $p>0,05$ ). No fueron encontrados gránulos, micropelículas o espumas.



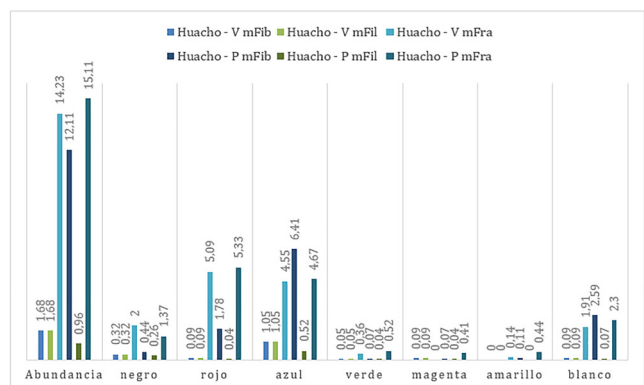
**Figura 2.** Variaciones en la abundancia de MP (micropartículas/individuo) según forma y color en *Thaisella chocolata* en primavera-2021 y verano-2021 en Cerro Azul, Departamento de Lima, Perú. mFib = microfibras. mFil = microfilamento. mFra = microfragmento. P=Primavera; V = Verano.



**Figura 3.** Variaciones en la abundancia de MP (micropartículas/individuo) según forma y color en *Thaisella chocolata* en primavera-2021 y verano-2021 en Chorrillos, Departamento de Lima, Perú. mFib = microfibras. mFil = microfilamento. mFra = microfragmento. P = Primavera; V = Verano.

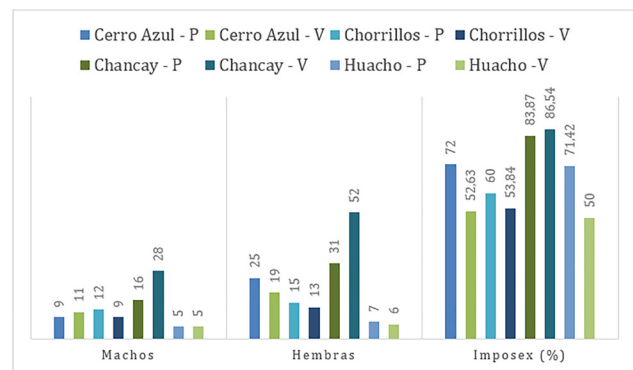


**Figura 4.** Variaciones en la abundancia de MP (micropartículas/individuo) según forma y color en *Thaisella chocolata* en primavera-2021 y verano-2021 en Chancay, Departamento de Lima, Perú. mFib = microfibras. mFil = microfilamento. mFra = microfragmento. P = Primavera; V = Verano.



**Figura 5.** Variaciones en la abundancia de MP (micropartículas/individuo) según forma y color en *Thaisella chocolata* en primavera-2021 y verano-2021 en Huacho, Departamento de Lima, Perú. mFib = microfibras. mFil = microfilamento. mFra = microfragmento. P = Primavera; V = Verano.

**Imposex.** La Figura 6 muestra las variaciones en los porcentajes de IMP en *T. chocolata* entre localidades y por temporadas. Del total de caracoles marinos analizados, se observaron un total de 95 machos y 168 hembras, de estas últimas 123 presentaron IMP (73,21%). El porcentaje de IMP fue calificado según la escala de Ragagnin y Turra en cuatro localidades y temporadas del año como medio (50%), y en cuatro como alto (50%). No se observó diferencias en el porcentaje de IMP entre temporadas (primavera-verano) ( $t=1,11$ ;  $p>0,05$ ). Tampoco se vieron variaciones significativas en el porcentaje de IMP en *T. chocolata* entre temporadas para cada una de las cuatro localidades ( $X^2=0,01-0,40$ ,  $p=0,52-0,94$ ). Finalmente, no se observaron diferencias en el porcentaje de IMP en *T. chocolata* entre las dos caletas (Cerro Azul y Chorrillos) y los dos puertos marítimos menores (Chancay y Huacho) ( $t=1,41$ ;  $p>0,05$ ).



**Figura 6:** Variaciones en los porcentajes de Imposex (%) en *Thaisella chocolata* en primavera-2021 y verano-2021 en cuatro localidades del Departamento de Lima, Perú. P = Primavera; V = Verano.

**Parámetros Físico-Químicos.** Los valores de los parámetros fisicoquímicos evaluados en ambas temporadas en las localidades de estudio se muestran en la Tabla 2. Se observa el cumplimiento de la Normativa de la ECA (Estándar de Calidad ambiental) Categoría 2. Extracción, cultivo y otras actividades marino costeras y continentales.

C3 = Actividades marino portuarias, industriales, o de saneamiento en aguas marino costeras según MINAM (2017) para la Temperatura (19,50 a 20,67°C), el pH (6,87 a 7,87) y el OD (6,87 a 8,23 mg L<sup>-1</sup>), para los otros cuatro parámetros de calidad de agua no se observaron altas variaciones para las cuatro localidades y temporadas para el amonio (0,27 a 0,47 mg L<sup>-1</sup>), nitritos (0,04 a 0,06 mg L<sup>-1</sup>), nitratos (0,32 a 0,45 mg L<sup>-1</sup>) y fosfatos (0,39 a 0,37 mg L<sup>-1</sup>).

**Análisis global.** El porcentaje de IMP no se encontró asociado con la FO% o con la abundancia de MP en *T. chocolata* ( $r = -0,08$  a  $-0,35$ ,  $p > 0,05$ ). Únicamente se vio asociación positiva entre la FO% y la abundancia de MP ( $r = 0,79$ ,  $p < 0,05$ ). De igual forma la abundancia de MP en *T. chocolata* se observó relacionada negativamente con los nitritos ( $r = -0,94$ ,  $p < 0,05$ ), con los nitratos ( $r = -0,90$ ,  $p < 0,05$ ), y con el amonio ( $r = -0,88$ ,  $p < 0,05$ ) y positivamente con el OD ( $r = 0,96$ ,  $p < 0,05$ ).

**Tabla 2:** Parámetros físico-químicos del agua superficial según temporada en primavera-2021 y verano-2021 en las caletas de Chorrillos y Cerro Azul, y en los puertos marítimos Chancay y Huacho del Departamento de Lima, Perú.

Localidad	Temporada	Temperatura	pH	Oxígeno mg L <sup>-1</sup>	Amonio mg L <sup>-1</sup>	Nitritos mg L <sup>-1</sup>	Nitratos mg L <sup>-1</sup>	Fosfatos mg L <sup>-1</sup>
Cerro Azul	Primavera	19,50	7,87	8,23	0,27	0,04	0,33	0,30
Cerro Azul	Verano	20,17	7,83	8,17	0,30	0,04	0,32	0,32
Chorrillos	Primavera	19,50	7,67	7,17	0,32	0,05	0,43	0,37
Chorrillos	Verano	20,06	7,68	7,01	0,41	0,06	0,44	0,34
Chancay	Primavera	20,33	7,67	6,93	0,43	0,06	0,45	0,33
Chancay	Verano	20,33	7,70	6,93	0,47	0,06	0,45	0,33
Huacho	Primavera	20,50	7,87	7,00	0,40	0,06	0,40	0,30
Huacho	Verano	20,67	7,83	6,87	0,37	0,06	0,42	0,33
	Promedio	20,13	7,76	7,29	0,37	0,05	0,41	0,33
ECA	2. C3	Δ3	6,8 a 8,5	≥2,5	NA	NA	NA	NA

ECA Categoría 2. Extracción, cultivo y otras actividades marino costeras y continentales. C3 = Actividades marino portuarias, industriales, o de saneamiento en aguas marino costeras según MINAM (2017).

## DISCUSIÓN

**Microplásticos.** Los resultados en esta investigación evidencian contaminación por MP en *T. chocolata*. Los colores dominantes de MP en *T. chocolata* fueron el negro (0,69 a 4,94 micropartículas de MP/individuo), azul (0,42 a 3,86 micropartículas de MP/individuo) y magenta (0,11 a 6,97 micropartículas de MP/individuo). Los colores de los MP se pueden emplear para determinar su origen, identificar aditivos químicos y su posible peligrosidad ambiental (Iannacone et al. 2021, 2022). Las micropartículas de color negro se obtienen mayormente de los neumáticos de los automóviles, y de otras fuentes industriales. Los de color azul podrían provenir de tapas de botellas de agua. La mayoría de los MP con colores brillantes, como el rojo, verde o magenta, proceden de materiales sintéticos lavados en lavadoras, los que utiliza metales pesados como cromo, cobre, cobalto, selenio, plomo y cadmio. Las micropartículas blancas o transparentes provienen de envases de embalaje, envases de alimentos, bolsas, entre otros. La decoloración amarillenta de los MP pudiera producirse por estar expuestos a la intemperie (Uogintè et al. 2022). No se observó diferencias en la FO%, ni entre las abundancias de micropartículas de MP entre temporadas. Sin embargo, algunas investigaciones señalan que los MP pueden variar según la temporada debido a las diferencias en las condiciones climáticas, aunque los resultados son altamente variables (Uogintè et al. 2022).

Se notó una mayor abundancia de MP en *T. chocolata* en la caleta Cerro Azul en comparación a las otras localidades. Estas variaciones podrían deberse a las diferencias

en el consumo de presas y a la posterior contaminación por MP de las presas de esta especie de caracol en cada localidad. Se ha observado en el caracol congénico *Stramonita haemastoma*, que retiene o transfiere los MP a tejidos distintos del sistema digestivo, favoreciendo la acumulación en los mismos (Kleinschmidt y Janosik 2021). La contaminación por MP representa una amenaza para ciertas especies de caracoles marinos depredadores como *T. chocolata* dependiendo de las presas consumidas, la retención de MP y su posición en la cadena alimentaria (Kleinschmidt y Janosik 2021).

En el presente estudio los microfragmentos fueron los dominantes. Los microfragmentos presentes en *T. chocolata* se pudieran originar a partir de la descomposición de piezas más grandes de desechos plásticos. Las microfibras y los microfilamentos en *T. chocolata* fueron las segundas y terceras en importancia, y se pueden originar a partir de una variedad de fuentes que incluyen aguas residuales, ropa, cuerdas y redes, cigarrillos y actividad pesquera, entre otros (Kleinschmidt y Janosik 2021, Eamrat et al. 2022).

**Imposex.** El IMP en el neogasterópodo *T. chocolata* fue del 73,21%, calificado según la escala de Ragagnin y Turra (2022) como 50% en un nivel alto y 50% en un nivel medio. No se observó diferencias en el porcentaje de IMP entre temporadas, ni entre localidades. La ausencia de variaciones entre las cuatro localidades y entre las temporadas de primavera e invierno muestran una homogeneidad entre las localidades y en las condiciones ambientales de cada localidad (Rico et al. 2019, Beyer et al. 2022). En el Perú, se ha encontrado en *T. chocolata* en las costas marinas de Ica,

un porcentaje menor de IMP de 33% en el otoño en la Isla de San Gayán, localizada muy cerca a la zona litoral. De igual forma se han encontrado valores próximos al 100% en puntos más cercanos a la zona litoral en el Callao y en Miraflores, Lima, Perú; sin embargo, en las costas marinas de Matarani, Arequipa, el porcentaje de IMP en *T. chocolata* fluctuó entre 8,1 y 12,5% (Luna-Pacompea et al. 2022).

Nuestros resultados sugieren que hay IMP en un 73,21% de *T. chocolata* en las aguas marinas de la costa central del Perú. Esto puede considerarse como un nivel elevado en la detección, a pesar que a nivel mundial hay una tendencia a la disminución del IMP (Beyer et al. 2022, Luna-Pacompea et al. 2022). Los puertos pesqueros concurrenciosos evidencian el fenómeno del IMP en los caracoles marinos (Beyer et al. 2022). Otra investigación ha sugerido que la presencia de botes medianos y pequeños como los que se observan en estas cuatro localidades peruanas pueden ser una fuente de contaminación y producir IMP en los caracoles marinos (Rico et al. 2019).

No se vio asociación entre el porcentaje de IMP con la FO% y con la abundancia de MP en *T. chocolata*, lo que indica que la presencia de IMP, y de MP son al parecer procesos de contaminación independientes. A la fecha, existe escasa documentación que prueben que un aumento en los niveles de MP ocasione incremento en el IMP (Gallo et al. 2018).

**Parámetros Físico-Químicos.** La abundancia de MP en *T. chocolata* se observó relacionada negativamente con los nitritos, nitratos, y amonio, y positivamente con el OD del agua. Se ha observado alta abundancia de MP en aguas de canales urbanos de Tailandia con altos valores de nitratos y nitritos, pero amonio moderado, y niveles bajos OD, pH y temperatura (Eamrat et al. 2022), lo que significa un patrón opuesto al presente estudio en ambientes marinos de la costa central del Perú. De igual forma, la turbidez, los sólidos suspendidos totales y la demanda bioquímica de oxígeno del agua son los principales elementos que están directamente relacionados con la abundancia de MP en un ambiente acuático de Indonesia (Buwono et al. 2021). Los parámetros fisicoquímicos ambientales pueden tener un mayor impacto en la dispersión de MP que los factores antropogénicos (Buwono et al. 2021). Los resultados de estas investigaciones indican que la abundancia por MP está relacionada con la calidad del agua, especialmente con respecto a los microfragmentos y micropelículas (Eamrat et al. 2022). La información sobre la relación de los parámetros fisicoquímicos de la calidad del agua con la abundancia de MP es aún muy limitada, en especial para el ambiente marino (Eamrat et al. 2022).

Futuras investigaciones deben continuar analizando las fuentes de MP, la contribución relativa de las microfibras sintéticas a esta contaminación; la importancia relativa de los microfragmentos de los neumáticos de vehículos; el tamaño, la forma y la composición (polímeros y aditivos) de los MP de diferentes orígenes; el aporte de los granulos de resina en la producción de los plásticos y finalmente los aportes fluviales, y las entradas atmosféricas en relación al ambiente marino (Gallo et al. 2018, Manullang 2018, Iannacone et al. 2021, 2022). Es clave caracterizar

los MP con base al color y forma, y a la abundancia de las micropartículas en el caracol marino *T. chocolata* con el fin que las investigaciones futuras diluciden cómo los MP se movilizan a través de la red alimentaria y cómo afectan directa e indirectamente a la biota acuática, e inclusive a la salud humana (Kleinschmidt y Janosik 2021).

## CONCLUSIONES

La abundancia de MP en *T. chocolata* se observó relacionada con algunos parámetros fisicoquímicos del agua de mar. Los datos obtenidos en este trabajo nos permiten sugerir al caracol de consumo humano *T. chocolata* como un adecuado organismo bioindicador para el monitoreo de MP, con base a su forma y color y el porcentaje de IMP en diversas localidades de la costa marina del Perú, y del Pacífico sur, que es el ámbito geográfico de distribución de este molusco.

## ORCID

Torres-Zevallos, U.  <https://orcid.org/0000-0002-0804-5700>

Arenas-Valeriano, A.D.  <https://orcid.org/0000-0001-6886-5308>

Alvarino, L.  <https://orcid.org/0000-0003-1544-511X>

Iannacone, J.  <https://orcid.org/0000-0003-3699-4732>

## REFERENCIAS

1. Alvarez-Zeferino JC, Cruz-Salas AA, Vázquez-Morrillas A, Ojeda-Benitez S. Method for quantifying and characterization of microplastics in sand beaches. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 2020; 36: 151-164.
2. Beyer J, Song Y, Tollefsen KE, Berge JA, Tveiten L, Helland A, Øxnevad S, Schøyen M. The ecotoxicology of marine tributyltin (TBT) hotspots: A review. *Mar. Environ. Res.* 2022; 179: 105689.
3. Buwono NR, Risjani Y, Soegianto A. Distribution of microplastic in relation to water quality parameters in the Brantas River, East Java, Indonesia. *Environ. Technol. Innov.* 2021; 24: 101915.
4. Castro IB, Fillman G. High tributyltin and imposex levels in the commercial muricid *Thais chocolata* from two peruvian harbor areas. *Environ. Toxicol. Chem.* 2012; 31: 1-6.
5. Castro IB, Arroyo M, Costa P, Fillmann G. Butyltin compounds and imposex levels in Ecuador. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2012; 62: 68-77.
6. Castro IB, Iannacone J, Santos S, Fillmann G. TBT is still a matter of concern in Peru. *Chemosphere* 2018; 205: 253-259.
7. Castro IB, Machado FB, de Sousa GT, Paz-Villarraga C, Fillmann G. How protected are marine protected areas: A case study of tributyltin in Latin America. *J. Environ. Manage.* 2021; 278: 111543.
8. Cordova MR, Hernawan UE. Microplastics in Sumba waters, East Nusa Tenggara. *IOP Conf. Ser.: Earth. Environ. Sci.* 2018; 162: 012023.

9. Chamorro-García R, Poupin N, Tremblay-Franco M, Canlet C, Egusquiza R, Gautier R, Jouanin I, Shoucri BM, Blumberg B, Zalko D. Transgenerational metabolomic fingerprints in mice ancestrally exposed to the obesogen TBT. *Environ. Int.* 2021; 157: 106822.
10. Eamrat R, Taweesan A, Pussayanavin T. Assessment of microplastics distribution and related water quality in an urban canal, Thailand. *Pollut.* 2022; 8: 1172-1184.
11. Enrique S, Guabloche A, Tuesta E, Iannacone J, Castro IB. Imposex responses in *Thaisella chocolata* and *Xanthochorus buxeus* from Callao harbor, Peru. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 2019; 26: 100510.
12. Gallo F, Fossi C, Weber R, Santillo D, Sousa J, Ingram I, Nadal A, Romano, D. Marine litter plastics and microplastics and their toxic chemicals components: the need for urgent preventive measures. *Environ. Sci. Eur.* 2018; 30: 13.
13. Hale RC, Seeley ME, La Guardia MJ, Mai L, Zeng EY. A global perspective on microplastics. *J. Geophys. Res. Oceans.* 2020; 125: e2018JC014719.
14. Hartmann N, Hüffer T, Thompson RC, Hassellöv M, Verschoor A, Daugaard AE, Rist S, Karlsson T, Brennholt N, Cole M, Herrling MP, Hess MC, Ivleva NP, Lusher AL, Wagner M. Are we speaking the same language? Recommendations for a definition and categorization framework for plastic debris. *Environ. Sci. Technol.* 2019; 53: 1039-1047.
15. Iannacone J, Principe F, Minaya D, Panduro G, Carhuapoma M, Alvariano L. Microplásticos en peces marinos de importancia económica en Lima, Perú. *Rev. de Investig. Vet. Peru.* 2021; 32: e20038.
16. Iannacone J, Principe F, Alvariano L, Minaya D, Panduro G, Ayala Y. MPs en el "cangrejo peludo" *Romaleon setosum* (Molina, 1782) (Cancridae) del Perú. *Rev. de Investig. Vet. del Peru.* 2022; 33: e22161.
17. Kolandhasamy P, Su L, Li J, Qu X, Jabeen K, Shi H. Adherence of microplastics to soft tissue of mussels: a novel way to uptake microplastics beyond ingestion. *Sci. Total Environ.* 2018; 610: 635-640.
18. Kleinschmidt JM, Janosik AM. Microplastics in Florida, United States: A case study of quantification and characterization with intertidal snails. *Front. Ecol. Evol.* 2021; 9: 645727.
19. Luna-Pacompea N, Juárez-Laguna F, Jaén-Rodríguez C, Alvariano L, Iannacone J. Metales pesados e imposex en *Thaisella chocolata* (Gasteropoda: Muricidae) en Matarani, Arequipa, Perú. *Rev. de Investig. Vet. del Peru.* 2022; 33: e23793.
20. Manullang CY. 2018. Current status and future prospect of marine pollution research in the Banda Sea. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 2018; 184: 012007.
21. Mendes ABA, Motta NAV, Lima GF, Autran LJ, Brazão SC, Sepúlveda-Fragoso V, Scaramello CBV, Graceli JB, Miranda-Alves L, Brito FCF. Evaluation of the effects produced by subacute tributyltin administration on vascular reactivity of male wistar rats. *Toxicology.* 2022; 465: 153067.
22. Mearns AJ, Bissell M, Morrison MA, Rempel-Hester MA, Courtney A, Rutherford N. Effects of pollution on marine organisms. *Water Environ. Res.* 2019; 91: 1229-1252.
23. Oberbeckmann S, Kreikemeyer B, Labrenz M. Environmental factors support the formation of specific bacterial assemblages on microplastics. *Front. Microbiol.* 2018; 8: 2709.
24. PRODUCE. Anuario Estadístico. Pesquero y Acuicola. Lima: Ministerio de la Producción; 2021. p. 188.
25. Ragagnin MN, Turra A. 2022. Imposex incidence in the sandy beach snail *Hastula cinerea* reveals continued and widespread tributyltin contamination after its international ban. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 2022; 49: 102118.
26. Rico JP, Orozco GJ, Rodríguez RO, Campos NH. Imposex en neogasterópodos del Caribe colombiano: un acercamiento al estudio de la contaminación de las aguas marino-costeras de la región. En: Ciencias del mar Una mirada desde la Universidad Nacional de Colombia. Hernando-Campos N, Acero-Pizarro A (eds.). San Andrés: Universidad Nacional de Colombia; 2019. p. 121-137.
27. Sadan NE, Akash PS, Sunil KPG. Biofouling impacts and toxicity of antifouling agents on marine environment: a qualitative study. *Sustainability Agri. Food. Environ. Res.* 2022; 10: 1-9.
28. Uc-Peraza RG, Castro IB, Fillmann G. An absurd scenario in 2021: Banned TBT-based antifouling products still available on the market. *Sci. Total Environ.* 2022; 805: 150377.
29. Uogintė I, Pleskytė S, Pauraitė J, Lujanienė G. Seasonal variation and complex analysis of microplastic distribution in different WWTP treatment stages in Lithuania. *Environ. Monit. Assess.* 2022; 194:829.
30. van Gesselten N, Bouwman H, Averbuj A. Imposex assessment and tributyltin levels in sediments along the Atlantic coast of South Africa. *Mar. Environ. Res.* 2018; 142: 32-39.
31. Villegas S, Iannacone J, Villegas C. Riesgo ambiental marino por pinturas anti-incrustantes a base de TBT (tributilestaño), sobre el "caracol plomo" *Thaisella chocolata* (Duclos, 1832) empleando al imposex como un bioindicador, en el puerto de Paita, Perú. *Rev. Luna Azul.* 2021; 53: 76-91.
32. Wang J, Li Y, Lu L, Zheng M, Zhang X, Tian H, Wang W, Ru S. Polystyrene microplastics cause tissue damages, sex-specific reproductive disruption and transgenerational effects in marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Environ. Pollut.* 2019; 254: 113024.



## Efecto de dos temperaturas de dilución sobre la calidad de semen en ganado cebuino del Trópico Peruano

Segura Portocarrero, G.T.<sup>1</sup> ; Quispe-Ccasa, H.A.<sup>4</sup> ; Saucedo-Uriarte, J.A.<sup>1</sup> ; Poclín Rojas, A.Y.<sup>1</sup>; Murga Valderrama, N.L.<sup>2</sup> ; Cortez Polanco, J.V.<sup>3</sup> ; Ampuero Trigoso, G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Animal, Estación Experimental Agraria El Porvenir, Instituto Nacional de Innovación Agraria, San Martín. <sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético, Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología, Facultad de Ingeniería Zootecnista Agronegocios y Biotecnología, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, Perú. <sup>3</sup>Laboratorio Catalina Genetic – Australia. <sup>4</sup>Estación Experimental Agraria San Bernardo - INIA, Madre de Dios, PROMEG Tropical.

E-mail: [glenytatty@gmail.com](mailto:glenytatty@gmail.com)

### Resumen

El toro es un factor de importancia genética y económica en un hato ganadero, ya que de este dependerán las próximas generaciones; por lo tanto, es esencial la evaluación de la calidad seminal y la criopreservación de su material genético. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de dos temperaturas de dilución sobre la calidad de semen de ganado cebuino del Trópico Peruano. Dos toros Gyr fueron colectados semanalmente mediante electroeyaculación. Las muestras se colocaron en baño maría a 34°C y se analizaron las características macroscópicas y microscópicas del semen. Solo los eyaculados con >60% de motilidad y <20% de anomalías fueron procesados, separándolos en dos tratamientos. El T1 consistió en predilución 1:1 a 34°C, luego de 30 minutos una dilución final agregando el dilutor a 34°C. El T2 consistió en predilución 1:1 a 34°C y a los 30 minutos de estabilización se llevó a refrigeración conjuntamente con el dilutor, para luego realizar la dilución final a 5°C. La calidad seminal fue analizada luego de 16 horas de refrigeración. El porcentaje de vitalidad en T1 (80,89%) fue mayor que en T2 (71,22%) ( $p<0,05$ ), la reacción positiva a la prueba hiposmótica fue mayor en T1 (71,11%) que en T2 (60%) ( $p<0,05$ ). La integridad acrosomal y los rasgos morfométricos no variaron según tratamientos. En conclusión, la dilución inicial y final a 34°C en toros Gyr influye positivamente sobre la calidad seminal antes de la congelación de pajillas de semen.

**Palabras clave:** toro, viabilidad espermática, criopreservación, morfología, congelación seminal.

## Effect of two dilution temperatures on the quality of semen in cattle from zebu in the Peruvian Tropic

**Abstract.** The bull is a factor of genetic and economic importance in cattle breed, since the next generations will depend on it; therefore, the evaluation of the seminal quality and the cryopreservation of its genetic material are essential. The aim of the study was to evaluate the effect of two dilution temperatures on the quality of semen from zebuine cattle from the Peruvian Tropics. The samples were placed in a water bath at 34°C and the macroscopic and microscopic characteristics of semen were analyzed. Only the ejaculates with >60% motility and <20% abnormalities were processed, separating them into two treatments. T1 consisted of a 1:1 predilution at 34°C, followed by a final dilution of 30 minutes by adding the dilutor at 34°C. T2 consisted of a 1:1 predilution at 34°C and after 30 minutes of stabilization, refrigeration was carried out together with the dilutor, in order to carry out the final dilution at 5°C. The seminal quality was analyzed after 16 hours of refrigeration. The percentage of vitality in T1 (80.89%) was greater than in T2 (71.22%) ( $p<0.05$ ), the positive reaction to the hypoosmotic problem was greater in T1 (71.11%) than in T2 (60%) ( $p<0.05$ ). Acrosomal integrity and morphometric features did not vary according to treatments. In conclusion, the initial and final dilution at 34°C in Gyr bulls positively influences the semen quality before the freezing of semen packets.

**Key words:** bull, sperm viability, cryopreservation, morphology, seminal freezing

## INTRODUCCIÓN

A nivel mundial existe una creciente demanda de alimentos de origen animal, por lo que los productores ganaderos están en constante búsqueda de la eficiencia en sus crianzas. La reproducción es una pieza fundamental para lograr estos objetivos, y es también fundamental el uso de biotecnologías que contribuyan al progreso genético (Davis y White 2020).

La criopreservación es una herramienta fundamental en el desarrollo de biotecnologías de reproducción asistida. El uso de semen criopreservado tiene múltiples beneficios, tales como: la conservación de material genético por tiempo indefinido, la facilidad de transporte, entre otros. Sin embargo, los valores de calidad espermática después de cada proceso, durante la congelación – descongelación, varía entre especies y hasta entre individuos de la misma especie, lo que dificulta la aplicación de una metodología estandarizada para las etapas de dilución, centrifugación, resuspensión del sedimento con el medio de congelación, empaque, congelación y descongelación de semen (Yáñez-Ortiz et al. 2022). La criopreservación permite tener a disponibilidad el espermatozoide de un reproductor para la fertilización; sin embargo, la capacidad de fertilización de los espermatozoides sometidos a congelación – descongelación, está comprometido debido a alteraciones estructurales y fisiológicas. Sin embargo, aunque las alteraciones a las que son sometidos los espermatozoides, como la criopreservación, son capaces de disminuir viabilidad, la dilución podría mejorar la adaptabilidad, buscando enfoques que compensen el líquido seminal (Medeiros et al. 2002).

La etiología de las alteraciones del espermatozoide puede representar una combinación de factores tales como: la fragilidad heredada para resistir la criopreservación y la dilución del semen. Aunque el primer factor es difícil de abordar, se pueden buscar enfoques que compensen la dilución del líquido seminal. El dilutor juega un rol fundamental en la provisión de condiciones del medio, a través de sus componentes bioquímicos y físicos, como la temperatura, para realizar un adecuado proceso de refrigeración y criopreservación (Santos et al. 2018).

Existen dos etapas previas antes del almacenamiento del semen procesado: la refrigeración y la criopreservación. La refrigeración del semen diluido consiste en el enfriamiento durante al menos 2 a 3 horas, a una temperatura de 5°C antes de ser congelado (Baiee et al. 2018).

La dilución del semen puede ser de un solo paso (semen + dilutor total), de dos pasos (semen + dilutor 1:1; dilución 1:1 + dilutor total) o de hasta tres pasos (semen + dilutor en 1:1; dilución 1:1 + mitad de la cantidad de dilutor total; semen diluido + dilutor restante) de manera gradual y la temperatura varía conjuntamente. El método de un solo paso de dilución usualmente se puede realizar a temperatura ambiente, pero las diluciones de dos o tres pasos, se llevan a cabo a 4 - 5°C o 34°C (Almeida et al. 2015). En semen porcino, Soler et al. (2020), sostienen que es frecuente realizar la dilución seminal en dos pasos, utilizando una dilución isotérmica (aproximadamente 32°C) o hipotérmica (temperatura ambiente 21 - 22°C), y no encontró diferencias entre ambos métodos, pero recomienda el uso de una dilución hipotérmica de manera

segura en sementales para inseminación artificial (IA). El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de dos temperaturas de dilución sobre la calidad de semen en ganado cebuino en el Trópico Peruano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Animales de estudio.** Se trabajó con dos toros adultos de la raza Gyr de 7 y 9 años. Cada macho reproductor contaba con un box individual y su alimentación se basó en pasto de corte (Maralfalfa y King Grass morado) en una cantidad diaria de 10% de su peso vivo y 2 Kg de alimento concentrado, brindados diariamente a las 10:00 am y 4:00 pm.

**Colección de semen.** Se recolectó un total de 10 eyaculados obtenidos cada 15 días por el método de electroeyaculación, los cuales fueron trasladados al Laboratorio de Biotecnología Animal – EEA El Porvenir – INIA – San Martín, en un tiempo máximo de 2 minutos. Las muestras se colocaron en baño maría a 34°C y se realizaron las evaluaciones macroscópicas mediante observación directa como: volumen, consistencia, color y olor; y microscópicas: motilidad masal (MM) (0-5) se evaluó mediante una valoración subjetiva del movimiento masivo de los espermatozoides según Evans y Maxwell (1990), motilidad individual (MI) (0-100%) medida en base a la proporción de espermatozoides progresivamente móviles, concentración ( $>400 \times 10^6$  spz mL<sup>-1</sup>) medida por un Fotómetro (marca: MINITUBE; modelo Photometer SDM 1 Bovine). Solo se procesaron eyaculados con  $>60\%$  de motilidad individual y  $<20\%$  de anomalías evaluado mediante la metodología descrita por Evans y Maxwell (1990).

**Dilución.** Se preparó el dilutor (OptiXcell) siguiendo las indicaciones del envase para colocarlo en baño maría a 34°C. El eyaculado que cumplió con los parámetros de evaluación fue separado en dos tubos con volúmenes homogéneos, clasificándolos en dos tratamientos: el Tratamiento 1 (T1) consistió en una pre dilución o dilución inicial 1:1 a una temperatura de 34°C, luego de 30 minutos de incubación se realizó una dilución final con un dilutor temperado a 34°C; mientras que, el Tratamiento 2 (T2) consistió en una pre dilución 1:1 a 34°C, luego de 30 minutos de incubación el semen pre diluido fue puesto a temperatura ambiente por 10 minutos conjuntamente con el recipiente del dilutor restante, posteriormente el semen pre diluido y el dilutor restante fueron puestos de manera individual en refrigeración. Después de que el semen pre diluido y el dilutor restante llegaron a los 5°C, se realizó la dilución final. Luego de 16 horas de refrigeración se analizó la vitalidad, funcionalidad de membrana, integridad acrosomal y morfología.

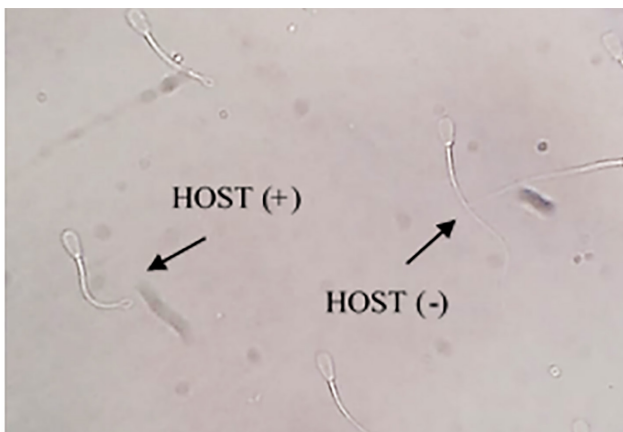
**Vitalidad.** Después de las 16 horas de refrigeración, se evaluó la vitalidad mediante tinción Eosina-Nigrosina de Agarwal et al. (2016), con algunas modificaciones. Brevemente, se colocó una lámina portaobjetos en una platina térmica (37°C), en la cual se depositó 5 µL de la muestra, para luego agregar 5 µL de solución Eosina 5% (Sigma-Aldrich, USA), homogenizar y posteriormente agregar 5 µL de solución Nigrosina 10%. Se homogenizó la muestra con las tinciones, se realizó el frotis y se dejaron

secar a temperatura ambiente. Los frotis secos se observaron en microscopio de contraste de fases con objetivo de 40x, para contabilizar aleatoriamente al menos 200 células, de las cuales, los espermatozoides de color blanco estaban vivos y los espermatozoides de color púrpura estaban muertos (Figura 1).



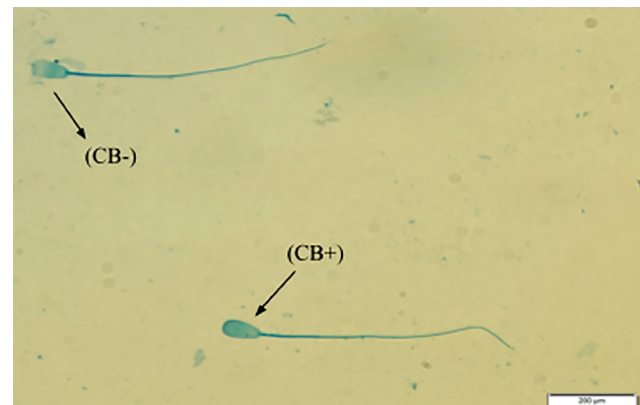
**Figura 1.** Captura de campo de espermatozoides bovinos con tinción Eosina-Nigrosina para evaluación de vitalidad (40x).

**Prueba hipoosmótica (HOST).** Se utilizó la prueba hipoosmótica de Jeyendran et al. (1984) con algunas modificaciones. Se preparó una solución de 50 mOsm L<sup>-1</sup> con 0,1225 g de D-fructosa y 0,225 g de Citrato de Sodio para 50 mL de agua bidestilada. En baño maría a 37°C se precalentaron dos microtubos con 100 µL de solución hipoosmótica a la cual se agregó 25 µL de muestra de cada tratamiento de manera individual. Se incubaron por 5 minutos y se agregó 31 µL de solución hipoosmótica formulada (1 mL de solución hipoosmótica + 3 µL de formaldehído 40%) en cada tubo, con la finalidad de detener la reacción. Para la evaluación, sobre una lámina porta objetos se depositó 5 µL de muestra, y cubierto con lámina cubre objetos se observó en microscopio de contraste de fases con objetivo de 40x. Los espermatozoides se clasificaron como: una adecuada función osmótica de la membrana espermática produce enrollamiento de la cola de variable intensidad (HOST+), en cambio, una membrana defectuosa no genera ninguna respuesta a la solución hipoosmótica ni enrollamiento de la cola (HOST-) (Jeyerand et al. 1984) (Figura 2).



**Figura 2.** Captura de campo de espermatozoides bovinos sometidos a prueba hipoosmótica para evaluación de la funcionalidad de membrana (40x).

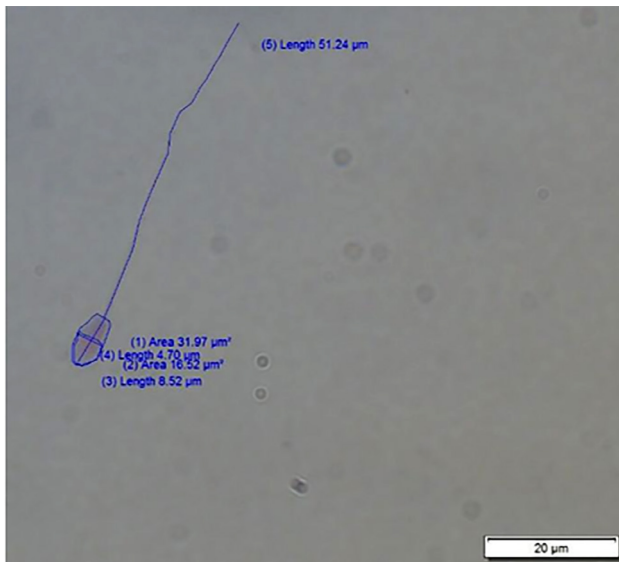
**Integridad acrosomal.** Se evaluó mediante una tinción con Coomassie Blue 0,22% (Fumuso et al., 2014), para lo cual se utilizó como base agua destilada (20 mL) con Brilliant Blue para Coomassie G250 (0,11 g), metanol (25 mL) y ácido acético 99% (5 mL). Se utilizaron 10 µL de muestra para preparar un frotis y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente los frotis secos fueron sumergidos en formaldehído a 4% en PBS por 15 minutos para su fijación y fueron lavados en PBS, con cinco inmersiones de un segundo cada una. Los frotis se colocaron verticalmente para eliminar el exceso de PBS para luego sumergirse horizontalmente en solución Coomassie Blue 0,22% durante 5 minutos. Finalmente, se dejó escurrir el exceso de tinción y se lavaron por inmersión en agua destilada (5 inmersiones de 1 minuto cada una) y secadas al ambiente. Los frotis secos fueron observados a 100x con aceite de inmersión en un microscopio de campo claro, para clasificar los espermatozoides con coloración azul del acrosoma o estructura acrosomal íntegra (CB+), o coloración blanca del acrosoma o acrosoma dañado (CB-), cuantificando no menos de 100 espermatozoides por cada muestra (Figura 3).



**Figura 3.** Captura de campo de espermatozoides bovinos teñidos con Coomassie Blue 0,22% para análisis de integridad acrosomal (100x).

**Morfología.** Se realizó un frotis de cada tratamiento, que se secaron a temperatura ambiente. Posteriormente, se utilizó un kit para diferenciación celular Hemacolor® de acuerdo a instrucciones del fabricante. Brevemente, se realizaron cinco inmersiones de 1 s cada una en la Solución I (fijación), tres inmersiones de 1 segundo cada una en la Solución II (eosina), seis inmersiones de 1 segundo cada una en la Solución III (azur) y dos inmersiones de 10 segundos cada una en la Solución de Lavado (tampón pH 7,2). Finalmente, se dejaron drenar verticalmente y se secaron al ambiente, para luego ser analizados en microscopio de campo claro (OLYMPUS BX53, Tokio, Japón), equipado con cámara (OLYMPUS U-TV0.63XC, Tokio, Japón), objetivo de 100x y aceite de inmersión. Se midieron manualmente los espermatozoides utilizando las herramientas del software CellSens de OLYMPUS, considerando mediciones del largo de cabeza, ancho de cabeza, área de cabeza y longitud de cola (Figura 4).



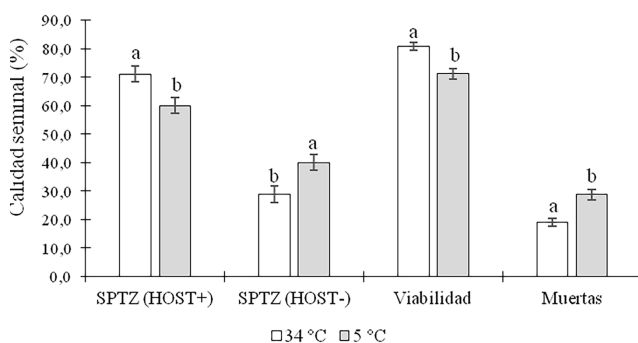


**Figura 4.** Captura de campo de espermatozoides bovinos teñidos con Hemacolor® para análisis morfológico y medición manual (100x).

**Análisis de datos.** El estudio desarrolló bajo un diseño completo al azar con dos tratamientos. Se analizó la distribución normal de la vitalidad, prueba hipoosmótica (HOST+), integridad acrosomal (CB+) y rasgos morfométricos (largo, ancho y área de cabeza, y longitud de cola) con la prueba de Shapiro-Wilk ( $p > 0,05$ ) y la homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene ( $p > 0,05$ ). Luego, se realizó un ANOVA y la prueba  $t$  ( $p < 0,05$ ) para comparación de medias en el programa SPSS v.26.0.

## RESULTADOS

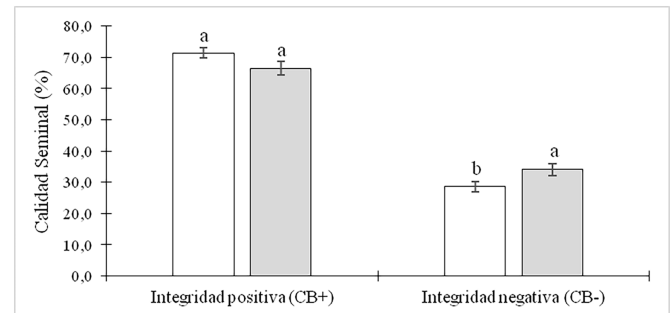
Luego de un periodo de refrigeración de 16 horas, se observó mayor valor de funcionalidad de membrana mediante la prueba hipoosmótica (HOST+) en T1 (dilución final a 34°C) respecto a T2 (dilución final a 5°C) ( $p < 0,05$ ), y la reacción negativa (HOST-) fue mayor en T2 (Figura 5), que correspondía a una primera dilución 1:1 a 34°C y una dilución final a 5°C.



**Figura 5.** Integridad funcional (HOST+) y estructural de membrana plasmática (vitalidad). Se presenta la media  $\pm$  error estándar de la media. Letras diferentes (a, b) en barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

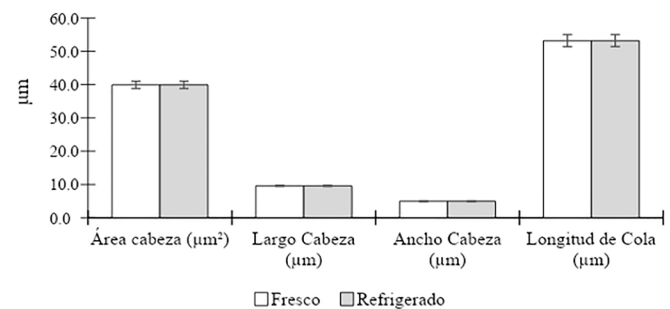
La prueba de integridad acrosomal se realizó con la finalidad de evidenciar algún daño en la matriz del acrosoma espermático, mediante la tinción de enzimas acrosomales

con Coomassie Blue. Según la Figura 6, no se encontró ningún efecto de la temperatura del medio de dilución final sobre el porcentaje de células con acrosoma íntegro (CB+).



**Figura 6.** Integridad acrosomal mediante tinción con Coomassie Blue (0,22 %). Se presenta la media  $\pm$  error estándar de la media. Letras diferentes (a, b) en barras indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En la Figura 7 se observan los valores de medición de algunos rasgos morfométricos en espermatozoides frescos y refrigerados por 16 horas, para determinar algún cambio morfológico durante el proceso. Sin embargo, no se encontró variación significativa de largo de cabeza, ancho de cabeza, área de cabeza ni longitud de cola ( $p < 0,05$ ), entre ambos grupos.



**Figura 7.** Rasgos morfométricos de espermatozoides frescos y refrigerados de bovino. Se presenta la media  $\pm$  error estándar de la media.

## DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el efecto de la temperatura del medio de dilución final, de 34°C (T1) y 5°C (T2), sobre la vitalidad, funcionalidad de membrana e integridad acrosomal de espermatozoides bovinos refrigerados después de 16 horas. La tinción eosina-nigrosina es capaz de diferenciar espermatozoides vivos de muertos (Agarwal et al. 2016) y la prueba hipoosmótica evalúa la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides, importante durante la fertilización (Kumaresan et al. 2017). La dilución final en un medio a 34°C fue capaz de conservar la calidad de los espermatozoides, evidenciando una mayor tasa de espermatozoides con reacción HOST+ (71,11  $\pm$  2,78%) y porcentaje de vivos (80,89  $\pm$  1,45%), respecto a un medio a 5°C (60  $\pm$  2,80% y 71,22  $\pm$  1,93%, respectivamente) (Figura 5). No se encontró diferencias en el porcentaje de células con acrosoma íntegro (media de 68,92  $\pm$  1,40%), evidenciado por la reacción positiva a Coomassie Blue (CB+), entre ambos medios de dilución. Si bien ambos grupos fueron sometidos a una primera dilución en un medio isotérmico (34°C), el efecto diferenciado de la dilución

final en la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática podría deberse al choque de frío, ya que T1 y T2 fueron refrigerados en una misma temperatura y tiempo. El enfriamiento permite que la membrana de los espermatozoides, así como la de sus orgánulos, se adapte a los cambios estructurales por las transiciones de fase lipídica que ocurrirán durante el ciclo de criopreservación (Watson 1995, Medrano et al. 2012). En T1 los espermatozoides fueron sometidos a una dilución isotérmica antes de almacenarse en refrigeración, por lo que tuvieron la oportunidad de adaptar la estructura de su membrana y función metabólica en el medio de dilución final, conforme descendía la temperatura. En cambio, en T2 no se da un tiempo de adaptación porque el dilutor final ya se encontraba a 5°C, entonces el choque de frío pudo haber lesionado la estructura y función de la membrana (en consecuencia, hubo mayor tasa de penetración de eosina al citoplasma y menor reacción al medio hipoosmótico). La criolesión en la criopreservación se debe al cambio de temperatura y a la formación-disolución de hielo, y sus consecuencias, durante el enfriamiento y calentamiento (choque de frío, choque térmico e incluso choque osmótico) (Watson 1995). Sin embargo, existe la teoría de que la capacidad de adaptación al enfriamiento podría ser variable según la fluidez de membrana plasmática de cada especie, de cada macho y de la heterogeneidad de la población de espermatozoides, haciendo a algunos más criopreservables que otros (Watson 1995, Medrano et al. 2012).

Según López et al. (2012), se pueden realizar dos tipos de dilución en semen porcino, en función a la temperatura de dilución. Este autor comparó una dilución final isotérmica (29,3°C) y una dilución final hipotérmica (22,7°C), y no encontró diferencias de ambos medios en la integridad de membrana por tinción eosina-nigrosina e integridad acrosomal. En esta investigación se comparó la dilución final a 34°C y 5°C, y se obtuvo valores similares de vitalidad e integridad acrosomal que lo reportado por López et al. (2012), pero con diferencias significativas. Por otra parte, los reportes de Soler et al. (2020) tampoco muestran diferencias en los parámetros de calidad seminal de verracos entre la dilución isotérmica (32°C) y dilución hipotérmica (21 - 22°C o temperatura ambiente); por lo tanto, la dilución a temperatura ambiente podría tener ventajas como evitar el precalentamiento del diluyente, optimizando el tiempo y recursos respecto a la conservación de medios atemperados a 34 - 37°C. Sin embargo, un medio hipotérmico de 5°C podría impactar negativamente en los espermatozoides, sugiriendo que esta temperatura pudo haber sobrepasado su nivel de tolerancia térmica, provocando choque por frío. En espermatozoides porcinos, el choque de frío con 0, 5, 10 y 15°C por 10 minutos, es capaz de reducir la motilidad y alterar la morfología acrosomal (Pursel et al. 1972). A nivel ultraestructural, la dilución y almacenamiento isotérmico (35°C) por 2 horas, en espermatozoides carneros, no provocó cambios significativos en el acrosoma, aunque sí una pérdida de material mitocondrial en la pieza media. Pero en un medio hipotérmico (5°C) se observó hinchazón y vacuolización del acrosoma, formación de vesículas en la membrana acrosomal externa y pérdida de material mitocondrial. Además, aunque la refrigeración a 5°C por dos horas no afecta la tasa de preñez, un almacenamiento prolongado por 24 a 48 horas provocaría una caída dramática

de la fertilidad (Jones y Martin 1973). Chen (2017) sostiene que el acrosoma es una estructura de gran importancia y cualquier daño estructural podría alterar una adecuada fecundación. En este estudio no hubo diferencias en la tasa de integridad acrosomal (CB+) aunque el porcentaje fue mayor en T2. Coomassie Blue tiene afinidad por las enzimas del acrosoma, mostrando una coloración intensa en un acrosoma íntegro; por lo que, probablemente el choque térmico en la dilución final a 5°C provocó vacuolización de acrosoma y mayor porcentaje de CB- en T2. El tiempo de 16 horas de refrigeración podría haber hecho evidente el descenso de la calidad espermática, que no se observaría en periodos cortos de 1 a 2 horas de otros estudios.

Contrario a este estudio, un estudio de almacenamiento de epidídimos bovinos a 5°C y 20°C por 6 horas mostró similares porcentajes de motilidad, vitalidad y anomalías morfológicas; pero luego de la descongelación, la vitalidad fue mayor en 5°C y la funcionalidad de membrana fue mayor en 20°C (Valverde-Peralta et al. 2018) En toros Brangus se encontró un mayor vigor espermático al refrigerar semen diluido en yema de huevo a 5°C que a 15°C (Rodrigues y Valenzuela 2019) Aunque es importante valorar un procedimiento viable en condiciones de campo, este no debe comprometer la capacidad fecundante del espermatozoide luego de la conservación. La conservación de la capacidad fecundante del semen durante la dilución, refrigeración y congelación, es un factor esencial para garantizar el éxito en los procesos biotecnológicos como Inseminación Artificial, Multiovlulación y transferencia de embriones, producción de embriones in vitro (Jones y Martin 1973). La refrigeración con una curva de descenso y medios adecuados puede conservar la calidad de los espermatozoides durante menos de 16 horas, debido a la menor actividad metabólica y menor tasa de crecimiento microbiano (Nichi et al. 2007, Ribeiro et al. 2014).

Se analizó el efecto del proceso de enfriamiento sobre la morfología espermática, pero no hubo diferencias en las mediciones de largo, ancho y área de cabeza ni longitud de cola, entre espermatozoides frescos y luego de la refrigeración. En la criopreservación de espermatozoides se debe controlar la temperatura de dilución, ya que se pueden generar consecuencias negativas durante el enfriamiento y la congelación. Los daños pueden causar anomalías en la cabeza, pieza media y cola del espermatozoide (El-Bahrawy et al. 2017, Gruhot et al. 2019). En este estudio se midieron dimensiones morfométricas de espermatozoides frescos y refrigerados a 5°C, lo que podría no haber sido un desafío suficiente para generación alteraciones en el tamaño de la cabeza. La criopreservación generó menor longitud, ancho, área y perímetro de cabeza de espermatozoides de carnero (Choquepuma et al. 2017), sin embargo, no modificó significativamente las dimensiones de espermatozoides caprinos (Hernandez-Corredor et al. 2021). Probablemente una mayor variación morfométrica sería observada luego de la descongelación de espermatozoides bovinos.

## CONCLUSIÓN

La dilución inicial y final a 34°C antes de la refrigeración y congelación de pajillas de semen, influye positivamente sobre la calidad seminal en toros de la raza Gyr;

en cambio, la dilución inicial a 34°C y final a 5°C tiene impactos negativos en la vitalidad y funcionalidad de membrana plasmática.

**Agradecimiento.** Se agradece al Proyecto “Mejoramiento de la disponibilidad y acceso del material genético mediante el uso de técnicas de biotecnología reproductiva en ganado bovino tropical en las regiones de San Martín, Loreto y Ucayali” – PROMEG TROPICAL con CUI 2338934, del Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA.

## ORCID

Segura Portocarrero, G.T.  <https://orcid.org/0000-0001-5404-0321>

Quispe-Ccasa, H.A.  <https://orcid.org/0000-0003-3146-5372>

Saucedo-Urriarte, J.A.  <https://orcid.org/0000-0003-2756-6402>

Murga Valderrama, N.L.  <https://orcid.org/0000-0002-1473-9055>

Cortez Polanco, J.V.  <https://orcid.org/0000-0001-8970-6875>

## REFERENCIAS

- Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Eosin-Nigrosin Staining Procedure. In *Andrological Evaluation of Male Infertility: A Laboratory Guide*. 1st Ed. Springer Cham: Springer. USA. 2016; 73-77.
- Almeida MC, Moroni JL, Bernardi ML, Wentz I, Bortolozzo, FB. Impact of isothermic and bithermic dilution on quality of chilled boar sperm. *Anim. Reprod.* 2015; 12: 903-909.
- Baice FH, Wahid H, Rosnina Y, Ariff O, Yimer N, Jeber Z, Harighi F. Impact of *Eurycoma longifolia* extract on DNA integrity, lipid peroxidation and functional parameters in refrigerated and cryopreserved bull sperm. *Criobiol.* 2018; 80(2): 43-50.
- Chen B, Li S, Yan Y, Duan Y, Chang S, Wang H, Ji W, Wu X, Si W. Cryopreservation of cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) sperm with glycerol and ethylene glycol, and its effect on sperm-specific ion channels - CatSper and Hv1. *Theriogenology.* 2017; 104: 37-42.
- Choquepuma W, Ordóñez C, Quispe H, Cucho H. Efecto de la congelación en los parámetros morfométricos del espermatozoide del carneiro. *Sperm.* 2017; 7(1): 48-52.
- Davis TC, White RR. Breeding animals to feed people: The many roles of animal reproduction in ensuring global food security. *Theriogenology.* 2020; 150: 27-33.
- El-Bahrawy K, Rateb S, Khalifa M, Monaco D, Lacalandra G. Physical and kinematic properties of cryopreserved camel sperm after elimination of semen viscosity by different techniques. *Anim. Reprod. Sci.* 2017; 187: 100-108.
- Evans G, Maxwell WMC. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza: *Ed Acribia*. 1990; 204 p.
- Gruhot T, Gray K, Brown V, Huang Y, Kachman SD, Spangler ML, Mote B. Genetic relationships among sperm quality traits of Duroc boars collected during the summer season. *Anim. Reprod. Sci.* 2019; 206: 85-92.
- Hernandez-Corredor L, Rubio Parada JA, Quintero Moreno A. Efecto de criopreservación sobre la morfometría de la cabeza espermática en semen de caprinos. *Rev. Investig. Vet. Perú.* 2021; 30(1): 27-33.
- Jeyendran R, Van der ven H, Perez-Pelaez M, Crabo B, Zaneveld L. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 1984; 70: 219-228.
- Jones RC, Martin ICA. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5 C on the ultrastructure of ram spermatozoa. *Reproduction.* 1973; 35(2): 311-320.
- Kumaresan A, Johannisson A, Al-Essawe EM, Morrell JM. Sperm viability, reactive oxygen species, and DNA fragmentation index combined can discriminate between above- and below-average fertility bulls. *J. Dairy Sci.* 2017; 100(7): 5824-5836.
- López Rodríguez A, Rijsselaere T, Vyt P, Van Soom A, Maes D. Effect of dilution temperature on boar semen quality. *Reprod. Domest. Anim.* 2012; 47(5): e63-e66.
- Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology.* 2002; 57(1): 327-344.
- Medrano A, Watson PF, Holt WV. Investigation of pig sperm plasma membrane reorganization using progesterone-albumin-fluorescein probes. *Asian Pac. J. Reprod.* 2012; 1: 27-33.
- Nichi M, Goovaerts IGF, Cortada CNM, Barnabe VH, De Clercq JBP, Bols PEJ. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34°C. *Theriogenol.* 2007; 67(2): 334-340.
- Pursel VG, Johnson LA, Rampacek GB. Acrosome Morphology of Boar Spermatozoa Incubated before Cold Shock. *J. Anim. Sci.* 1972; 34(2): 278-283.
- Ribeiro-Peres A, Munita-Barbosa L, Yumikanazawa M, Mello-Martins Mi, Ferreira De SF. Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Arch. Med. Vet.* 2014; 46: 31-38.
- Rodrigues MP, Valenzuela MS. Efecto del diluyente, temperatura y tiempo de refrigeración en la calidad y fertilidad de muestra seminal de bovinos. *Rev. Cient. Est. Investig.* 2019; 8: 203-204.
- Santos M, Soares F, Moreira M, Beirão J. Evaluation of different extenders for cold storage of meager semen (*Argyrosomus regius*). *Aquac. Res.* 2018; 49(8): 2723-2731.
- Soler-Llorens P, Mendoza N, Miguel J, Falceto MV, Mitjana O, Ausejo R. Insemination of sows with seminal doses prepared by a two-step hypothermic dilution does not impair the reproductive performance at farm. *Reprod. Domest. Anim.* 2020; 55(9): 1202-1209.

23. Valverde-Peralta EE, Argudo-Garzón DE, Bueno-León HP, Quintero-Moreno A, Galarza-Lucero DA. Efecto de la temperatura de almacenamiento de epidídimos de toro sobre la calidad espermática de semen criopreservado. *Rev. Cient. FCV-LUZ*. 2018; 28(6): 454-460.
24. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev*. 1995; 7(4): 871.
25. Yáñez-Ortiz I, Catalán J, Rodríguez-Gil JE, Miró J, Yeste M. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 2022; 246: 106904.

Asociación Cooperadora

**de la Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad  
Nacional del Nordeste**

Personería Jurídica Nº 647/92 y 912/00

Sargento Cabral 2139

3400 Corrientes, Argentina

La Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE fue constituida el 10 de diciembre del año 1991 como entidad de bien público, con el objeto de promover y coadyuvar las actividades científicas, educativas y culturales relacionadas con las Ciencias Veterinarias. En tal sentido, implementa acciones para colaborar con la enseñanza, extensión, actualización y difusión científica que realiza dicha casa de estudios.

*Beneficios que brinda a sus asociados:*

- Fotocopias con descuentos especiales en la Fotocopiadora *Copias.com* que funciona dentro del predio de la Facultad de Ciencias Veterinarias.
- Descuentos para la adquisición de libros de distintas editoriales.
- Descuentos especiales en otros rubros.

Página Web [www.vet.unne.edu.ar](http://www.vet.unne.edu.ar) • E-mail: [cooperadora@vet.unne.edu.ar](mailto:cooperadora@vet.unne.edu.ar)

Tel. +54 (379) 4423317/4423507 interno 186



## Fructooligosacáridos, extracto de *Cynara scolymus* y cloruro de colina como suplementos dietario en la crianza de pollos parrilleros (*Gallus gallus*)

Ocaña, J.G.<sup>1</sup>; Mazzuca Pizetti, A.J.<sup>2</sup>; Sarmiento, R.O.<sup>2</sup>; Sánchez Negrette, O.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Producción de Aves y Especies No Tradicionales, Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Universidad Católica de Salta, Consejo de Investigación y Desarrollo, Campus Castañares S/N, Salta CP: 4400, Argentina. <sup>2</sup>Cátedra de Inmunología, Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias, Universidad Católica de Salta, Consejo de Investigación y Desarrollo, Campus Castañares S/N, Salta CP: 4400, Argentina. E-mail: [osanchez@ucasal.edu.ar](mailto:osanchez@ucasal.edu.ar)

### Resumen

Los prebióticos son definidos como ingredientes alimentarios no digeribles que producen efectos beneficiosos al huésped. En este trabajo se suplementó el alimento balanceado de pollos parrilleros con dos prebióticos diferentes: fructooligosacárido (FOS) y extracto seco de alcachofa (*Cynara scolymus* L) más cloruro de Colina (EA+Colina) a fin de evaluar sus efectos. Se trabajó con 198 pollos parrilleros recién nacidos de la línea *cobb*. Para los ensayos se separaron en 3 lotes, 2 experimentales y un control (L3). Un grupo experimental se suplementó con FOS (L1) y el otro con EA + Colina (L2). Se llevaron registros diarios de mortalidad. A los 7 y 14 días de crianza, 6 animales de cada grupo elegidos al azar fueron faenados. Los restantes animales se sacrificaron a los 45 días de edad. Se obtuvo el peso corporal (PC) individual antes de la faena. En las faenas de los 14 y 45 días, se extrajeron y pesaron la bolsa de Fabricio y el bazo. Durante la última faena, se seleccionaron al azar de 6 a 8 pollos de cada grupo para la obtención de plasmas, a fin de cuantificar proteínas totales, electroforesis de proteínas y las transaminasas AST y ALT. Los datos se presentaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Se aplicó el test ANOVA de un factor y la prueba de comparación múltiple de Tukey a un nivel de confianza de  $p < 0,05$ , utilizando el programa Graph Pad Prism 8.0.1. Con respecto al grupo control se observó que los dos prebióticos mejoraron la crianza de las aves, aunque no en valores significativos. Se necesita más investigaciones a fin de verificar el beneficio del uso de los prebióticos FOS y EA + Colina, para mejorar las características del pollo parrillero y lograr el máximo rendimiento.

**Palabras clave:** Pollos parrilleros, prebióticos, proteínas, peso corporal, transaminasas

## Fructooligosaccharide, *Cynara scolymus* dry extract and choline chloride as dietary supplements in broilers chickens breeding (*Gallus gallus*)

**Abstract.** Prebiotics are defined as non-digestible food ingredients that produce beneficial effects to the host. In this study, the balanced food of broiler chickens was supplemented for two different prebiotics: Fructooligosaccharide (FOS) and *Cynara scolymus* (Artichoke) dry extract plus Choline chloride (EA + Choline) in order to evaluate their effects. We worked with 198 newborn broiler chickens of the *cobb* line. For the trials, they were divided into three groups: two experimental and one control (L3). One experimental group was supplemented with FOS (L1) and the other with (L2). Daily mortality records were kept. At 7 and 14 days of breeding, 6 randomly selected animals from each group were slaughtered. The remaining animals were sacrificed at 45 days of age. Individual body weight (PC) was obtained before slaughter. In the slaughter of 14 and 45 days, the bursa of Fabricio and the spleen were extracted and weighed. During the last slaughter, 6 to 8 chickens from each group were randomly selected to obtain plasmas, in order to quantify

total proteins, protein electrophoresis and AST and ALT transaminases. Data presented as mean  $\pm$  S.D, were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison test. Data analysis was performed using Graph Pad Prism 8.0.1 and results were declared significant at  $p < 0.05$ . Regarding the control group, it was observed that the two prebiotics improved the breeding of the birds, although not in significant values. More research is necessary in order to verify the benefit of the use of the prebiotics FOS and EA + Choline, to improve the characteristics of the broiler chicken and achieve maximum performance.

**Key words:** broilers chickens, prebiotics, proteins, body weight, aminotransferase

## INTRODUCCIÓN

Actualmente el consumo de productos de granja, tales como los pollos parrilleros, ha crecido notablemente como una alternativa a la carne roja, ya sea por los antecedentes de ésta de causar patologías, como por el precio en relación especialmente a los pollos. Esto último es debido fundamentalmente a la selección genética de aves con el fin de obtener un producto cárnico en el menor tiempo posible y por ende la reducción de recursos usado en su producción (Sánchez Quinche et al. 2019). Sin embargo, los métodos de manejo intensivos causan a las aves desbalances bacterianos entéricos que llevan a una insuficiente conversión de los alimentos provocando una disminución en la respuesta zootécnica. Es por esto que el uso de antibióticos como promotores de crecimiento ha sido la piedra angular en la industria avícola. Sin embargo, la generación de cepas de patógenos resistentes a antibióticos y la posibilidad de acumular residuos en los productos animales y el ambiente, hizo que el uso rutinario de antibióticos en animales sea menos común (Jin et al. 1998, Mountzouris et al. 2010, Beyene 2016).

Es necesario buscar alternativas para prevenir y tratar infecciones bacterianas comunes a los animales de cría en confinamiento. Numerosos estudios in vivo e in vitro han demostrado que la microbiota comensal intestinal inhibe patógenos, y que su disturbio puede aumentar la susceptibilidad a la infección (Haghighi et al. 2006). Investigaciones realizadas con humanos y modelos murinos han mostrado que el consumo de prebióticos, evita la adhesión de bacterias patógenas a células intestinales; mejora la tolerancia a la glucosa, reduce la esteatosis hepática, disminuye la trigliceridemia, la colesterolemia y junto con el aumento de los niveles de HDL, previene la aterosclerosis y el aumento de peso; además inhibe la respuesta pro-inflamatoria, reduciendo los niveles de Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  e Interferón- $\gamma$  (Falony et al. 2009, Holscher et al. 2015, Sharma et al. 2018, Piotrowski et al. 2019).

El concepto de prebiótico surge por primera vez en 1995 como "ingrediente alimentario no digerible que produce efectos beneficiosos al huésped estimulando el crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de bacterias residentes en el colón". Actualmente en un concepto más amplio se definen como "sustratos que son selectivamente utilizados por microorganismos del huésped confiriendo beneficios a la salud" (Gibson et al. 2017). La inulina es el nombre con el que se designa a una familia de glúcidos complejos (polisacáridos), compuestos de cadenas moleculares de fructosa, que presenta la particularidad de ser muy heterogénea en su grado de polimerización.

Consiste de una cadena lineal de enlaces  $\beta$  (2-1) fructosil-fructosa que no pueden ser hidrolizados por enzimas de origen endógeno y permanecen sin modificación durante el recorrido por el intestino delgado, pero pueden ser hidrolizados y fermentados en su totalidad en el intestino grueso por la microflora, exhibiendo una función prebiótica ya que estimula el crecimiento de las *bifidobacterias* y, por consiguiente, pueden ser empleados en formulaciones de alimentos funcionales. El grado de polimerización (GP) de la inulina, así como la presencia de ramificaciones, son propiedades importantes ya que influyen en la funcionalidad de la mayoría de las inulinas. En la inulina de origen vegetal, las unidades de fructosas pueden variar desde algunas unidades hasta 70, lo que significa que la inulina es una mezcla de oligómeros y polímeros, definiéndose como un polifructano con GP mayor a 30 unidades. El GP más alto de origen vegetal ha sido encontrado en la alcachofa globo (*Cynara scolymus*), por encima de 200.

El fructano más destacado derivado de la inulina y de mayor uso es el fructooligosacárido (FOS), obtenido mediante hidrólisis enzimática de la inulina, y caracterizado por llegar a un GP menor a 10 unidades. Se ha señalado por algunos investigadores que los prebióticos de cadena corta, como los FOS, que contienen 2-8 enlaces por molécula de sacárido, son fermentados más rápidamente que los prebióticos de cadena larga, como la inulina, de 9 - 64 enlaces por molécula de sacárido (Muñoz Ohmen et al. 2012, Mensink et al. 2015, Lara-Fiallos et al. 2017).

En cuanto a la colina es una base de amonio cuaternario (2-hidroxietil trimetilamina), inicialmente incluida dentro del grupo de la vitamina B, aunque no puede ser considerada vitamina pues es sintetizada en el organismo. Es constituyente de lípidos complejos (fosfatidilcolina y esfingomielina) en membranas celulares y de acetilcolina, intermediario químico en el sistema nervioso. Dentro de sus funciones se destaca su capacidad como dadora de metilos, relacionada con la formación de metionina, que a su vez genera S-adenosilmetionina, principal agente de metilaciones (Blanco y Blanco 2016, Ramasamy et al. 2018). Esto último es muy importante en la función hepática en animales sometidos a sistemas de producción intensiva, donde la actividad hepática puede ser un factor limitante de la productividad.

La disminución de la actividad celular hepática conduce a un descenso de la fracción albúmina, que cuando es significativo, permite establecer las condiciones favorables para la instalación de la ascitis, por el descenso de la presión oncótica. En este sentido, es importante medir las concentraciones relativas de las fracciones proteicas del plasma como respuesta a hepatopatías o infecciones, como

así también determinar las actividades enzimáticas de las transaminasas hepáticas (Hasegawa et al. 2002).

La bolsa de Fabricio constituye un órgano linfóide primario muy importante en las aves. El peso de los órganos linfoides y la relación con el peso corporal, pueden ser utilizados para establecer la capacidad de respuesta inmune en pollos de engorde (Perozo Marín et al. 2004).

Por todo lo anterior, nos propusimos en este trabajo evaluar FOS y el extracto seco de *C. scolymus* L + cloruro de colina (EA + Colina) como suplemento dietario en la crianza de aves de corral.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización.** El ensayo se realizó en la Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias de la Universidad Católica de Salta, ubicada en la ciudad Capital, valle sub-andino localizado a 1220 ms.n.m. de la Provincia de Salta al noroeste de la República Argentina entre los paralelos 22° y 26° latitud sur y los meridianos de 62° y 68° longitud oeste. En esta zona el clima es subtropical serrano con estación seca (invierno).

Época el año. La crianza se realizó desde fines de junio hasta primeros días de agosto. Las temperaturas en invierno oscilan de -2 a 26°C.

**Prebióticos.** Se utilizaron dos prebióticos, uno compuesto por FOS y el otro compuesto por EA + Colina. La dosis suministrada fue de 0,025%, y se administraron durante toda la crianza.

**Aves y tratamientos experimentales.** Se trabajó con 198 pollos parrilleros recién nacidos de la línea *cobb*. Para los ensayos se separaron en 3 lotes, 2 experimentales: aves alimentadas con prebiótico FOS (grupo L1), y aves alimentadas con prebiótico compuesto por EA+ Colina (grupo L2) y, aves control (grupo L3).

**Recinto para aves.** Para alojar a las aves se construyó un galpón semi-abierto de 3 m x 6 m (18 m<sup>2</sup>) con paredes de mampostería de 1 metro de altura en ambos extremos y de 20 cm en laterales, en las cuales se sujetaron mallas metálicas de alambre tejido hasta el techo y se colocaron cortinas y plásticos; piso de tierra; el techo es de chapa aluminizada térmica y se colocó un cielorraso de plastillera para proteger los pollos de las temperaturas extremas. Las cortinas y plásticos se abrieron y cerraron de acuerdo a la temperatura ambiente. Las temperaturas empleadas fueron: 1° semana 30°C, 2° semana 28°C, 3° semana 26°C, 4° semana 24°C, 5° semana temperatura ambiente, ideal 21°C. Para brindar estas temperaturas se utilizaron estufas de cuarzo con 2 velas de 600W, las cuales se fueron alternando. También se utilizaron lámparas alógenas de 300W que se colocaron a 50 cm del piso, siendo levantadas a medida que los requerimientos térmicos de los animales disminuyeron.

Se suministró luz continua las dos primeras semanas, luego se trabajó con fotoperíodo natural. Durante todo el ensayo se permitió el consumo de alimento y agua *ad libitum*. En la primera semana se utilizó bebedero BB para la administración del agua, posteriormente bebederos auto-

máticos (planetarios), conectados a recipientes de 10 L que se encontraban en el interior del galpón. A todos los lotes se les administró el alimento adecuado para su edad (pre iniciador, iniciador y terminador) por medio de comederos tipo Tolva de 12 Kg. En el caso de los animales tratados, para asegurar el suministro homogéneo del producto, se realizó un pre mezcla de éste con 5 a 10 Kg de alimento balanceado y luego se incorporó a la mezcla con la totalidad de los kilos necesarios.

**Mediciones experimentales.** Peso corporal (PC): antes de la faena se pesaron las aves vivas previo ayuno de 12 horas. Las aves fueron pesadas individualmente, utilizando una balanza tipo reloj. Se llevaron registros diarios de mortalidad.

A los 7 y 14 días de crianza, 6 animales de cada grupo elegidos al azar fueron faenados. Los restantes animales se sacrificaron a los 45 días de edad.

**Obtención de muestras de sangre y órganos.** En la primera faena, a los 7 días no se extrajeron órganos, ni se tomaron muestras de sangre. En las faenas de los 14 y 45 días, se realizó la disección del animal, se extrajeron y pesaron la bolsa de Fabricio y el bazo mediante balanza electrónica de precisión (con sensibilidad de 0,01 g Denver Instrument). Durante la última faena, se seleccionaron al azar de 6 a 8 pollos de cada grupo para la obtención de plasmas, recolectando sangre en tubos que contenían ácido etilendiaminotetraacético como anticoagulante. Luego de centrifugar los tubos, se obtuvieron: 6 muestras de plasma del grupo L1, 8 del grupo L2 y 6 del grupo control L3.

**Determinación de Proteínas Plasmáticas.** Se determinó proteínas totales por método fotocolorimétrico de Biuret, en el cual los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ión cúprico, en medio alcalino, para dar un complejo color violeta con máximo de absorción a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra. La concentración de albúmina se determinó mediante la reacción específica de la albúmina con la forma aniónica de la 3,3',5,5'-tetrabromo cresolsulfon ftaleína (BCF), en medio tamponado a pH 3,8, registrándose un aumento de absorbancia con respecto al blanco a 625 nm, proporcional a la cantidad de albúmina presente en la muestra. Se utilizó un kit comercial (método de sistema Proti 2 de Wiener Laboratorios SAIC, Rosario, Santa Fe, Argentina). Se realizó electroforesis en soporte de acetato de celulosa (Cellogel) según la técnica descrita en Margni (1996). Luego las tiras se colorearon con una solución de Amidoshwartz, se eluyeron las bandas en ácido acético 80% y se leyó la absorbancia a 620 nm, obteniéndose los proteinogramas, con los valores relativos (%) de cada fracción proteica. Los valores absolutos (g dl<sup>-1</sup>) se calcularon relacionando el porcentaje de cada fracción con el dato de proteínas totales obtenido por fotocolorimetría.

**Transaminasas hepáticas.** La actividad de glutamato oxalacetato transaminasa (GOT) y glutamato piruvato transaminasa (GPT), alternativamente llamadas aspartato transaminasa (AST) y alanina transaminasa (ALT) respectivamente fueron determinadas siguiendo las instrucciones

del kit Transaminasas 200 de Wiener Laboratorios SAIC, Rosario, Santa Fe, Argentina. Se hicieron reaccionar 100  $\mu\text{L}$  de suero con 0,5 ml de reactivo A, el cual para la determinación de AST, contiene 100 mM de l-aspartato y 2 mM de  $\alpha$ -cetogluturato en buffer fosfatos 100 mM, pH 7,4, y para la determinación de ALT contiene 200 mM de dl-alanina y 2 mM de  $\alpha$ -cetogluturato en buffer fosfatos 100 mM, pH 7,4. A la mezcla se agregó 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Se incubó 30 minutos a 37°C y se agregó 0,5 ml de reactivo B que contiene, 1 mmol de 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNFH) en ácido clorhídrico 1 mol  $\text{L}^{-1}$ . Se continuó la incubación por 10 minutos más y se detuvo la reacción al agregar 5 ml del reactivo C, que contiene solución de hidróxido de sodio 4 mol  $\text{L}^{-1}$ . Luego se leyó la absorbancia a 505 nm. Los valores de actividad enzimática se dedujeron utilizando curvas de calibración previamente realizadas con el estándar provisto por el kit.

**Consideraciones éticas.** Las prácticas de manejo y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias de la Universidad Católica de Salta (RR 1075/12). La faena se realizó acorde a las directrices para el sacrificio de animales de la OIE dentro del código sanitario para animales terrestres.

**Análisis estadístico.** Los datos se presentaron como la media  $\pm$  desviación estándar. Los resultados del estudio fueron sometidos a análisis de la varianza con el test *one way* ANOVA, utilizando el programa GraphPad Prism 8.0.1. Se compararon los grupos tratados con el grupo control y las diferencias fueron establecidas mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey a un nivel de confianza de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

**PC de las aves con los diferentes suplementos a distintos días de faena.** Los PC de las aves ( $n = 6$ ) a los 7 días de vida, no mostraron diferencias significativas, siendo el promedio para L1 de 196,5 g  $\pm$  20,3 g para L2 de 188,20  $\pm$  22,1 g, para L3 de 205,16  $\pm$  11,0 g. A los 14 días de alimentación, los PC promedio de las aves ( $n=6$ ) fue de 437,83 g  $\pm$  56,0 g para el grupo L1, para L2 de 406,5 g  $\pm$  74,0 g y de 409,16  $\pm$  74,1 g para L3.

En la tercera faena se pesaron todas las aves, sin embargo, se observó que en los lotes hubo aves hembras, por error de sexado de la cabaña. En el grupo control hubo 5 hembras y en el grupo EA + Colina, 6 hembras. Se decidió promediar sólo los pesos de los machos. Los PC promedios de los machos obtenidos a los 45 días de vida en los distintos grupos se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1:** PC promedios de los pollos parrilleros obtenidos a los 45 días de vida en los distintos grupos.

Grupo (n)	Pesos en kg	P
L3 (45)	3,136 $\pm$ 0,294	-
L1 (53)	3,178 $\pm$ 0,266	0,78
L2 (43)	3,156 $\pm$ 0,359	0,95

p valor comparado al grupo "control" ( $p > 0,05$ ), no siendo significativo

**Peso de las bolsas de Fabricio y de los bazos.** La relación entre los PC y los pesos de las bolsas de Fabricio a los 14 días de vida, en los tres grupos de aves no presentó diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) como tampoco el peso de los bazos. A los 14 días el peso de las bolsas de Fabricio mostró un peso levemente superior en L1 que los otros grupos, siendo 0,93  $\pm$  0,12 g para L1, 0,79  $\pm$  0,26 g para L2 y 0,82  $\pm$  0,15 para L3; el peso de los bazos fue 0,26  $\pm$  0,09 g para L1, 0,29  $\pm$  0,11 g para L2 y 0,24  $\pm$  0,05 para L3.

A los 45 días de vida, ambos grupos tratados mostraron mayor peso de las bolsas de Fabricio con respecto al control: 4,45  $\pm$  1,22 g para L1, 4,90  $\pm$  1,48 para L2 y 4,22  $\pm$  1,4 para L3 y el peso de los bazos fue de 3,31  $\pm$  0,99 g para L1, 3,54  $\pm$  1,12 para L2 y 3,44  $\pm$  0,90 para L3, siendo en ambos órganos mayor el peso en L2 ( $p > 0,05$ ), no siendo significativo.

**Mortalidad.** Con respecto a la mortalidad, se registró una muerte al día 28 de crianza en el grupo L1, (1/66; 1,5%); en el grupo L2 al día 39 muere un pollo por muerte súbita y otros 3 al día 43, dos de los cuales con síntomas de ascitis (4/66; 6,6%); la mortalidad de los pollos del L3 fue de 3,03% (2/66), en éste grupo, las muertes de los pollos se registraron una en la primera semana y otra al día 39. Durante la primera semana de crianza ocurrieron tres muertes por accidente, un pollito en el grupo L2 y dos en el grupo L3. Es decir que, en la primera semana, el porcentaje de mortalidad para L1 y L3 es de 1,5% (1/66) y 0 para L2.

Los resultados de las proteínas plasmáticas se resumen en las Tabla 2, 3 y 4.

**Tabla 2:** Concentraciones plasmáticas de Proteínas Totales y Albúminas en los diferentes grupos de aves a los 45 días de vida.

Grupo (n)	Proteínas Totales (g $\text{dl}^{-1}$ )	p	Albúmina (g $\text{dl}^{-1}$ )	P	RAG
L 1 (6)	2,90 $\pm$ 0,40	0,88	1,57 $\pm$ 0,16	0,22	1,18
L 2 (8)	3,00 $\pm$ 0,33	0,58	1,34 $\pm$ 0,17	0,98	0,80
L 3 (6)	2,79 $\pm$ 0,45	-	1,31 $\pm$ 0,38	-	0,88

p valor comparado al grupo "Control" ( $p > 0,05$ ). RAG: relación albúmina/globulina.

FOS: fructooligosacárido. EA + Colina: extracto seco de *Cynara scolymus* L + Colina

**Proteinograma.** De cada grupo de aves se obtuvieron 7 fracciones proteicas: pre-albúmina, albúmina, alfa-1-globulina, beta-1-globulina, beta-2-globulina, fibrinógeno y gamaglobulinas.



**Tabla 3:** Concentraciones de las fracciones proteicas (g dl<sup>-1</sup>).

Grupo pollos	Pre-albúmina	Albúmina	$\alpha$ -1-globulina	$\beta$ -1-globulina	$\beta$ -2-globulina	Fibrinógeno	$\gamma$ -globulinas
L1	0,45±0,18	0,78±0,43	0,32±0,21	0,14±0,28	0,10±0,07	0,27±0,22	0,39±0,17
L2	0,30±0,25	0,96±0,40	0,51±0,35	0,17±0,09	0,13±0,10	0,24±0,18	0,62±0,38
L3	0,31±0,18	0,88±0,25	0,35±0,22	0,32±0,17	0,11±0,17	0,18±0,25	0,72±0,39

Valores de p: no se observan diferencias significativas p>0,05

**Tabla 4:** Efecto de la inclusión de prebióticos en los valores de actividad de las enzimas hepáticas AST y ALT.

Tratamientos (n)	AST (UI/L)	p	ALT (UI/L)	p
Control (5)	95,8±49,0	-	10,2±4,6	-
FOS (6)	67,6±20,6	0,32	6,0±2,0	0,29
EA+ Colina (8)	97,2±24,2	0,99	10,2±5,5	0,99

UI L<sup>-1</sup>: Unidades Internacionales; p valor comparado al grupo Control (p>0,05)

AST: aspartato transaminasa y ALT: alanina transaminasa.

## DISCUSIÓN

Con respecto a los PC, no se demostró diferencia significativa (p>0,05) entre los grupos a la dosis administrada de prebióticos, en concordancia a lo reportado por Cheng et al. (2004), quienes demostraron que  $\beta$ -1,3-glucano utilizado hasta una concentración de 0,05% no produjo diferencias significativas en la ganancia de peso entre los tratamientos.

Si consideramos que las últimas muertes fueron dos días previos a la faena en el grupo L2, podemos considerar que en general fue menor a 5%, por lo que esta variable no fue influenciada por los tratamientos.

Los valores de proteínas plasmáticas hallados en los tres lotes se encuentran dentro de la media referencial normal de proteína para pollos de engorde al final del ciclo de producción (González et al. 2001, Koza et al. 2004). En la Tabla 2, se observó que la proteinemia de los lotes tratados con prebióticos fue mayor que en el lote control, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (p>0,05). La relación albúmina/globulina (RAG) fue menor en el L2, lo que consideramos es a expensas del aumento de globulinas pues comparados al control, el perfil electroforético mostró valores más altos de  $\alpha$ -globulina,  $\beta$ -globulina y fibrinógeno (Tabla 3). La fracción  $\alpha$ -globulina incluye las glicoproteínas: haptoglobina, ceruloplasmina,  $\alpha_2$ -macroglobulina y la transcortina, que es una proteína de transporte primario de corticosterona, consecuentemente necesaria en las infecciones o estrés (Campbell y Coles 1986) y conjuntamente con el fibrinógeno constituyen proteínas de fase aguda (González Fernández 2000). Estas elevaciones podrían estar acorde a un trabajo realizado en aves sometidas a estrés físico tratadas con el mismo prebiótico: EA Cynara + Colina, donde encontraron aumentadas la transcortina (Sandoval et al. 1999), y al igual que Díaz López et al. (2014), en dos líneas de pollo evaluadas a la edad de 42 días, expuestas a estrés calórico crónico a partir de los 21 días de edad, evidenciaron aumento de concentración de corticosterona plasmática. Si bien en este ensayo no se causó ningún tipo de estrés, podríamos suponer que estas aves, respondieron de esta forma gracias al prebiótico suministrado. La mejor relación albúmina/globulina

la tuvo L1. Por otra parte, muestra los menores valores de  $\gamma$ -globulinas presentando la fracción del fibrinógeno como la única elevada, lo que sugiere que los pollos que fueron suplementados con FOS habrían respondido exitosamente a procesos agudos, sin el aumento de las  $\gamma$ -globulinas. Esto estaría de acuerdo también con trabajos donde observaron que el suplemento con 0,025 y 0,05% de  $\beta$ -1,3-glucano aumentó la actividad quimiotáctica de los macrófagos de los pollos, potenciando la inmunidad innata, y concluyen que los glucanos podrían ser usados para activar diferentes efectos sobre la respuesta inmunitaria a diferentes patógenos (Cheng et al. 2004). Los polisacáridos tales como  $\alpha$  y  $\beta$  glucanos componentes de las levaduras, no solo interactúan directamente con células del sistema inmune, sino además son capaces de unirse a bacterias a fin de prevenir el ataque y colonización de patógenos en el tracto gastrointestinal (Kogan y Kocher 2007).

Nuestros resultados muestran valores numéricamente menores de AST y ALT en L1, pero no diferencia significativa (p>0,05), lo que asociado a las mayores concentraciones de albúmina y fibrinógeno indica una buena función hepática en éste grupo.

En un trabajo de revisión realizado por Zaker-Esteghamati et al. (2021), concluyen que la suplementación dietaria con extracto de *C. scolymus* en pollos parrilleros no demuestran diferencias significativas sobre la producción, características de la carcasa y de la carne, enzimas hepáticas y sobre la inmunidad, aun cuando hay trabajos que demuestran el amento de títulos de anticuerpos de Newcastle. Sin embargo, tampoco se reportan propiedades de efecto negativo en el uso del citado prebiótico.


## CONCLUSIÓN


Al relacionar los indicadores, tales como peso corporal alcanzado, peso de bolsa de Fabricio y del bazo, proteínas totales, fracciones proteicas, RAG, enzimas hepáticas, mortalidad, se concluye que los dos prebióticos mejoraron la crianza de las aves, aunque no en valores significativos. Sin embargo, dado que los prebióticos fueron usados a dosis recomendadas y en un número reducido de aves, donde la crianza es muy controlada, consideramos que sería necesario realizar ensayos con mayor número de aves, con diferentes dosis de prebiótico y en distintas épocas del año, lo que nos permitirá verificar el beneficio del uso de los prebióticos FOS y EA + Colina, para mejorar las características del pollo parrillero y lograr el máximo rendimiento.

**Agradecimientos.** Empresa BEDSON S.A por la donación de los prebióticos utilizados. Avícola SOFÍA por donación de las aves. Consejo de Investigaciones de la Universidad Católica de Salta por subsidiar el proyecto.

Agradecemos especialmente al Dr. Juan Manuel Alfaro por realizar los cálculos estadísticos.

## ORCID

Mazzuca, A.J.  <http://orcid.org/0000-0002-8630-5440>

Sánchez Negrette, O.  <http://orcid.org/0000-0002-3178-2557>

## REFERENCIAS

- Blanco A, Blanco G. Química Biológica. 10ª ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina: Editorial El Ateneo; 2016. p. 607-608.
- Beyene T. Veterinary drug residues in food-animal products: its risk factors and potential effects on public health. *J. Vet. Sci. Technol.* 2016; 7(1): 285-291.
- Campbell TW, Coles EH. Avian clinical pathology, In: Coles EH. Veterinary clinical pathology. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1986. p. 279-301.
- Cheng YH, Lee DN, Wen CM, Weng CF. Effects of  $\beta$ -glucan supplementation on lymphocyte proliferation, macrophage chemotaxis and specific immune response in broilers. *Asian Aust. J. Anim Sci.* 2004; 17(8): 1145-1149.
- Díaz López EA, Uribe Velásquez LF, Narváez Solarte W. Bioquímica sanguínea y concentración plasmática de corticosterona en pollo de engorde bajo estrés calórico. *Rev. Med. Vet.* 2014; 28: 31-42.
- Falony G, Calmeyn T, Leroy F, De Vuyst L. Coculture Fermentations of *Bifidobacterium* Species and *Bacteroides thetaiotaomicron* reveal a mechanistic insight into the prebiotic effect of inulin-type fructans. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(8): 2312-2319.
- Gibson GP, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen Seppo J, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, Verbeke K, Reid G. Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of Prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2017; 14: 491-502.
- González Fernández de Castro M. Evaluación de procesos inflamatorios en bóvidos: determinación de proteínas de fase aguda. *Med. Vet.* 2000; 17(2): 38-45.
- González FHD, Haida KS, Mahl D, Giannesi G, Kronbauer E. Incidencia de doenças metabólicas em frangos de corte no Sul do Brasil e uso do perfil bioquímico sanguíneo para o seu estudo. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 2001; 3(2): 141-147.
- Haghighi HR, Gong J, Gyles CL, Hayes AM, Zhou H, Sanei B, Chambers JR, Sharif S. Probiotic stimulate production of natural antibodies in chickens. *Clin. Vaccine Immunol.* 2006; 13(9): 975-980.
- Hasegawa MY, Fonteque JH, Kohayagawa A, Boretti LP. Avaliação do perfil eletroforético das proteínas séricas em perfil eletroforético das proteínas séricas em matrizes pesadas (*Gallus gallus Domesticus*) de linhagem avian farm. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 2002; 4(3): 203-307.
- Holscher HD, Bauer LL, Gourineni V, Pelkman CL, Fahey GC Jr, Swanson KS. Agave inulin supplementation affects the fecal microbiota of healthy adults participating in a randomized, double-blind placebo-controlled, crossover trial. *The J. Nutrition.* 2015; 145(9): 2025-2032.
- Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poultry Science.* 1998; 77: 1259-1265.
- Kogan G, Kocher A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livest Sci.* 2007; 109: 161-165.
- Koza GA, Mussart NB, Coppo JA. Evolución ontogénica del medio interno en pollos parrilleros. Cambios provocados por un derivado de algas marinas. *Rev. Vet.* 2004; 15(2): 73-79.
- Lara-Fiallos M, Lara-Gordillo P, Julián-Ricardo MC, Pérez-Martínez A, Benites-Cortés I. Avances en la producción de inulina. *Tecnología Química.* 2017; 37(2): 352-366.
- Margni RA. Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. 5º ed. Buenos Aires, Argentina. Médica Panamericana; 1996. p. 906-922.
- Mensink MA, Henderik W, Frijlink K, Van der Voort M. Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics. *Carbohydrate Polymers.* 2015; 130: 405-419.
- Mountzouris KC, Tsitsrikos P, Palamidi I, Arvaniti A, Mohnl M, Schatzmayr G, Fegeros K. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. *Poultry Science.* 2010; 89: 58-67.
- Muñoz Ohmen SA, Restrepo Molina DA, Sepúlveda Valencia JU. Revisión: Inulina en Algunos Derivados Cárnicos. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín.* 2012; 65(2): 6789-6798.
- Perozo Marín F, Nava J, Mavárez Y, Arenas E, Serje P, Briceño M. Caracterización morfológica de los órganos linfoides en pollos de engorde de la línea ross criados bajo condiciones de campo en el estado Zulia, Venezuela. *Rev. Cient. Maracaibo.* 2004; 14(3): 217-225.
- Piotrowski M, Wultanska D, Obuch-Woszczatyhski P, Pituch H. Fructooligosaccharides and mannose affect *Clostridium difficile* adhesion and biofilm formation in a concentration-dependent manner. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2019; 38: 1975-1984.
- Ramasamy S, Saravana Kumar M, Suresh S, Chandrasekaran CV, D'Souza P. Evaluation of polyherbal formulation and synthetic choline chloride on choline deficiency model in broilers implications on zootechnical parameters, serum biochemistry and liver histopathology. *Asian Australas J. Anim. Sci.* 2018; 31(11): 1795-1806.
- Sánchez Quinche AR, Solórzano Saldarriaga JC, Quevedo Guerrero JN, Paladines Romero JR, Pérez Baena I. Effect of *Mentha spicata* L. infusión on the productive performance and organoleptics of Cobb 500 broilers. *Acta Agronómica.* 2019; 68(4): 312-318.

25. Sandoval GL, Terraes JC, Fernández RJ, Revidatti FA, Esquivel de Luchi P, Barcht A. Respuesta al estrés físico y la hepatoprotección continua en pollos. *Arch. Zootec.* 1999; 48: 395-404.
26. Sharma V, Smolin J, Noyak J, Ayala JE, Scott DA, Scott NP, Freeze HH. Mannose alters gut microbiome, prevents diet-induced obesity, and improves host metabolism. *Cell Rep.* 2018; 24: 3087-3098.
27. Zaker-Esteghamati H, Seidavi A, Bouyeh M. Effect of *Cynara scolymus* and its derivatives on broilers: an updated review. *Anim. Biotechnol.* 2021; 32(5): 656-662.

Asociación Cooperadora

**de la Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad  
Nacional del Nordeste**

Personería Jurídica N° 647/92 y 912/00

Sargento Cabral 2139

3400 Corrientes, Argentina

La Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE fue constituida el 10 de diciembre del año 1991 como entidad de bien público, con el objeto de promover y coadyuvar las actividades científicas, educativas y culturales relacionadas con las Ciencias Veterinarias. En tal sentido, implementa acciones para colaborar con la enseñanza, extensión, actualización y difusión científica que realiza dicha casa de estudios.

*Beneficios que brinda a sus asociados:*

- Fotocopias con descuentos especiales en la Fotocopiadora *Copias.com* que funciona dentro del predio de la Facultad de Ciencias Veterinarias.
- Descuentos para la adquisición de libros de distintas editoriales.
- Descuentos especiales en otros rubros.

Página Web [www.vet.unne.edu.ar](http://www.vet.unne.edu.ar) • E-mail: [cooperadora@vet.unne.edu.ar](mailto:cooperadora@vet.unne.edu.ar)

Tel. +54 (379) 4423317/4423507 interno 186



## Influence of irrigation type in the prevalence of bovine fasciolosis, Cajamarca-Peru

Torrel-Pajares, T.S.<sup>1</sup>; Rojas-Moncada, J.<sup>1</sup>; Vargas-Rocha, L.A.<sup>2</sup>; Murga-Moreno, C.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Parasitología Veterinaria y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, Perú. <sup>2</sup>Círculo de Estudios e Investigación en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, Perú.

<sup>3</sup>Laboratorio de Inmunología e Investigación, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, Perú. Jr. Bélgica 271, Cajamarca, Peru. E-mail: [cmurgam15@unc.edu.pe](mailto:cmurgam15@unc.edu.pe)

### Abstract

Fasciolosis is a relevant zoonotic disease in the Peruvian Andes, it causes considerable economic losses by reducing cattle productivity and currently, resistance to anthelmintics is reported, so it is necessary to find new ways to comprehensively control this parasitosis. In this context, the objective of this study was to demonstrate the influence of the type of irrigation on the prevalence of bovine (*Bos taurus*) fasciolosis in dairy production units in the province of San Marcos, Cajamarca region, Peru. A total of 20 dairy cattle were introduced in two farms with different irrigation systems: traditional or flood irrigation (n = 10) and technified or sprinkler irrigation (n = 10). Starting in March and for ten consecutive months they were fed the rations produced on the farms and the prevalence of fasciolosis was monitored using the coproparasitological technique of natural sedimentation. In the livestock unit using flood irrigation, eggs excretion began in August, with a final prevalence of 60%; while in the livestock unit using sprinkler irrigation, the first cases were detected in September and the final prevalence was 20%. To the results, Fischer's test determined that there was no association between the prevalence of the parasite and the type of irrigation (p=0.1698). The study suggests that the prevalence of fasciolosis in cattle fed rye-grass (*Lolium perenne*) / clover (*Trifolium repens*) grown with flood irrigation was higher than that of sprinkler irrigation; however, it is recommended to investigate with a larger number of samples and use more specific diagnostic methods.

**Key words:** cattle, *Fasciola hepatica*, irrigation systems, integrated control, prevalence

## Influencia del tipo de riego en la prevalencia de fasciolosis bovina, Cajamarca-Perú

**Resumen.** La fasciolosis es una enfermedad zoonótica relevante en los Andes peruanos, causa considerables pérdidas económicas al reducir la productividad del ganado y actualmente se reporta resistencia a los antielmínticos, por lo que es necesario encontrar nuevas formas de control integral de esta parasitosis; por ello, el objetivo de este estudio fue demostrar la influencia del tipo de riego en la prevalencia de la fasciolosis bovina (*Bos taurus*) en unidades de producción lechera en la provincia de San Marcos, región Cajamarca, Perú. Un total de 20 bovinos lecheros fueron introducidos en dos predios con diferentes sistemas de riego: tradicional o por inundación (n = 10) y tecnificado o por aspersión (n = 10). A partir de marzo y durante diez meses consecutivos fueron alimentados con las raciones cultivadas en los predios y se monitoreó la prevalencia de fasciolosis mediante la técnica coproparasitológica de sedimentación natural. La excreción de huevos comenzó en agosto en la unidad ganadera que utilizaba el riego por inundación, con una prevalencia final del 60%; mientras que en la unidad ganadera que utilizaba el riego por aspersión, los primeros casos se detectaron en septiembre, con una prevalencia final de 20%. A los resultados, la prueba de Fischer determinó que no había asociación entre la prevalencia del parásito y el tipo de riego (p=0,1698). El estudio

sugiere que la prevalencia de la fasciolosis en los bovinos alimentados con pasto rye-grass (*Lolium perenne*) más trébol (*Trifolium repens*) cultivados con riego por inundación fue mayor que la del riego por aspersión; sin embargo, se recomienda investigar con un mayor número de muestras y utilizar métodos de diagnóstico más específicos.

**Palabras clave:** ganado, *Fasciola hepatica*, sistemas de riego, control integrado, prevalencia

## INTRODUCTION

Fasciolosis is a zoonotic parasitic disease caused by the trematode *Fasciola hepatica*, distributed worldwide and affecting several animal species, including humans (Giraldo et al. 2016, León-Gallardo and Benítez 2018, Perea-Fuentes et al. 2018). Its main means of transmission is contaminated pasture consumed by animals during grazing in areas with constant humidity and the presence of the intermediate host, mollusks of the genus *Lymnaea* (Alpizar et al. 2013, López-Villacís et al. 2017). This disease is considered of great importance in cattle and other domestic animals since its presence causes important economic losses for the livestock production sector due to reduced weight gain, poor condition of the meat and seizure of livers, as well as public health problems (Alpizar et al. 2013, Novobilský et al. 2015).

In Peru, the distribution of *F. hepatica* has been reported in 17 of the 24 regions, being Cajamarca the one with a prevalence of 80% in cattle and is considered among the highest (SENASA 2007, Ortiz 2011, Valderrama 2016). Thus, in a study they reported that with a 49% decrease in the initial prevalence of fasciolosis in cattle, an increase of 38% in weight and 75% in milk production can be achieved by dosing the animals with trematocides, cleaning the irrigation canals and modifying the inclination angles from 90° to 130° (Raunelli and Gonzalez 2009).

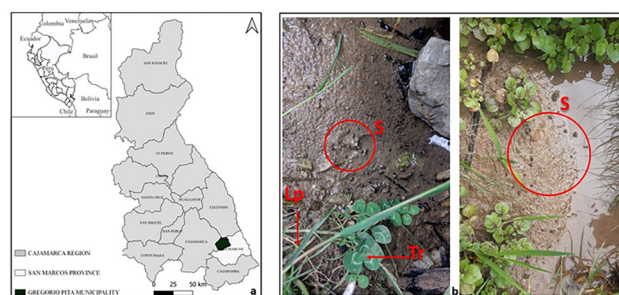
It is important to recognize that the population of the Andean zones is mainly dedicated to agricultural activities, cultivating large extensions of land during the wet or rainy season and to a lesser extent under artificial irrigation during the dry season (Pajares 2010). To this end, access to water in the highlands is mostly through springs and irrigation canals, although their management and use is inefficient, favoring the transmission of parasitic diseases and other contaminants (Choque-Quispe et al. 2021, Lund et al. 2021). It is at this point where the precarious distribution of water resources in the Cajamarca region becomes important with the presence of highly competent intermediate hosts which are snails of the *Galba truncatula* and *Pseudosuccinea columella* species; *G. truncatula* being the one that increases its transmissibility at an altitude above 2000 m.a.s.l. with longer periods of production and elimination of cercariae (Bardales-Valdivia et al. 2021).

All this epidemiological synergy of fasciolosis requires a prompt update, especially due to the rapid advance of resistance to anthelmintics and the greater adaptation of the parasite to the climatic conditions of the Peruvian Andes. It is also important to take into account the economic damage due to seizures of livers damaged by *F. hepatica*, which generate annual losses of US\$ 50 million at the national level and US\$ 230 million in the Cajamarca region (León-Gallardo and Benítez 2018).

Although the most widespread form of prophylaxis is proper management, it is necessary to analyze the relationship of the irrigation systems used for pasture cultivation in the control of fasciolosis in bovines. Therefore, the present research aimed to demonstrate the influence of the type of traditional irrigation (flooding) and technified irrigation (sprinkling) on the prevalence of bovine fasciolosis in two cattle units located in the province of San Marcos, Cajamarca region, Peru.

## MATERIALS AND METHODS

**Population and location.** The study was conducted in dairy cattle of the Holstein and Brown Swiss breeds from northern Peru, recently introduced in two livestock units dedicated to dairy production, in extensive type breeding in two communities of the municipality of Gregorio Pita located in the coordinates with latitude -7.1537 and longitude -78.1332 of the province of San Marcos, Cajamarca region, between the months of March and December 2015 (Figure 1a). The area is located at an altitude of 2770.51 m and has a tropical dry climate, reaches an annual average maximum temperature of 26.34°C and minimum of 3.72°C, the relative humidity is 72.44% and rainfall is 1.33 mm/day or 486.27 mm in the year (Data provided by the Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú). In the two selected farms, the presence of the intermediate host *G. truncatula* was verified, although in the farm with sprinkler irrigation, the animals did not have access to the irrigation ditches, which only served the purpose of draining rainwater (Figure 1b).



**Figure 1.** Map showing the location of the municipality of Gregorio Pita within Cajamarca region, Peru (a). Farm ditches used for traditional irrigation or rainwater drainage, the following can be observed: S = snails, Lp = *Lolium perenne* and Tr = *Trifolium repens* (b).

**Animal selection.** During the months of January and February, the newly introduced animals older than one year of age were adapted to their new locations and husbandry system. Fecal samples were collected to rule out the presence of *F. hepatica* and the animals were grouped according to their unit of origin: group 1 (G1) consisted of 10 bovines

fed on rye-grass (*Lolium perenne*) / clover (*Trifolium repens*) grown with traditional or flood irrigation and group 2 (G2) consisted of 10 bovines also fed on rye-grass (*Lolium perenne*) / clover (*Trifolium repens*) grown with sprinkler irrigation.

**Sampling and coproparasitological study.** Once the negativity of the cattle to the parasite was confirmed, from March onwards, samples were taken directly from the rectum of each animal, approximately 100 g of feces in the morning, and were transferred to the Laboratorio de Parasitología Veterinaria y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Cajamarca for their respective analysis. The coproparasitological analyses of the 20 samples were performed monthly for ten consecutive months with Rapid Sedimentation following the technique described by Lumbreras et al. (1962). Parasitological 5% Lugol's solution was used to differentiate the eggs of *Fasciola hepatica* and *Calicophoron microbothrioides* using a stereoscope at 4X and to confirm the appropriate genus was observed with a 10X objective in an optical microscope (Figure 2).

**Data analysis and processing.** The data obtained were expressed as "positive" for cattle with the presence of *F. hepatica* eggs in the faeces and "negative" when these parasitic forms were absent. In addition, Microsoft Excel

2019 Professional was used to run Fisher's test to determine if there is an association between the prevalence of fasciolosis and the type of irrigation.

**Ethical considerations.** This study was conducted within the framework of the Ley de Protección y Bienestar Animal 30407 in force in the Peruvian State. Before initiating the research, the protocol was reviewed and approved by the Comité Ético de Uso de Animales of the Facultad de Ciencias Veterinarias of the Universidad Nacional de Cajamarca. The animals were not harmed during the study process.

## RESULTS AND DISCUSSION

The positive findings to coproparasitology allow us to calculate the prevalence of fasciolosis in G1, which used traditional or flood irrigation, with 60% of the total infected animals, compared to the prevalence observed in G2, which used sprinkler irrigation, with 20% of the animals releasing eggs through the faeces in the period studied (Table 1 and Figure 2). However, statistically, there is not enough evidence to affirm that the prevalence of fasciolosis is related to the type of irrigation used in pasture farming ( $p>0.05$ ), probably due to the size of the sample or to the high endemicity of the parasite in this area of northern Peru.

**Table 1:** Monthly and overall prevalence of fasciolosis in dairy cattle according to type of irrigation.

Month	G1 = flood irrigation		G2 = sprinkler irrigation		p-value
	<i>Fasciola hepatica</i> -positive animals (n = 10)	Prevalence	<i>Fasciola hepatica</i> -positive animals (n = 10)	Prevalence	
March	0	0.00%	0	0.00%	
April	0	0.00%	0	0.00%	
May	0	0.00%	0	0.00%	
June	0	0.00%	0	0.00%	
July	0	0.00%	0	0.00%	
August	1	10.00%	0	0.00%	0.1698
September	1	20.00%	1	10.00%	
October	2	40.00%	0	0.00%	
November	1	50.00%	1	20.00%	
December	1	60.00%	0	0.00%	
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>60.00%</b>	<b>2</b>	<b>20.00%</b>	



**Figure 2.** Eggs found by coproparasitology and observed at 10X with parasitological 5% Lugol's solution.

The difference between the prevalences obtained could be due to the presence of factors that make possible the development of the latent infectious form of *F. hepatica* in each livestock unit, such as the constant humidity in the cultivation areas, the environmental temperature above 10°C, and the presence of competent intermediate hosts such as *G. truncatula* in irrigation canals, swamps, irrigation ditches, stagnant waters, streams, ponds, also in the soil and plants close to fresh water catchments detected in both groups of studies located within the province of San Marcos, Cajamarca region, in addition to the influence of the altitude of this area (Novobilský et al. 2015, Bardales-Valdivia et al. 2021).

Altitudes between 2007 - 3473 m.a.s.l., together with climatic seasonality directly influence the snail population, as in the case of *G. truncatula* in temporarily dry habitats, while humid habitats such as those generated during the rainy periods in the Peruvian highlands that coincide with the summer season, as well as the use of traditional irrigation (by flooding) in the dry season, make it possible for the biological cycle of *F. hepatica* to be completed and subsequently the animals come into direct contact with the infecting parasitic form; finding all these meteorological characteristics in G1, likewise, promote a higher prevalence (Bardales-Valdivia et al. 2021). Another more complete epidemiological study developed in Cajamarca concludes that the months between December and May are environmentally optimal for the acquisition of new infections or reinfections by *F. hepatica*, and the maximum excretion of eggs occurs between August and September (Claxton et al. 1997), thus corroborating the present investigation with the appearance of the first positive cases in that period.

On the other hand, based on research carried out in other regions of Peru and other countries, fasciolosis in both sheep and cattle occurs with high frequencies, probably due to the type of feed consumed, especially when the animals are raised in open, natural pastures or sown with alfalfa or other grasses (Jara et al. 2018).

Thus, in the Amazon region, an overall prevalence of *F. hepatica* of 59.5% in cattle, with a higher prevalence in the districts of Yambrasbamba and Florida (Julon et al. 2020); in two places in La Libertad (Pataz and Otuzco), high prevalence has also been reported, 62.4% and 74.3%, respectively (Jara et al. 2018, León-Gallardo and Benítez 2018). Likewise, it has been reported in several studies around the world in dairy cattle, such as Colombia (12.3%) (Giraldo et al. 2016) and more than 50% in samples taken from dairy cattle during the rainy season in the province of Matanza, Cuba (Soca-Pérez et al. 2016); It is necessary to emphasize that in all the studies the coprological method was used to determine the prevalence of fasciolosis and the sampled animals were raised extensively, so they consume short stem plants cultivated mainly under the traditional system of rains and irrigation, as well as the sample of this study.

## CONCLUSIONS

There is statistical evidence that the prevalence of fasciolosis in cattle in this controlled experiment is not related to the type of irrigation used in the pasture culture. Despite this, a greater impact is seen in animals fed flood-irrigated rye grass/clover where prevalence was higher compared to individuals fed sprinkler-irrigated pasture. It is recommended to increase the sample size, consider other more specific diagnostic methods and include environmental and seasonal behavioral variables of the intermediate host for further studies in order to extrapolate the results to the cattle population of Cajamarca, Peru, and other regions of the world.

## ORCID

Teófilo S Torrel-Pajares  <https://orcid.org/0000-0002-2720-1959>

Juan D Rojas-Moncada  <https://orcid.org/0000-0001-6943-4112>

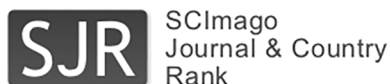
Luis A Vargas-Rocha  <https://orcid.org/0000-0002-8571-6416>

César A Murga-Moreno  <https://orcid.org/0000-0002-5879-3694>

## REFERENCES

1. Alpízar C, de Oliveira J, Jiménez A, Hernández J, Berrocal A, Romero J. *Fasciola hepatica* en ganado bovino de carne en Siquirres y lesiones anatómo-histopatológicas de hígados bovinos decomisados en mataderos de Costa Rica. *Agron Costarricense*. 2013; 37(2): 7-16.
2. Bardales-Valdivia JN, Bargues MD, Hoban-Vergara C, Bardales-Bardales C, Goicochea-Portal C, Bazán-Zurita H, Del Valle-Mendoza J, Ortiz P, Mas-Coma S. Spread of the fascioliasis endemic area assessed by seasonal follow-up of rDNA ITS-2 sequenced lymnaeid populations in Cajamarca, Peru. *One Health*. 2021; 13:100265.
3. Choque-Quispe D, Froehner S, Ligarda-Samanez CA, Ramos-Pacheco BS, Peralta-Guevara DE, Palomino-Rincón H, Choque-Quispe Y, Solano-Reynoso AM, Barboza-Palomino GI, Taipe-Pardo F, Zamaflora-Puma LM. Insights from water quality of high andean springs for human consumption in Peru. *Water*. 2021; 13(19): 2650.
4. Claxton JR, Zambrano H, Ortiz P, Amorós C, Delgado E, Escurra E, Clarkson MJ. The epidemiology of fasciolosis in the inter-Andean valley of Cajamarca, Peru. *Parasitol. Int.* 1997; 46(4): 281-8.
5. Giraldo E, Pérez J, Aguilar S, Linares S. Prevalencia de fasciolosis bovina en una zona de Caldas Colombia con evidencias de la enfermedad. *Rev. U.D.C.A. Act & Div. Cient.* 2016; 19(1): 149-59.
6. Jara C, Escalante H, Cassana W, Davelois K, Benites A. Prevalencia de fascioliasis en ovinos y bovinos en la provincia de Pataz, La Libertad, Perú, mediante examen coproparasitológico y Western Blot. *Rev. Inv. Vet. Perú*. 2018; 29(4): 1421-9.
7. Julon D, Puicón V, Chávez A, Bardales W, Gonzales J, Vásquez H, Maicelo J. Prevalencia de *Fasciola hepatica* y parásitos gastrointestinales en bovinos de la Región Amazonas, Perú. *Rev. Inv. Vet. Perú*. 2020; 31(1): e17560.
8. León-Gallardo Z, Benítez L. Fasciolosis, prevalencia y pérdidas económicas en *Bos Taurus*. *Sciéndo*. 2018; 21(4):421-9.
9. López-Villacís IC, Artieda-Rojas JR, Mera-Andrade RI, Muñoz-Espinoza MS, Rivera-Guerra VE, Cuadrado-Guevara AC, Zurita-Vásquez JH, Montero-Recalde MA. *Fasciola hepatica*: aspectos relevantes en la salud animal. *J. Selva Andina Anim. Sci.* 2017; 4(2): 137-46.
10. Lumbreras H, Cantella R, Burga R. Acerca de un procedimiento de sedimentación rápida para investigar huevos de *Fasciola hepatica* en las heces, su evaluación y uso en el campo. *Revista Médica Peruana*. 1962; 31(332):167-174.

11. Lund AJ, Rehkopf DH, Sokolow SH, Moustapha S, Jouanard N, Schacht M, Senghor S, Fall A, Riveau G, De Leo G, Lopez-Carr D. Land use impacts on parasitic infection: a cross-sectional epidemiological study on the role of irrigated agriculture in schistosome infection in a dammed landscape. *Infect. Dis. Poverty.* 2021; 10(35): 1-10.
12. Novobilský A, Novák J, Björkman C, Höglund J. Impact of meteorological and environmental factors on the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in beef cattle herds in Sweden. *BMC Vet. Res.* 2015; 11(128).
13. Ortiz P. Estado actual de la infección por *Fasciola hepatica* en Cajamarca, Perú. XX Congreso Latinoamericano de Parasitología. *Biomédica.* 2011; 31(3): 3-315.
14. Pajares G. Sistemas de Riego Tecnificado Presurizado con Micro-reservorios Familiares para la Adaptación de los Pequeños Productores de las Cuencas Andinas al Cambio Climático. Food and Agriculture Organization, Roma. 2010; P.1-36, Recuperado a partir de <https://www.fao.org/publications/card/en/c/b4500148-d66b-51be-ad1b-553f756acaf3/>
15. Perea-Fuentes M, Díaz-Anaya A, Pulido-Medellín M, Bulla-Castañeda, D. Fasciolosis: una enfermedad emergente. *Pensamiento y Acción.* 2018; 24, 55-66.
16. Raunelli F, Gonzalez S. Strategic control and prevalence of *Fasciola hepatica* in Cajamarca, Peru. A pilot study. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.* 2009; 7(4): 145-52.
17. SENASA. Situación zoonositaria del Perú. *Dirección General del Servicio Nacional de Sanidad Agraria.* 2007.
18. Soca-Pérez M, Giupponi-Cardoso P, López-Vigoa O, Sanavria A, Sánchez-Santana T, Labrada-Vázquez A. Prevalencia de *Fasciola hepatica* en vacas en pastoreo durante el periodo poco lluvioso. *Pastos y Forrajes.* 2016; 39(4): 281-5.
19. Valderrama AA. Prevalencia de fascioliasis en animales poligástricos de Perú, 1985-2015. *Rev. Med. Vet.* 2016; 1(32): 121-9.



## **Revista Veterinaria** mantiene su índice de impacto

Noticias de Scimago Research Group (*Scimago Journals & Country Ranks*, *Scopus-Elsevier*) comunican que la publicación de nuestra casa, *Revista Veterinaria*, aumentó su índice de impacto. El índice SJR mide la influencia científica (impacto) del artículo de una revista, expresando cuán importante es el “artículo promedio” de la publicación en la discusión científica global (sistema Thomson Reuters).

Para nuestra revista, tal indicador había sido de 0,03 entre 2008 y 2011, aumentando a 0,05 en 2012, a 0,11 en 2013, a 0,100 en 2017 y a 0,14 en 2022, último período evaluado. Asimismo, surge para nuestra publicación un sostenido descenso del indicador que relaciona “citas versus autocitas”, demostrando que los autores de los artículos están abandonando la práctica de citar sus propias publicaciones anteriores.

Por último, se advierte que según este portal, nuestra “*Revista Veterinaria*” continúa siendo la única publicación de esta rama de la ciencia que posee índice de impacto en Argentina. Para el resto del cono sur tal distinción recae en Brasil, Chile, Colombia y Venezuela. En revistas de veterinaria, a nivel mundial el mayor índice de impacto (2,911 puntos) recae en *Annual Review of Animal Biosciences* (Estados Unidos).

Fuente: <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=7200153136&tip=sid&clean=0>. Metrics based on Scopus® data as of April 2023.





## Caracterización y potencial aplicación industrial de extractos enzimáticos de pacú (*Piaractus mesopotamicus*)

Acevedo Gomez, A.V.<sup>1,2\*</sup> ; Gomez, G.N.<sup>1,2</sup> ; Medina, D.M.<sup>1,2</sup> ; Bogado, C.<sup>1,2</sup>;  
Bustillo, S.<sup>1,2</sup> ; Leiva, L.N.<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación en Proteínas (LabInPro), IQUIBA-NEA, UNNE, CONICET, FACENA (Campus “Deodoro Roca” Av. Libertad N° 5460), 3400, Corrientes, Argentina. <sup>2</sup>Grupo de Investigaciones Biológicas y Moleculares (GIByM) IQUIBA-NEA, UNNE, CONICET, FACENA (Campus “Deodoro Roca” Av. Libertad N°5460), 3400, Corrientes, Argentina. E-mail: antonellavag@hotmail.com

### Resumen

La producción pesquera puede generar cantidades considerables de residuos cuya disposición final inadecuada puede causar daños ambientales. La utilización de estos desechos para la obtención de productos con alto valor agregado y de interés industrial, es una alternativa para la producción acuícola sostenible. En este trabajo se obtuvieron y caracterizaron extractos ácidos ricos en enzimas tipo pepsina (EP) y alcalinos ricos en enzimas tipo tripsina (ET) a partir de vísceras de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) evaluando sus potenciales aplicaciones biotecnológicas. EP y ET exhibieron máxima actividad catalítica a pH 2 - 45°C y pH 7 - 45°C; mostraron ser estables en los rangos de pH 1,0 a 3,5 y 7,5 a 10,5 y de temperatura 0 a 37°C y 0 a 45°C, respectivamente. La actividad de EP fue inhibida por pepstatina A pero no por PMSF y SBTI; EDTA y SDS provocaron inhibición parcial, confirmando la presencia de enzimas de tipo pepsina. ET se inactivó en presencia de SBTI pero no por SDS; PMSF y EDTA disminuyeron en un 50% su actividad, confirmando la existencia de enzimas tipo tripsina. Los iones divalentes (Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>) no modificaron la capacidad proteolítica de los extractos, en cambio se redujo a concentraciones crecientes de NaCl. Por otra parte, ET y EP fueron eficaces para hidrolizar el recubrimiento de gelatina impregnado con plata de placas radiográficas usadas y generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> a partir de la degradación de IgG equinas, respectivamente. En conclusión, estos extractos podrían ser aplicables en procesos donde se requiera máxima actividad a temperatura moderada y baja concentración de NaCl; en la recuperación de plata metálica y celuloide de placas radiográficas reveladas como así también la obtención de productos biológicos. Estos resultados abren nuevas perspectivas para la economía circular de las explotaciones acuícolas del pacú.

**Palabras clave:** Subproductos, *Piaractus mesopotamicus*, extractos enzimáticos, pepsina, tripsina, aplicaciones industriales.

## Characterization and potential industrial application of enzymatic extracts from pacu (*Piaractus mesopotamicus*)

**Abstract.** Fish production can generate considerable amounts of waste, whose inadequate final disposition could cause environmental damage. The use of these wastes to obtain high value-added products of industrial relevance is an alternative for sustainable aquaculture production. In this study, acidic extracts rich in pepsin-like enzymes (EP) and alkaline extracts rich in trypsin-like enzymes (ET) were obtained and characterized from the viscera of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), evaluating their potential biotechnological applications. EP and ET showed maximum catalytic activity at pH 2 - 45°C and pH 7 - 45°C, respectively. They were stable in pH ranges of 1.0 to 3.5 and 7.5 to 10.5 and temperature ranges of 0 to 37°C and 0 to 45°C, respectively. The activity of EP was inhibited by pepstatin A, but not by PMSF and SBTI. EDTA and SDS caused partial inhibition, confirming the presence of pepsin-like enzymes. ET was inactivated in the presence of SBTI but not by SDS. PMSF and EDTA decreased the activity by 50%, confirming the presence of trypsin-like enzymes. Divalent ions (Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>) did not alter the proteolytic capacity of the extracts,

but it decreased with increasing NaCl concentration. Moreover, ET and EP were effective in hydrolyzing the silver-impregnated gelatin coating of discarded x-ray films and generating F(ab')<sub>2</sub> fragments from equine IgG degradation, respectively. In conclusion, these extracts could be applicable in processes requiring maximum activity at moderate temperatures and low NaCl concentrations, in the recovery of metallic silver and PET sheet from used x-ray films and in the production of biological products. These results open up new perspectives for the circular economy of pacú aquaculture farms.

**Key words:** byproducts, *Piaractus mesopotamicus*, enzymatic extracts, pepsin, trypsin, industrial applications.

## INTRODUCCIÓN

El continuo crecimiento de la población mundial implica intensificación y diversificación las fuentes de alimentos. En los últimos 20 años, los aportes de la pesca y la acuicultura a la seguridad nutricional y alimentaria mundial han sido esenciales. Desde 1961, el consumo a nivel global de los alimentos de origen acuático incrementó a una tasa promedio anual de 3,0% y se estima que en 2030 su valor será de 21,4 kg per cápita. Este fenómeno es consecuente con la constante expansión del sector, impulsado por la acuicultura y lo cual ha promovido el desarrollo de la producción de peces en aguas continentales. En efecto, en 2020 el 48% de los productos de la acuicultura fueron cultivados bajo este sistema (FAO 2022).

El procesamiento del pescado para consumo humano genera una gran cantidad de desechos, representando desde un 20 hasta un 60% del peso del pescado, dependiendo del grado de industrialización. Las cabezas, huesos, vísceras, escamas y pieles son los subproductos más comunes (FAO 2022), principalmente descartados o empleados para obtener productos de bajo valor agregado (ej. harina de pescado). Esto da lugar a un problema dual que involucra cuestiones medioambientales y aplicaciones menos rentables de estos subproductos y desechos. Es necesario, entonces, lograr la valorización de dichos descartes y subproductos, contribuyendo a generar industrias pesqueras más sostenibles (Korkmaz y Tokur 2022). En este sentido las vísceras de pescado son una fuente valiosa de enzimas digestivas, especialmente de proteasas, tales como pepsina y tripsina. Las proteasas constituyen el grupo de enzimas más utilizadas en los bioprocesos industriales, representan alrededor del 40% al 65% del total de preparados comerciales de enzimas (Friedman y Contreras 2021). La pepsina y la tripsina son ampliamente usadas en la producción de detergentes, la fabricación de alimentos, la industria farmacéutica y la producción de cuero (Zhao et al. 2011). Las preparaciones comerciales utilizan enzimas de origen microbiano, porcino o bovino. Sin embargo, en las últimas décadas se han aislado pepsinas y tripsinas provenientes de distintos organismos acuáticos con el fin de caracterizarlas y estudiar su aplicación. Estas proteasas presentan características diferenciales respecto a las de las fuentes tradicionales, por lo que resultan atractivas para la industria (Zhao et al. 2011, Poonsin et al. 2019, Kuepethkaew et al. 2022) respectively. Based on SDS-PAGE analysis, using proteomics analysis and Isoform-sequencing (Iso-Seq).

La pepsina es una proteasa ácida (máxima actividad catalítica a pH bajo). Se sintetiza en la membrana gástrica del estómago bajo una forma inactiva, el pepsinógeno, estable en medios neutros y ligeramente alcalinos. Se activa a pepsina

al ser expuesto al ácido clorhídrico presente en el jugo gástrico (pH 1,5 - 2,0). La tripsina es una serino proteasas y su mayor actividad enzimática la presenta en un rango alcalino, entre pH 8,0 y 10,0. En los peces con estómago e intestino proximal, la tripsina es producida en su forma inactiva (tripsinógeno) por el ciego pilórico, divertículo embriológica y fisiológicamente equivalente al páncreas de los mamíferos (Baldisserotto et al. 2014). Su activación es catalizada por la enteropeptidasa en el intestino. A la vez, la tripsina ya catalíticamente activa es capaz de activar a otras moléculas de tripsinógeno (Torrissen y Male 2000).

El pacú (*Piaractus mesopotamicus*) es un pez endémico de la cuenca del río Paraguay-Paraná que, debido a su elevada tasa de crecimiento, hábito de alimentación omnívoro, rusticidad y buena calidad muscular se lo produce masivamente en sistemas acuícolas intensivos. En efecto, constituye una de las especies más cultivadas en América del Sur y su producción se ha extendido a países asiáticos como China, Tailandia y Vietnam. Argentina, Brasil y Paraguay son los principales países productores, alcanzando una producción total de 17.282 toneladas en 2017 (Montenegro et al. 2022). Se lo comercializa principalmente en forma de filete lo que implica que, una gran fracción (30 - 80%) del peso del pescado resulte desechado. En este sentido, las vísceras del pacú pueden revalorizarse como fuente de enzimas proteolíticas (pepsina y tripsina), contribuyendo a la disminución de los problemas ambientales asociados a su descarte e incrementando el retorno económico de las industrias procesadoras de pacú. Con el propósito de darle un valor agregado a estas enzimas digestivas, es necesario conocer previamente sus propiedades funcionales. Es por ello que, el objetivo de este trabajo fue obtener extractos con actividad pepsina y tripsina de los desechos del procesamiento de pacú obtenido por acuicultura, caracterizarlos y medir sus capacidades hidrolíticas sobre sustratos específicos a fin de evaluar su potencial uso industrial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Muestras.** Las vísceras de pacú fueron provistas por la empresa Puerto Las Palmas S.A. (Pacú Teko ® -: PLP GROUP). Las mismas fueron colectadas en bolsas de plástico selladas y mantenidas a -20°C hasta su utilización.

### Obtención de extractos enzimáticos

**Extracto con actividad tripsina (ET).** El extracto con actividad tripsina se obtuvo según el procedimiento descrito por Fuchise et al. (2011). Se disgregó el tejido de ciegos pilóricos utilizando buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 7,8 en una relación 1:5 (g tejido

ml<sup>-1</sup> de buffer). La solución se sonicó por 15 min, se centrifugó por 10 min a 10.000 g y se recogió el sobrenadante al que se denominó extracto con actividad tripsina (ET). El procedimiento se llevó a cabo a 4°C. El ET se conservó a -20°C hasta su utilización, por un período máximo de 3 meses.

**Extracto con actividad pepsina (EP).** El extracto con actividad pepsina se obtuvo según el procedimiento descrito por Acevedo Gomez et al. (2018). El tejido de la mucosa gástrica se disgregó utilizando buffer glicina-HCl 0,1 M pH 2 en una relación 1:5 (g tejido ml<sup>-1</sup> de buffer). La solución se sonicó por 15 min, se centrifugó por 10 min a 10.000 g, se recogió el sobrenadante al que se denominó extracto con actividad pepsina (EP). El procedimiento se llevó a cabo a 4°C. El EP se conservó a -20°C hasta su utilización, por un período máximo de 3 meses.

**Cuantificación de proteínas totales.** La concentración de proteínas totales de los extractos enzimáticos se determinó empleando el método descrito por Bradford (1976), empleando albúmina bovina como estándar.

**Actividad Enzimática del ET.** Se evaluó en medio alcalino sobre dos sustratos diferentes:

**Actividad sobre sustrato específico Na-benzoil-DL-arginina-P-nitroanilida (BAPNA).** Se empleó el método cinético descrito por Ágeirsson et al. (1989) empleando una solución de BAPNA (al 1% (P/V) en buffer 0,1M Tris-HCl (pH 8,0), la reacción se realizó a 30°C por 6 min. Una unidad de actividad enzimática se definió como cantidad de proteína que genera un aumento de la absorbancia a 410 nm en un valor igual a 1 por minuto.

**Actividad sobre azocaseína.** Se siguió la metodología descrita por Wang y Huang (2002) empleando una solución de azocaseína (5 mg ml<sup>-1</sup> en buffer fosfato PBS, pH 7,2), la reacción se llevó a cabo a 37°C durante 90 min. La actividad proteolítica se expresó como el cambio de absorbancia a 450 nm producido por 45 µL de muestra, respecto a los blancos de reacción (sin ET) en las condiciones de ensayo. Los resultados se expresaron en actividad relativa porcentual respecto al máximo de actividad del ensayo, considerado como 100%.

**Actividad enzimática del EP.** La actividad proteolítica de los extractos ácidos se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Acevedo Gomez et al. (2018), utilizando como sustrato hemoglobina ácida e incubando con el extracto a 37°C por 30 min. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de proteína que genera un aumento de la absorbancia a 280 nm en un valor igual a 1, durante una incubación de 30 min en las condiciones del ensayo.

**Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática.** El efecto del pH sobre la actividad enzimática de ET y EP se estudiaron en los rangos de 1,0 a 8,0 y de 1,0 a 10,0, respectivamente, según los métodos descriptos anteriormente (Actividad sobre sustrato específico Na-

benzoil-DL-arginina-P-nitroanilida (BAPNA) y Actividad enzimática del EP). Evaluando para ET los pHs 1,0, 3,6, 5,0, 7,0, 8,0, 9,0 y 10,0; mientras que para EP se estudiaron los pHs 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0 y 8,0, atendiendo al rango de actividad de las enzimas de interés en los extractos.

Los buffers utilizados fueron: HCl-KCl 0,1 M (pH 1,0), glicina-HCl 0,1 M (pH 2,0-3,0), acetato 0,1 M (pH 5,0), Tris-HCl 20 mM (pH 7,0-9,0), glicina-NaOH 0,1 M (pH 11,0).

El efecto de la temperatura sobre la actividad de los extractos se evaluó en el rango de 0 a 80°C. Evaluando para ET las temperaturas 0, 10, 25, 37, 45, 60 y 75°C; mientras que para EP se estudiaron las temperaturas 0, 11, 25, 37, 45, 60 y 80°C. Las muestras y los sustratos se pre-incubaron durante 5 min a la temperatura definida antes de cada reacción. Los resultados se expresaron en actividad porcentual respecto al máximo de actividad considerado como 100%.

#### **Estabilidad en función de pH y la temperatura.**

La estabilidad frente al pH se estudió siguiendo la metodología descrita por Acevedo Gomez (2019a). Para ello se incubaron los extractos a temperatura ambiente durante 120 min con los buffers a diferentes pHs en proporción 1:1 (muestra:buffer). El intervalo de pH y el sistema de buffers utilizados se corresponden con los evaluados previamente. La actividad proteolítica residual de cada muestra se determinó inmediatamente después de la incubación y luego de que las muestras fueran llevadas previamente al pH apropiado para cada extracto. Se calculó la actividad enzimática comparándola con una muestra control (100% de actividad) pre-incubada con buffers Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 7,8 y glicina-HCl 0,1 M pH 2 para ET y EP, respectivamente.

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los extractos se evaluó incubándolos a diferentes temperaturas, 0, 4, 20, 37, 45, 60 y 80°C por 120 min y luego se determinó la actividad proteolítica residual de las muestras respecto a una muestra control sin pre-incubar (100% de actividad). Para este estudio particular, la actividad del extracto con actividad tripsina (ET) se evaluó utilizando como sustrato azocaseína, debido a una limitación metodológica en el espectrofotómetro empleado.

**Efecto del NaCl.** La influencia del NaCl sobre la actividad enzimática de las muestras se determinó mediante la técnica descrita por Klomklao et al. (2008) con mínimas modificaciones. Se adicionó NaCl a las muestras hasta obtener concentraciones finales de 5, 10, 15, 20, 25 y 30% (P/V) y luego se pre-incubaron a temperatura ambiente por 2 h. Los resultados se expresaron en actividad porcentual respecto a los controles, sin adición de NaCl (100%).

**Efecto de iones e inhibidores.** Las muestras (200 µL) se pre-incubaron con los inhibidores SDS, PMSF, EDTA, SBTI pepstatina A y los activadores MgCl<sub>2</sub> o CaCl<sub>2</sub> (200 µL) durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se determinó la actividad proteolítica de las mismas. Las concentraciones ensayadas fueron: SDS 0,1 y 0,005% (P/V); PMSF 1 mM; EDTA 2 mM; SBTI 0,05 mM; pepstatina A 10 µM; MgCl<sub>2</sub> o CaCl<sub>2</sub> 1 y 5 mM. Los resultados se expresaron en actividad porcentual respecto a los controles, sin adición de inhibidores o activadores (100%).

### Potenciales aplicaciones industriales

**Recuperación de placas radiográficas.** Se determinó la capacidad de extractos con actividad tripsina para hidrolizar la capa de gelatina impregnada en plata que recubre las placas radiográficas siguiendo la metodología descrita por Acevedo Gomez et al. (2022), con algunas modificaciones. Se prepararon extractos con agua destilada (ET<sub>aq</sub>-M1), solución fisiológica (ET<sub>fis</sub>-M2) y buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 7,8 (ET-M3) de acuerdo con el apartado 2.3. Las placas radiográficas (1 x 1 cm) se sumergieron en 2 ml de los extractos (0,06 U) y se agitaron manualmente durante 2 s cada 5 min hasta que la capa de gelatina de plata se eliminó por completo. El ensayo se realizó a temperatura ambiente (20°C) y la liberación de plata desde la placa al medio se siguió por medición de la turbidez (620 nm) de alícuotas tomadas a diferentes tiempos del medio líquido que baña las placas. Los resultados se expresaron como el incremento porcentual de la turbidez de cada medio respecto a su valor inicial. Se realizaron blancos y controles en iguales condiciones para descontar la influencia de los medios.

**Hidrólisis de inmunoglobulinas.** Se ensayó la capacidad del EP para clivar IgG equina. Para ello, las IgG se purificaron de suero entero mediante cromatografía de afinidad. Posteriormente se las mezcló en proporción 1:1 con el extracto (136, 7 U mg<sup>-1</sup>) e incubó a 37°C. A los tiempos 1, 3, 12 y 24 h se tomaron alícuotas que se neutralizaron con buffer tris-HCl 1M pH 9 y congelaron hasta su posterior análisis. Se realizaron controles en iguales condiciones incubados por 24 h reemplazando el EP por PBS - control negativo- y por una solución de pepsina porcina (5 mg ml<sup>-1</sup> en buffer glicina-HCl 0,1M pH 2- Sigma Aldrich®, ≥250 U mg<sup>-1</sup>) - control positivo-. Las muestras se sometieron a un análisis por SDS-PAGE en condiciones no reductoras según el método de Laemmli et al. (1970) y empleando Coomassie Blue R-250 para la tinción.

**Análisis estadístico.** Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. La significancia de las diferencias entre las medias fue evaluada mediante ANOVA siguiendo el test de Tukey para comparaciones múltiples entre grupos. Los valores de p menores a 0,05 fueron considerados significativos estadísticamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Extractos con actividad tripsina y pepsina.** A partir de los ciegos pilóricos y la mucosa del estómago de ejemplares de pacú de un promedio de 1,5 kg se obtuvieron los extractos con actividad tripsina (ET) y pepsina (EP) cuyas concentraciones proteicas y actividades proteolítica media resultaron 3,79 ± 0,31 mg ml<sup>-1</sup> y 0,78 ± 0,06 U/mg<sup>-1</sup>; 0,05 ± 0,01 mg ml<sup>-1</sup> y 10,59 ± 0,30 U mg<sup>-1</sup> empleando los sustratos BApNa y hemoglobina ácida, respectivamente. Para ET se utilizó un mínimo de tres ciegos pilóricos (masa promedio 2,90 g) resultando un volumen promedio de 4,67 ml ET/ciego pilórico; mientras que para el EP se empleó un mínimo de tres estómagos (masa promedio 0,26 g mucosa/estómago) resultando un volumen promedio de 18,73 ml EP/estómago.

Previamente, se ha reportado que los extractos con actividad pepsina de los peces de agua dulce sábalo (*Prochilodus lineatus*), surubí (*Pesudoplatistoma* sp.), pez disco (*Symphysodon aequifasciata*), carpa india mayor (*Labeo rohita*) exhibieron actividades 43,4; 205; 0,64 y 2,9 U mg<sup>-1</sup> frente al sustrato hemoglobina ácida (Acevedo Gomez et al. 2018:2019b, Chong et al. 2002, Mohanty et al. 2020). En este trabajo, los resultados obtenidos para el EP de pacú evidenciaron un valor intermedio entre los informados por la literatura. No se encontró una correlación entre tipo de alimentación y actividad del tipo pepsina exhibida por estos extractos dada la amplitud en el rango de valores que se reportan para diferentes especies.

El ET presentó una actividad similar a la de los extractos crudos de los peces raya espinosa (*Raja clavata*) y pez disco (*S. aequifasciata*) y superiores al del lenguado (*Paralichthys orbignyanus*), cuyos valores reportados fueron 0,87; 0,79 y 0,51 U mg<sup>-1</sup> frente al sustrato BApNa (Chong et al. 2002, Lassoued et al. 2015, Candiotta et al. 2017).

**Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad enzimática.** Los extractos EP y ET exhiben actividad proteolítica en rangos de pH claramente diferenciados con una pérdida de la misma más acentuada para el primero, tal como se muestra en la Figura 1 (A).

En general las proteasas digestivas ácidas de organismos acuáticos son activas a pH ácido, presentan sus óptimos en el rango de 2,0 a 3,5 y cuando el medio se desvía de estos valores la actividad disminuye (Zhao et al. 2011). El rango de pHs con actividad enzimática del EP de pacú (pHs 1,0 a 3,5) resultó similar a lo reportado para los extractos de surubí, lenguado y jaurel amarillo (Candiotta et al. 2017; Acevedo Gomez et al. 2022; Silva et al. 2022a). Además, el pH óptimo de actividad (pH 2) coincide con los valores reportados para extractos similares de los peces sábalo, surubí, lenguado y cojinúa amarilla (*Carangoides bartholomaei*) (Acevedo Gomez et al. 2018:2019b, Candiotta et al. 2017, Silva et al. 2022b). La determinación del pH óptimo de una enzima es esencial ya que constituye un indicador para su potencial aplicación en diferentes procesos (Mohanty et al. 2020). Estos resultados indican que tanto el EP, como las pepsinas de pacú, podrían ser utilizadas para la hidrólisis de proteínas alimentarias. El medio ácido que requieren para su funcionalidad sería una ventaja adicional ya que contribuiría a minimizar la posible contaminación, impidiendo el óptimo crecimiento de un gran número de bacterias (Kuepethkaew et al. 2022).

Por otro lado, las proteasas digestivas alcalinas de peces son activas a valores de pH neutro o ligeramente alcalino. Para diversos sustratos sus óptimos se sitúan en el rango de pH 7,5 - 11,0, mientras que en medios ácidos se tornan inestables perdiendo actividad debido a su desnaturalización (Bougatef 2013). La actividad proteolítica del ET de pacú se mantuvo en un rango entre 5,5 y 10,0, similar a lo reportado para la raya espinosa (*Raja clavata*), el pez gato (*Pangasianodon gigas*) y la carpa mayor india (Vannabun et al. 2014, Lassoued et al. 2015, Younes et al. 2015). Presentó una actividad catalítica máxima a pH 7, valor inferior a lo reportado para los extractos con actividad tripsina de los peces lenguado, cuchumite (*Centropomus parallelus*) y carpa mayor india de 9,5; 8,0 y 10,0, respectivamente (Candiotta et al. 2017, Jesús-Ramirez et al. 2017, Mohanty et al. 2020).

El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de los extractos se puede observar en la Figura 1 (B).

Los óptimos de actividad para los extractos EP y ET coinciden en 45°C. A temperaturas inferiores, la capacidad proteolítica de ambos extractos disminuye siguiendo un mismo patrón de comportamiento. EP y ET retienen un 60% de la actividad máxima a 10°C y sólo un 20% a 0°C. Por encima de los 45°C, la actividad de EP disminuye rápidamente, inactivándose a los 60°C, mientras que esta pérdida es menos acentuada en ET, conservando el 60% de la actividad máxima a los 80°C. Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los reportados para los extractos con actividad pepsina y tripsina obtenidos de los peces gato, carpa india mayor y cuchumite (Vannabun et al. 2014, Jesús-Ramírez et al. 2017, Mohanty et al. 2020).

Al comparar los óptimos de actividad de los extractos de pacú (45°C para ambos extractos) con los de las enzimas comerciales de pepsina y tripsina de origen porcino (60°C), se puede observar que la disponibilidad de fuentes de enzimas proteolíticas que operen a temperaturas moderadas resultaría atractiva para la industria. El uso de pepsinas y tripsinas aisladas de peces tendría un impacto positivo en la disminución de los costos de servicio auxiliar de los procesos que utilizan estas enzimas.

**Efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad enzimática.** Los extractos con actividad pepsina y tripsina mostraron ser estables en rangos acotados de pH (Figura 1 C).

EP conservó actividades iguales o superiores al 60% de su actividad inicial en el rango de pH de 1,0 a 3,5, su capacidad proteolítica decae rápidamente a pHs mayores a 3,0 y se inactiva a pH 4,0. El comportamiento de EP frente al pH es similar al reportado por Bougatef et al. (2008) para la pepsina del tiburón *Smooth hound*.

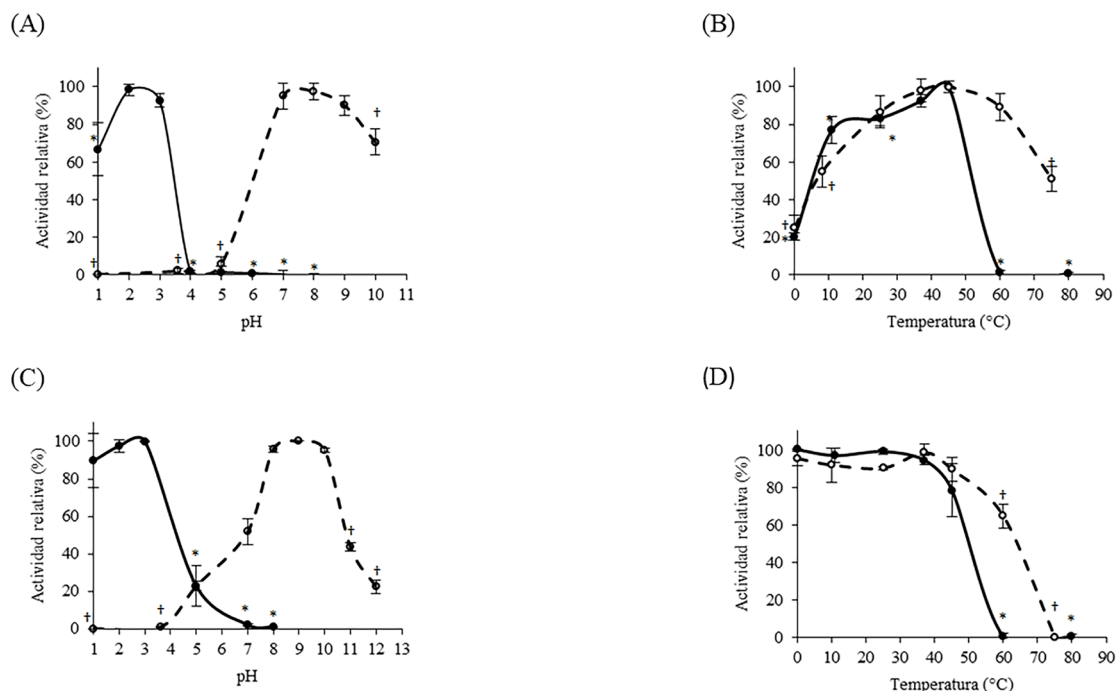
Por lo general, las proteasas ácidas de peces no son estables a pHs diferentes a su óptimo (Silva et al. 2022a). Sin embargo, existen varios estudios de extractos de proteasas ácidas de peces que muestran que estas enzimas conservan elevada capacidad proteolítica hasta pH neutros o parcialmente alcalinos (Vannabun et al. 2014, Acevedo Gomez et al. 2018:2022).

Por otra parte, ET fue estable en los intervalos de pH 7,5 - 10,5, conservando actividades iguales o superiores al 60% de su capacidad proteolítica inicial. Su actividad decrece a pH mayores a 10,0 e inferiores a 8,0 siendo más acentuado este último. Este mismo comportamiento se observó para los extractos con actividad tripsina de los peces escorpión rojo, pez gato, el jaurel amarillo y la raya espinosa al incubarse a diferentes pHs por 2h (Vannabun et al. 2014, Lassoued et al. 2015, Younes et al. 2015, Silva et al. 2022a).

Según Mohanty et al. (2020), las variaciones en las propiedades moleculares de las enzimas, incluyendo la estabilidad estructural, son los factores determinantes de las diferencias que se observan en la estabilidad frente al pH de las proteasas en las diferentes especies.

La estabilidad de los extractos en función de la temperatura se muestra en la Figura 1 (D). EP preservó más del 90% de su capacidad proteolítica inicial en el intervalo de 0 a 37°C, a temperaturas superiores la actividad residual decae marcadamente inactivándose a 60°C. El comportamiento de ET fue similar al de EP hasta los 37°C, a temperaturas superiores, sin embargo, la pérdida de actividad que experimenta es menos pronunciada. ET conserva el 89% de su capacidad proteolítica inicial a 60°C, mientras que luego de ser incubado por 2 h a 75°C pierde completamente su actividad proteolítica.

Los extractos con actividad pepsina y tripsina de pacú evidenciaron ser estables a temperaturas similares a las reportadas para los extractos de los peces lenguado, sábalo y pez gato (Acevedo Gomez et al. 2018, Candiottio et al. 2017, Vannabun et al. 2014).



**Figura 1.** Efectos del pH (A) y la temperatura (B) en la actividad proteolítica de los extractos con actividad pepsina -EP- (●) y tripsina -ET- (○) de pacú (*Piaractus mesopotamicus*). Efecto del pH (C) y la temperatura (D) en la estabilidad enzimática de los extractos EP (●) y ET (○) luego de ser incubados durante 120 min en las condiciones seleccionadas. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SD (n = 3, \* p < 0,05; EP, †p < 0,05; ET).

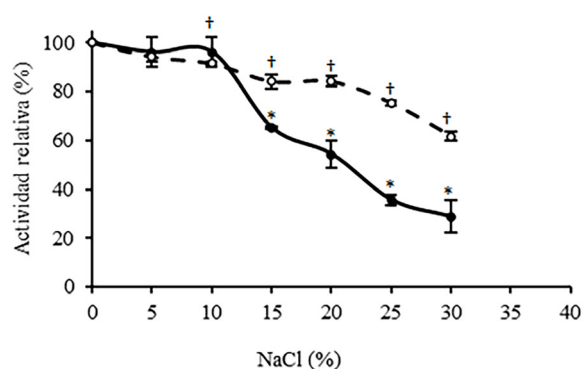
**Efecto del NaCl en la actividad enzimática.** En este trabajo al evaluar la actividad de los extractos EP y ET en un rango de 0 - 30% NaCl se observó un decaimiento de la actividad conforme se incrementa la concentración de la sal (Figura 2).

EP demostró ser más sensible que ET a la presencia de NaCl, registrando una disminución de su actividad proteolítica en un rango del 35 al 60% de su actividad inicial después de ser incubado con concentraciones de NaCl entre 15 y 30%. Este comportamiento es consistente con la disminución de la actividad proteolítica reportada para los extractos de los peces cojinúa amarilla, sábalo, carpa india mayor y jaurel amarillo expuestos a concentraciones crecientes de NaCl (Acevedo Gomez et al. 2018, Mohanty et al. 2020, Silva et al. 2022a, Silva et al. 2022b).

En contraste, ET preservó entre el 90 y el 61% de su actividad proteolítica inicial al pre-incubarse 2 h con el mismo rango de concentración de NaCl. Resultados similares fueron reportados para los extractos alcalinos de los peces sardina real (*Sardinops melanostictus*) y pez gato (Klomklao et al. 2008, Vannabun et al. 2014).

Khaled et al. (2011) han sugerido que la disminución en la actividad proteolítica de las proteasas de peces frente al NaCl se debe al efecto de *salting-out*. Es posible que al incrementar la fuerza iónica del medio el NaCl compita con la enzima en la unión del agua, generando una interacción proteína-proteína más fuerte que conduce a su precipitación.

El interés industrial en estudiar el efecto de elevadas concentraciones de NaCl sobre la actividad de las enzimas proteolíticas radica en evaluar la factibilidad de emplearlas como aditivos para acelerar la fermentación en productos con alto contenido de sales, por ejemplo, en la salsa de pescado (20-25% de NaCl) (Vannabun et al. 2014). Así, los resultados aquí obtenidos demuestran que ET tendría más potencial que EP para ser utilizado en estos procesos.



**Figura 2.** Efectos del NaCl en la actividad proteolítica de los extractos con actividad pepsina - EP- (●) y tripsina -ET- (○) de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) luego de ser incubados durante 2 h en las condiciones seleccionadas utilizando hemoglobina ácida y BApNA como sustratos, respectivamente. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SD (n = 3, \* p<0,05; EP, †p<0,05; ET).

**Efecto de iones e inhibidores.** En general, la presencia de los cationes divalentes  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  incrementa la capacidad proteolítica de las proteasas digestivas, tanto alcalinas como ácidas (Zhao et al. 2011, Bougategf 2013, Lassoued et al. 2015, Younes et al. 2015). No obstante, en

el presente trabajo se observó una disminución significativa en la actividad de EP y ET (aproximadamente 10%), luego de ser pre-incubadas por 30 min con 5 mM de  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$  (Tabla 1). Un efecto similar se ha reportado para el extracto con actividad pepsina del pez cojinúa amarilla que redujo el 16 y 18% de su capacidad proteolítica al ser incubado con 10 mM  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$ , respectivamente (Silva et al. 2022b). Si bien el mecanismo por el cual la actividad de las proteasas digestivas disminuye en presencia de algunos iones metálicos no se ha dilucidado completamente, se estima que influyen en la interacción de la enzima con el sustrato en el sitio activo (Silva et al. 2022a).

Los extractos de vísceras de peces pueden contener una gran diversidad de proteasas por lo que el uso de inhibidores específicos sobre estos proporciona datos valiosos sobre la naturaleza de las enzimas que se encuentran actuando en ellos.

La pepstatina A es un pentapéptido que inhibe específicamente las proteinasas aspárticas al unirse de forma no covalente con la hendidura del sitio activo de estas enzimas, bloqueando la accesibilidad del sustrato a esta región (Nalinanon et al. 2010). Este inhibidor no tuvo efecto en la actividad proteolítica del ET, en cambio prácticamente inhibió la actividad del EP (1,02% de actividad residual), Tabla 1. Este resultado confirma la presencia de proteasas ácidas tipo pepsina en el EP de pacú y es coincidente con lo reportado para extractos gástricos ácidos de diferentes especies de peces, así como para las pepsinas aisladas de esta fuente (Nalinanon et al. 2010, Candiotta et al. 2017, Acevedo Gomez et al. 2018, Kuepethkaew et al. 2022, Silva et al. 2022b).

El SBTI y el PMSF son inhibidores específicos de tripsinas y serino proteasas, respectivamente. Luego de incubarse los extractos enzimáticos con estas moléculas se observó un efecto marcado en la disminución de la actividad del ET, no así en la del EP (Tabla 1). En efecto, la actividad proteolítica del ET fue inhibida completamente por SBTI y disminuyó aproximadamente un 34% en presencia del PMSF. Estos resultados confirman la presencia de proteasas alcalinas tipo tripsina en el ET de pacú. Lassoued et al. (2015) y Nasri et al. (2015) reportaron inhibiciones similares para los extractos alcalinos de raya espinosa, y el serrano (*Serranus scriba*). En consonancia, las tripsinas purificadas de los peces dorado común (*Coryphaena hippurus*) y lisa común (*Mugil spp*) mostraron inhibiciones cercanas al 100% al ser expuestas a SBTI y PMSF (Pavlisko et al. 1999, Cardoso et al. 2020).

El EDTA es un agente quelante de iones metálicos, por lo que se lo emplea como inhibidor de metaloproteasas. En este trabajo, la actividad del EP se vio reducida parcialmente por este inhibidor, en cambio, su efecto sobre EP generó una reducción del 50% de su capacidad proteolítica (Tabla 1).

Resultados similares fueron publicados por Chong et al. (2002) quienes caracterizaron los extractos de proteasas alcalinas y ácidas del pez disco y encontraron que en presencia de EDTA su actividad proteolítica se inhibía aproximadamente un 50% y 5%, respectivamente. En consonancia, los extractos alcalinos de proteasas de los peces

El SDS (dodecilsulfato de sodio) es un surfactante iónico ampliamente utilizado para la producción de agentes

limpiadores y en múltiples aplicaciones biotecnológicas. En este trabajo se determinó la influencia del SDS a 0,05-0,10% (P/V) en la actividad enzimática de los extractos de pacú (Tabla 1).

EP disminuyó un 6% su actividad enzimática luego de ser incubado con SDS 0,005% y fue completamente inhibido con SDS 0,1% (P/V). Resultados similares fueron reportados para extractos gástricos de atún de diferentes especies con SDS 0,1%, (Nalinanon et al. 2008). La reducción de la actividad de las enzimas en presencia del SDS podría deberse a la alteración de sus estructuras debido a la interacción con este surfactante.

Por otra parte, el SDS en las concentraciones ensayadas ocasionó una disminución máxima de un 5% de la actividad enzimática inicial del ET. Estos resultados concuerdan con los reportados para diversos extractos alcalinos con actividad tripsina de peces que han demostrado una resistencia similar a la presencia de este detergente iónico. En efecto, los extractos con actividad tripsina de los peces escorpión rojo y atún blanco mantuvieron el 73 y 99% de su actividad inicial luego de ser pre-incubados con SDS 0,1% (Younes et al. 2015, Poonsin et al. 2019).

La estabilidad que muestran las proteasas alcalinas recuperadas de los desechos de pescado frente a agentes tensoactivos es lo que las convierte en potenciales aditivos para detergentes comerciales. En este sentido la economía en la producción/obtención de estas enzimas, asociadas al procesamiento y reutilización de los residuos de procesamiento de pescado, haría que estos productos sean de bajo costo para la industria (Bougatf 2013).

### Potenciales aplicaciones industriales

**Recuperación de placas radiográficas.** El *stripping* enzimático emplea proteasas para reciclar placas radiográficas usadas mediante la hidrólisis de la capa de gelatina que las recubre, recuperando así las placas de polietilenglicol (PET) y la plata en solución (Nakiboğlu et al. 2001). En este estudio, se evaluó la capacidad de los extractos de los ciegos pilóricos de pacú preparados con agua potable (ET<sub>aq</sub>-M1), solución fisiológica (ET<sub>fis</sub>-M2) y buffer Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 7,8 (ET-M3) para hidrolizar el recubrimiento de placas radiográficas desechadas. Todos los extractos fueron capaces de degradar la capa de gelatina, siendo más eficiente el preparado con agua potable (Figura 3 A). El ET<sub>aq</sub> logró remover completamente la capa de gelatina en 10 min, mientras que ET<sub>fis</sub> y ET requirieron 3 y 10 veces más de tiempo para lograrlo (29 min y 104 min, respectivamente). Se constató también, que los medios en los que se prepararon los extractos no fueron capaces *per se* de remover la capa de gelatina que recubre las placas de PET (Figura 3 B).

Son escasos los estudios reportados de *stripping* enzimático para el reciclado de placas radiográficas con proteasas alcalinas de peces. Geethanjali (2016) reportó el uso del extracto de proteasas alcalinas del pez rhou (*Labeo rohita*) a pH 8 y 40°C para recuperar placas de 2 x 2 cm, sin embargo, sin reportar el tiempo requerido para la hidrólisis completa.

Estos resultados son alentadores para el desarrollo de biorrefinerías combinadas de residuos, empleando procesos simples y de bajo costo.

**Tabla 1.** Efecto de iones e inhibidores en la actividad proteolítica de los extractos con actividad pepsina (EP) y tripsina (ET) de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando hemoglobina ácida y BApNA como sustratos, respectivamente.

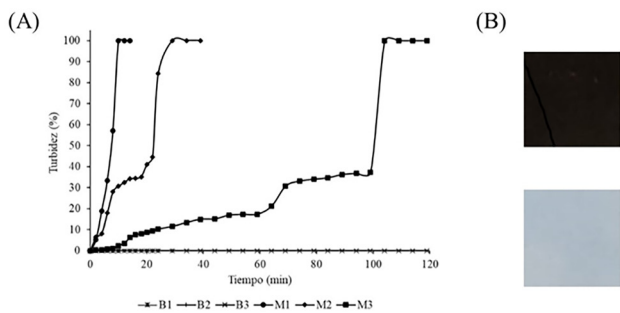
Iones Inhibidores <sup>2</sup>	Concentración	Actividad relativa (%) <sup>1</sup>	
		Extracto con actividad pepsina	Extracto con actividad tripsina
Control		100	100
<i>Iones</i>			
Ca <sup>+2</sup>	1 mM	92,58 ± 1,68	96,8 ± 5,92
	5 mM	92,91 ± 3,55	95,9 ± 5,48
Mg <sup>+2</sup>	1 mM	90,77 ± 6,09	86,4 ± 1,77
	5 mM	88,21 ± 5,01	91,4 ± 3,53
<i>Inhibidores</i>			
Pepstatina A	10 µM	1,02 ± 0,10	100 ± 0,35
PMSF	1 mM	100 ± 5,90	66,1 ± 4,99
SBTI	0,05 Mm	100,89 ± 1,96	ND
EDTA	2 mM	93,92 ± 5,56	50,2 ± 3,77
SDS	0,10% (P/V)	ND	95,0 ± 2,97
	0,005% (P/V)	93,67 ± 0,47	97,6 ± 1,77

<sup>1</sup> Los resultados se presentan como la media ± SD (n = 3).

<sup>2</sup> PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo. SBTI: inhibidor de la tripsina de soja. EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético. SDS: dodecilsulfato de sodio ND: no detectable.

**Hidrólisis de inmunoglobulinas.** La pepsina porcina es utilizada a escala industrial para la obtención de productos terapéuticos basados en anticuerpos dada su capacidad de escindir las inmunoglobulinas tipo G (IgG) generando

fragmentos F(ab')<sub>2</sub> que retienen la capacidad de reconocimiento del antígeno (Kittipongwarakarn et al. 2011) pepsin was highly effective at digesting all unwanted serum components to low molecular weight (≤13 kDa).



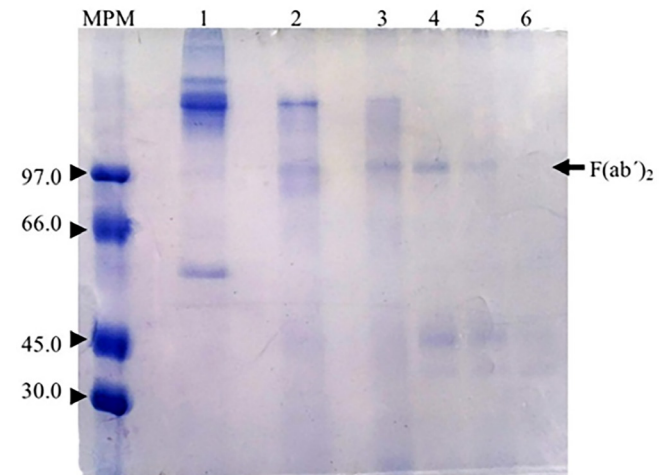
**Figura 3.** Remoción de la película de gelatina que recubre las placas rayos X por el extracto con actividad tripsina (ET) preparado con diferentes medios. A) Cinética de la hidrólisis de la capa de gelatina seguida de medidas de turbidez a 620 nm. Siendo M1 (●): extracto con actividad tripsina preparado con agua potable -ET<sub>aq</sub>-; M2 (◆): extracto con actividad tripsina preparado con solución fisiológica -ET<sub>fis</sub>-; M3 (■): extracto con actividad tripsina preparado con Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 7,8; B1 (×): blanco de ensayo de agua; B2 (|): blanco de ensayo de solución fisiológica - NaCl 0,9 % (P/V) -; B3 (x): potable blanco de ensayo de Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, pH 7,8. B) Placas de rayos X antes y después del tratamiento de hidrólisis enzimática.

Hasta el momento no existen estudios que hayan reportado el uso de extractos gástricos de peces con actividad pepsina o de pepsinas aisladas de estos organismos para este fin. En este estudio, se puede constatar mediante SDS-PAGE la capacidad del EP para obtener estos fragmentos a partir de un pool de IgG equinas (Figura 4).

En la electroforesis (línea 1) se muestra que, en el control negativo (pool de IgG incubado por 24 h con PBS) no se produjeron cambios observándose la banda correspondiente a la IgG (150 KDa). Por el contrario, en el control positivo (línea 2), constituido por IgG incubada por 24 h con pepsina porcina, se puede observar un patrón de bandas que indican que la enzima clivó las IgG produciendo un fragmento F(ab')<sub>2</sub> estable de 100 kDa y fragmentos con pesos moleculares inferiores a 50 kDa. Esto es coincidente con lo reportado por Moraes y Massaldi (2005) al digerir IgG purificada de suero equino con pepsina porcina (1 g L<sup>-1</sup> - 600 U mg<sup>-1</sup>) a pH 3 y 37°C por 24 h.

Respecto a la capacidad de EP para la generación de fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, se determinó su eficacia a distintos períodos de incubación. En la electroforesis (líneas 3 a 6) se observa, para los distintos tiempos, la disminución en la intensidad de la banda correspondiente a la IgG (150 KDa), la aparición de bandas compatibles con F(ab')<sub>2</sub> (100 kDa) y con fragmentos de tamaño variable provenientes de la región Fc (≤ 50 kDa). Luego de 3h de reacción las IgG se degradan completamente y la intensidad de las bandas compatibles con los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> es máxima. A mayores periodos de incubación la intensidad de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> disminuye, como consecuencia de la acción proteolítica del EP que genera un aumento en la intensidad de las bandas de menor peso molecular. De acuerdo a los perfiles electroforéticos, el óptimo para la obtención de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> en las condiciones ensayadas es 3 h.

Si bien el clivado con pepsina se debe optimizar para cada tipo de anticuerpo, estos resultados preliminares son alentadores para una nueva aplicación de estas enzimas de peces.



**Figura 4.** Digestión de inmunoglobulinas G (IgG) por acción del extracto con actividad pepsina (EP) de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) evaluado por SDS-PAGE en condiciones no reductoras (gel separador 10%). Siendo MPM: marcadores de peso molecular; línea 1: control negativo de IgG incubado con PBS 24 h; línea 2: control positivo de IgG degradado con pepsina porcina (0,5 mg ml<sup>-1</sup> - Sigma-Aldrich) 24 h a pH 2; línea 3: IgG incubadas con EP durante 1 h a pH 2; línea 4: IgG incubadas con EP durante 3 h a pH 2; línea 5: IgG incubadas con EP durante 12 h a pH 2; línea 6: IgG incubadas con ET durante 24 h a pH 2.

## CONCLUSIONES

En conclusión, este estudio muestra que los desechos viscerales del pacú contienen proteasas ácidas y alcalinas con actividad enzimática que los vuelve aptos para un potencial uso industrial. Su aprovechamiento para obtener productos con alto valor agregado podría representar un doble beneficio, económico y ambiental, contribuyendo a resolver los problemas de polución resultantes de su inadecuada disposición final. Se constató que los extractos EP y ET contienen enzimas del tipo pepsina y tripsina, respectivamente. Estos poseen potencial aplicación en procesos en los que se desea la máxima actividad a temperatura moderada y baja concentración de NaCl, la recuperación de plata metálica y celuloide de placas radiográficas reveladas y la obtención de productos terapéuticos. Estos resultados abren nuevas perspectivas para la economía circular de las explotaciones acuícolas del pacú.

**Agradecimientos.** Este trabajo fue apoyado por la 'Secretaría General de Ciencia y Técnica', Universidad Nacional del Nordeste (F013-2019. Res. 1015/19 CS; PICTO-UNNE 2019-00011. RESOL-2020-45-APN-DANPIDTYI#ANPIDTYI) y la Secretaría de Políticas Universitarias a Proyectos de Vinculación Tecnológica (RESOL-2018-109-APN-SECPU#MECCYT), Argentina. Los autores agradecen a la empresa Puerto Las Palmas S.A. (PLP GROUP, Chaco, Arg.) a por brindar de forma desinteresada las muestras de pacú (Pacú Teko ®.) Antonella



Acevedo Gomez y Gabriela Gomez han recibido becas de posgrado de CONICET-UNNE y Daiana Medina ha recibido beca una posgrado de CONICET, Argentina.

## ORCID

Acevedo Gomez, A.V.  <https://orcid.org/0000-0001-8970-4730>

Gomez, G.N.  <https://orcid.org/0000-0001-8918-8174>

Medina, D.M.  <https://orcid.org/0009-0000-8180-2272>

Bustillo, S.  <https://orcid.org/0000-0002-1875-7664>

Leiva, L.N.  <https://orcid.org/0000-0002-3468-6499>

## REFERENCIAS

1. Acevedo Gomez AV, Gomez G, Chamorro E, Bustillo S, Leiva LC. Digestive aspartic proteases from sábalo (*Prochilodus lineatus*): Characterization and application for collagen extraction. *Food Chem.* 2018; 269: 610-617.
2. Acevedo Gomez AV. Caracterización de pepsina de sábalo (*Prochilodus lineatus*). Evaluación de su potencial aplicación industrial. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina. 2019a. p. 40-41.
3. Acevedo Gomez AV, Gómez G, Leiva L, Bustillo S, Nerli B. Estudio de la influencia del pH en la actividad y estabilidad de un extracto gástrico con actividad pepsina de surubí. XXV Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas UNNE, Resistencia, Argentina. 2019b.
4. Acevedo Gomez AV, Bustillo S, Nerli BB. Recovery of acid proteases from fishery discards with aqueous micellar two-phase systems and their use for X-ray film recycling. *Process Biochem.* 2022; 122: 194-204.
5. Ágeirsson B, Fox JW, Bjarnason JB. Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua*. *Eur J Biochem.* 1989; 180(1): 85-94.
6. Baldissarotto B, Cyrino JEP, Urbinati EC. Biología e fisiología de peixes neotropicais de água doce. Jaboticabal: FUNEP; UNESP; c2014. p.243., Scope and Relevance. New York: Nova Science Publishers; c2014. p. 173-196.
7. Bougatef A. Trypsins from fish processing waste: Characteristics and biotechnological applications - Comprehensive review. *J Cleaner Prod.* 2013; 57: 257-265.
8. Bougatef A, Balti R, Zaied SB, Souissi N, Nasri M. Pepsinogen and pepsin from the stomach of smooth hound (*Mustelus mustelus*): Purification, characterization and amino acid terminal sequences. *Food Chem.* 2008; 107(2): 777-784.
9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72(1-2): 248-254.
10. Candiottto FB, Freitas-Júnior ACV, Neri RCA, Bezerra RS, Rodrigues RV, Sampaio LA, Tesser MB, Candiottto FB, Freitas-Júnior ACV, Neri RCA, Bezerra RS, Rodrigues RV, Sampaio LA, Tesser MB. Characterization of digestive enzymes from captive Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Braz J. Biol.* 2017; 78: 281-288.
11. Cardoso R, Souza CBD, Sarmiento F, Albuquerque D, Juarez H, Pereira V. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Trypsin purified from *Coryphaena hippurus* (*Common dolphinfish*): Purification, characterization, and application in commercial detergents. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2020; 25: 101584.
12. Chong AS, Hashim R, Chow-Yang L, Ali AB. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquacul.* 2002; 203(3-4): 321-333.
13. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. 2022. Disponible en: <https://doi.org/10.4060/cc0461en>. Último acceso #####2023
14. Friedman IS, Contreras EM. Digestive proteinases from the marine fish processing wastes of the South-West Atlantic Ocean: Their partial characterization and comparison. *J. Fish Biol.* 2021; 100: 150-160.
15. Fuchise T, Sekizaki H, Kishimura H, Klomklao S, Nalinanon S, Benjakul S, Chun BS. Simple preparation of pacific cod trypsin for enzymatic peptide synthesis. *Journal of amino acids.* 2011; 2011: 8.
16. Geethanjali S. Fish visceral protease – an alternative source for recovery of silver from waste X ray photographic films. *Asian J. Anim. Sci.* 2016; 11:159-162.
17. Jesús-Ramirez F, Álvarez-González CA, Nolasco-Soria HG, Pena E, Martínez-García R, Camarillo-Coop S, Pohlenz C. Partial characterization of digestive proteases of fat snook (*Centropomus paralellus*). *Hydrobiologica.* 2017; 27(3): 419-427.
18. Khaled HB, Ghorbel-Bellaaj O, Hmidet N, Jellouli K, Ali NEH, Ghorbel S, Nasri M. A novel aspartic protease from the viscera of Sardinelle (*Sardinella aurita*): Purification and characterisation. *Food Chem.* 2011; 128(4): 847-853.
19. Kittipongwarakarn S, Hawe A, Tantipolphan R, Lim-suwun K, Khomvilai S, Puttipipatkachorn S, Jiskoot W. New method to produce equine antirabies immunoglobulin F(ab')<sub>2</sub> fragments from crude plasma in high quality and yield. *European. J Pharm.* 2011; 78(2): 189-195.
20. Klomklao S, Kishimura H, Benjakul S. Endogenous proteinases in true sardine (*Sardinops melanostictus*). *Food Chem.* 2008; 107(1): 213-220.
21. Kuepethkaew S, Zhang Y, Kishimura H, Kumagai Y, Simpson BK, Benjakul S, Damodaran S, Klomklao S. Enzymological characteristics of pepsinogens and pepsins purified from lizardfish (*Saurida micropectoralis*) stomach. *Food Chem.* 2022; 366: 130532.
22. Laemmli RU, Beguin F, Gujer-Kellenberger G. Un factor que previene la agregación aleatoria de la principal proteína de la cabeza del bacteriófago T4. *J Mol Biol.* 1970; 47 (1): 69-85.

23. Lassoued I, Hajji S, Mhamdi S, Jridi M, Bayouhd A, Barkia A, Nasri M. Digestive alkaline proteases from thornback ray (*Raja clavata*): characteristics and applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015; 80: 668-675.
24. Mohanty B, Majumdar RK, Mohanty U, Mehta NK. Partial Purification and Characterization of Proteases from the Visceral Waste of Indian Major Carp, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Int. J. Curr. Microbiology and Applied Sciences.* 2020; 9(2): 1326-1342.
25. Montenegro LF, Cunzolo S, Preussler CA, Hennig HH, Descalzo AM, Pérez CD. Effects of stocking density on productive performance, economic profit and muscle chemical composition of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) cultured in floating cages. *Aquacult Res.* 2022; 53(9): 3379-3391.
26. Morais V, Massaldi H. Effect of pepsin digestion on the antivenom activity of equine immunoglobulins. *Toxicon.* 2005; 46(8): 876-882.
27. Nakiboğlu N, Toscali D, Yaşa İ. Silver recovery from waste photographic films by using enzymatic method. *Turk J Chem.* 2001; 25(3): 349-353.
28. Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H. Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chem.* 2010; 121(1): 49-55.
29. Nalinanon S, Benjakul S, Visessanguan W, Kishimura H, Tuna pepsin: Characteristics and its use for collagen extraction from the skin of threadfin bream (*Nemipterus spp.*). *J. Food Sci.* 2008; 73(5): 413-419.
30. Nasri R, Abed H, Karra-châabouni M, Nasri M, Bougatef A. Digestive alkaline proteinases from *Serranus scriba* viscera: Characteristics, application in the extraction of carotenoproteins from shrimp waste, and evaluation in laundry commercial detergents. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2015; 4(3): 355-361.
31. Pavlisko A, Rial A, Coppes Z. Purification and characterization of a protease from the pyloric caeca of menhaden (*Brevoortiu spp*) and mullet (*Mugil spp*) from the southwest atlantic region. *J Food Biochem.* 1999; 23(2): 225-241.
32. Poonsin T, Simpson BK, Benjakul S, Visessanguan W, Yoshida A, Osatomi K, Klomklao S. Anionic trypsin from the spleen of albacore tuna (*Thunnus alalunga*): Purification, biochemical properties and its application for proteolytic degradation of fish muscle. *Int J Biol Macromol.* 2019; 133: 971-979.
33. Korkmaz K, Tokur B. Optimization of hydrolysis conditions for the production of protein hydrolysates from fish wastes using response surface methodology. *Food Biosci.* 2022; 45, 101312
34. Silva JAF, Silva MKS, Silva TA, Costa LDA, Leal MLE, Bezerra RS, Costa HMS, Freitas-Júnior ACV. Obtainment and characterization of digestive aspartic proteases from the fish *Caranx hippos* (Linnaeus, 1766). *Braz. J. Biol.* 2022 a; 82: 1-7.
35. Silva MKS, Silva TA, Silva JAF, Costa LDA, Leal MLE, Bezerra RS, Costa HMS, Freitas-Júnior ACV. *Carangoides bartholomaei* (Cuvier, 1833) stomach: A source of aspartic proteases for industrial and biotechnological applications. *Braz. J. Biol.* 2022 b; 82: 1-8.
36. Torrisen KR, Male R, Trypsin Isozymes: Development, Digestion, and Structure. In: Haard NF, Simpson BK, editors. *Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality.* New York: Marcel Dekker Inc., c2000. p.215.
37. Vannabun A, Ketnawa S, Phongthai S, Benjakul S, Rawdkuen S. Characterization of acid and alkaline proteases from viscera of farmed giant catfish. *Food Biosci.* 2014; 6: 9-16.
38. Wang WJ, Huang TF. Purification and characterization of a novel metalloproteinase, acurhagin, from *Agkistrodon acutus* venom. *Thrombosis and haemostasis.* 2002; 87(04): 641-650.
39. Younes I, Nasri R, Bkhairia I, Jellouli K, Nasri M. New proteases extracted from red scorpionfish (*Scorpaena scrofa*) viscera: Characterization and application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Food Bioprod. Process.* 2015; 94: 453-462.
40. Zhao L, Budge MS, Ghaly EA, Brooks SM. Extraction, Purification and Characterization of Fish Pepsin: A Critical Review. *J. Food Process Technol.* 2011; 02(06): 1-14.



## Estudio preliminar de algunas variables de crecimiento y fertilidad en ratones de Bioterio

Romero Vidomlansky, P.R.; Vargas Schiro, F.L.; Rigoni, E.; Todaro, J.S.; Rigoni, R.G.; Aguirre, M.V.

Bioterio de la Facultad de Medicina-UNNE. Sarg. Cabral 2001, Ctes. Cap.  
Tel. +54 379 4439624. E-mail: [bioterio@med.unne.edu.ar](mailto:bioterio@med.unne.edu.ar)

### Resumen

En el presente trabajo se exponen los resultados obtenidos en el estudio comparativo del crecimiento y la fertilidad de ratones Balb/C y CF-1 del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste, al modificar las condiciones ambientales de cría y reproducción de los animales previa y posteriormente al traslado del Centro a sus nuevas instalaciones. Las características estudiadas en ambas cepas fueron: número de crías, peso según sexo previo y posterior al destete, hasta la semana 15 de vida y tasa de fertilidad. Los resultados obtenidos muestran que el traslado causó estrés en ambas cepas murinas, cuyo efecto se manifestó en la disminución de las tasas de crecimiento y fertilidad en estos animales experimentales. Estos valores resultaron no significativos estadísticamente, lo que nos permite concluir que el enriquecimiento del hábitat en las nuevas instalaciones ayudó a paliar de alguna manera el estrés de la mudanza. Este es el primer estudio sistemático realizado a este efecto y sienta las bases de otros para el seguimiento de la adaptación y producción en las nuevas instalaciones.

**Palabras clave:** Bioterio, Curvas de crecimiento, Tasa de fertilidad, Adaptación, Estrés.

## Preliminary study of some growth and fertility variables of bioterium mice

**Abstract.** In the present work, the results obtained in the comparative study of the growth and fertility of Balb/C and CF-1 mice from the Bioterium of the Faculty of Medicine of the National University of the Northeast are exposed, by modifying the environmental conditions of breeding and reproduction of the animals before and after the moving of the Center to its new facilities. The characteristics studied in both strains were: breeding number, weight according to sex before and after weaning, until to the 15th week of life, and fertility rate. The results obtained show that the moving caused stress in both murine strains, and the effect was manifested in the decrease of growth and fertility rates observed in the animals. These values were not statistically significant, which allows us to conclude that the enrichment of the habitat in the new facilities helped to alleviate in some way the stress of the move. This is the first systematic study carried out for this purpose and lays the foundations for others for monitoring the adaptation and production in the new facilities.

**Key words:** Bioterium, Growth curve, Fertility rate, Adaptation, Stress.

### INTRODUCCIÓN

La experimentación con animales de laboratorio comprende un pilar fundamental en la investigación dentro de las áreas biomédicas, como una herramienta enfocada al descubrimiento de nuevas técnicas para prevenir, aliviar y curar enfermedades en el hombre y otras especies

animales, y desarrollar productos más inocuos para la sociedad (Navarro Hernández et al. 2012).

Dentro de los animales de laboratorio, el ratón es el más utilizado en investigación debido a su pequeño tamaño, vida relativamente corta y fácil adaptación al medio, y el amplio conocimiento de su anatomía, fisiología y genética (Ayala 2021).

En la actualidad, los ratones utilizados con fines científicos provienen principalmente de bioterios, los cuales se definen como recintos construidos y habilitados con los requisitos técnicos y equipamiento suficiente para criar, mantener y experimentar con animales, garantizar su bienestar y obtener datos válidos y reproducibles (Maschi y Rogers 2021).

Las nuevas instalaciones optimizadas del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste (Bioterio Med-UNNE) fueron puestas en marcha en mayo de 2022 (Figura 1). De acuerdo a lo organizado previamente, unos días más tarde se trasladaron los animales en sus jaulas.

Las características y el periodo de adaptación a este traslado y al nuevo ambiente dependen de la adaptabilidad de los organismos al medio, y de sus interacciones. La adaptación comprende dos conceptos: 1) resistencia, la cual se relaciona con la tolerancia hacia ambientes extremos que tienen los organismos, tejidos o enzimas, y se correlaciona con los límites naturales de las especies, y 2) capacidad adaptativa, que permite la actividad normal en una escala ambiental alterada, pero tolerable. Ambos fenómenos permiten la supervivencia y reproducción en un medio alterado y se pueden estimar mediante pruebas de estrés (Saravia y Cruz 2003).

Entre las diferentes especies, e incluso entre los diferentes individuos de una especie, se presenta una considerable variación en su capacidad de ajuste al estrés ambiental. Los animales bien adaptados se caracterizan por a) pérdida mínima de peso durante la exposición a un estrés; b) alto índice reproductor; c) gran resistencia a enfermedades, y d) longevidad y bajo índice de mortalidad (Saravia y Cruz 2003).

En el Bioterio Med-UNNE se mantienen actualmente tres cepas murinas: ratones CF-1 y Balb/C y ratas Wistar. La línea Balb/c es una de las más conocidas y utilizadas en el mundo. Comenzó a utilizarse como cepa consanguínea en 1920, permitiendo resultados exactos y repetibles con poca cantidad de animales (De la Guardia y Frías 1991).

En cuanto a la cepa CF-1 proviene de una población de ratones albinos no suizos obtenidos en 1935 en Estados Unidos, endocriados durante 20 generaciones. En la generación 21 fueron reducidos a una sola pareja de la que descienden todos los animales CF-1 actuales (Chia et al. 2005).

El aumento de masa corporal de un animal ocurre en una secuencia temporal: prenatal, posnatal hasta el destete, destete hasta la pubertad y, pubertad hasta la madurez, donde cada fase presenta diferente velocidad o tasa de desarrollo. Datos provenientes de medidas longitudinales del peso corporal pueden ser relacionados con la edad para describir la curva de crecimiento (Posadas et al. 2011).

Las curvas de crecimiento en estos roedores muestran patrones característicos dependiente de la cepa, que pueden ser utilizados en el control de situaciones de salud de los animales, permitiendo reflejar el estado nutricional e identificar características del crecimiento de los mismos (acelerado, normal o lento) (Cossio-Bolaños 2013).

La hembra del ratón suele producir entre 10 a 12 crías por parto, aunque si cuenta con las condiciones necesarias tanto ambientales y de manejo podrá llegar a tener hasta 20 crías por camada. Sin embargo, a mayor número de crías, menor peso y tamaño de las mismas (Molina Páez 2020).

Adicionalmente, el bienestar y la supervivencia de los individuos se ven amenazados por cambios ambientales; para restablecer la homeostasis y lograr adaptarse, se ponen en marcha respuestas colectivas de estrés (Koscinczuk 2014).

A fin de optimizar la calidad y los resultados de las investigaciones que se realizan en distintos centros del NEA con las cepas criadas en el Bioterio de la Facultad de Medicina-UNNE (Bioterio Med-UNNE), se hace necesario realizar un monitoreo sistemático de sus características fisiológicas, y llevar a cabo la trazabilidad de los factores bióticos y abióticos (luz, temperatura, ruido, nutrición, comportamiento, entre otros) que influyen en su reproducción y crecimiento.

De acuerdo a lo anterior, el objetivo de este estudio ha sido evaluar el crecimiento y la tasa de fertilidad de las cepas Balb/c y CF-1 pertenecientes al Bioterio Med-UNNE, previa y posteriormente al traslado de los animales a las nuevas instalaciones.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional descriptivo del crecimiento de los ratones (*Mus musculus*) de las cepas Balb/c y CF-1 del Bioterio Med-UNNE, en el periodo comprendido entre febrero y agosto del año 2022, correspondiente a la mudanza de los núcleos fundacionales y reproductivos desde la Sede Central a las nuevas instalaciones optimizadas del Bioterio (Campus Sargento Cabral).

Para los procedimientos se contó con protocolos de pesaje, sexado y control de los animales avalados por Resolución N° 0009/21 del CICUAL Med-UNNE.

Los ratones se ubicaron en la Sala de Tratamiento 1 del Bioterio Med-UNNE, a aproximadamente 23°C durante todo el día, en jaulas de plástico reforzado (de 43 x 33 x 14 cm), con tapa de acero inoxidable con comedero y sitio para bebedero incorporados a la estructura de red, con cama de viruta de pino esterilizada, con recambio 2 veces por semana. Los animales fueron alimentados *ad libitum*, con extrusado para rata-ratón (ACA Nutrición Animal) cuyo valor nutricional se expone en Tabla 1. Se les suministró el agua de bebida en frascos esterilizados con reposición cada 48 h.

**Tabla 1:** Valor nutricional del alimento utilizado para el crecimiento de los animales del Bioterio de la Facultad de Medicina-UNNE.

Parámetro	Porcentaje (%)
Humedad (Máx)	12
Proteína bruta (Mín)	23
Extracto etéreo (Mín)	5
Fibra cruda (Máx)	6
Minerales totales (Máx)	10
Calcio (Mín - Máx)	1,0 - 1,4
Fósforo (Mín - Máx)	0,5 - 0,8
Cloro	0,3
Sodio	0,2
Potasio	0,7
Magnesio	0,2
Azufre	0,16

Un único técnico capacitado en la manipulación de animales registró el peso vivo desde el nacimiento de las crías (semana 0) hasta la semana 15 de desarrollo de los animales. Este registro se realizó semanalmente durante el horario matutino (7:00 am – 8:00 am) a través de una balanza de precisión marca Redwag modelo WTC-600, con aproximación a la centésima de gramo.

De la semana 0 hasta la 5 inclusive, se tomó el promedio de peso de las crías de cada madre. Luego del pesaje en la semana 5 se realizó el destete y sexado, separando los animales en estudio según cepa, camada y sexo. La distribución se detalla en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Distribución de animales según cepa, camada y sexo a partir de la semana 5 de la experiencia.

Cepa	Nº total	Cantidad de ratones/camada	Nº de animales	Jaula
Balb/c	19	4	2 (machos)	B1m
			2 (hembras)	B1h
		4	3 (machos)	B2m
			1 (hembras)	B2h
		10	4 (machos)	B3m
			6 (hembras)	B3h
CF-1	24	12	7 (machos)	C1m
			5 (hembras)	C1h
		12	7 (machos)	C2m
			5 (hembras)	C2h

El análisis descriptivo observacional determinó el peso promedio y la desviación estándar para cada valor y se obtuvieron las primeras curvas de crecimiento “antes del destete”. A partir de la semana 5 y hasta el final del periodo de control se midió el peso por animal individualmente.

Paralelamente, se calculó la Tasa de Fertilidad para cada cepa. Se tomó un periodo de 6 meses desde la mudanza del Bioterio a las nuevas instalaciones mejoradas, comparando estos valores con los registrados durante 6 meses del año 2021, según la fórmula: número de crías/apareo.

Los apareos de la cepa CF-1 se realizaron en sistema 2 x 1 (2 hembras/1 macho), en cambio los Balb/c en sistema 1 x 1 (1 macho/1 hembra), durante todo el tiempo estudiado, según prácticas optimizadas en el Bioterio.

Los datos fueron recabados manualmente y luego trasladados a hojas de cálculo de Excel (Microsoft 2013). El análisis estadístico se realizó con el soft GraphPad Prism 9. Para constatar la calidad de los registros tomados durante el experimento, se realizó un ANOVA (análisis de varianza de una vía) para determinar si existen efectos significativos sobre las variables.

Asimismo, con el objeto de determinar cuál de los lugares podría presentar una diferencia significativa entre las medias de las variables de estudio se utilizó la prueba Tukey, con un nivel de confianza del 95%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Curvas de crecimiento.** El seguimiento del peso de los animales de la cepa CF-1 desde el nacimiento hasta la

semana 5 de vida reveló que el peso promedio al nacer fue de 1,5 g y el aumento se produjo a razón de aproximadamente 2 g por semana, a excepción de la semana 5, en la que se registró un fuerte aumento de peso.

Para la misma cepa posterior al destete, durante las semanas 6 a 15 de vida, el peso en machos fue mayor al de las hembras, siendo esta diferencia aproximadamente de 5 gramos, menor a la presentada en la literatura (Envigo 2008). Se observó un aumento de peso cercano a 0,80 g por semana en machos y 0,65 g en hembras. El aumento registrado a lo largo de todo el periodo fue de  $11 \pm 1,18$  y  $6,4 \pm 0,96$  g inferior al peso de los machos y hembras respectivamente reportado (Envigo 2008) en ratones CF-1 criados con la dieta Teklad Global Rodent Diet 2018S con un 18% de proteínas.

Por su parte, para la cepa Balb/C se registró un peso promedio al nacer de 1,63 g, siendo ligeramente mayor al informado en la bibliografía (Sánchez Treto 1995). Este peso se encuentra dentro del rango de normalidad de 1-2 g al nacimiento de esta cepa según la ficha técnica provista por el National Laboratory Animal Center (National Laboratory Animal Center-Mahidol University). Entre la semana 0 y la semana 1 de vida se produjo un marcado aumento de peso (4,7 g) que se estabilizó entre la semana 1 y 3 (aumento de aproximadamente 2 g), volviendo a registrarse un aumento mayor (4,35 g) entre las semanas 4 y 5.



**Figura 1.** Imágenes de las instalaciones mejoradas del Bioterio Med-UNNE. Ingreso y sala de producción de animales.

Posterior al destete, entre las semanas 6 a 15 de vida los datos recabados de la cepa Balb/c revelaron que el peso de los machos se mantuvo por encima del de las hembras durante todo el periodo, siendo en promedio 5,2 g mayor, menor a la diferencia de peso promedio según sexo presentada por la literatura (Envigo 2008). Se observó un aumento promedio de 0,82 y 0,42 g por semana para los machos y las hembras respectivamente. Por último, el peso promedio registrado a lo largo de todo el trayecto, fue 1,1 y 1,6 g menor en machos y hembras respectivamente en referencia a la curva tomada como control (Envigo 2008).

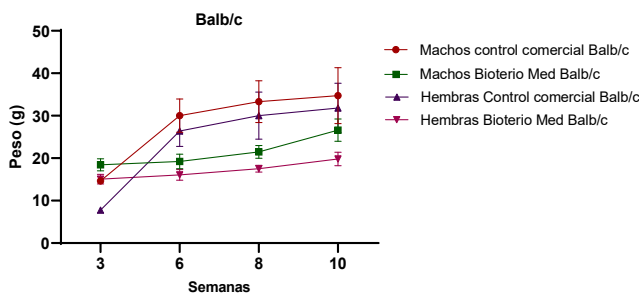
Los resultados mostraron que a partir de la semana 10, los ratones obtuvieron el peso suficiente para ser considerados adultos, y aptos para su uso en los estudios requeridos.

El peso alcanzado tanto por la cepa CF-1 como la Balb/c del Bioterio Med-UNNE es ligeramente menor al esperado para la cepa, estableciendo como patrón de calidad a las curvas de crecimiento provistas por los grandes laboratorios que crían, mantienen y comercializan esta cepa a nivel mundial (Sánchez Treto 1995, National Laboratory Center-Mahidol University 2008).

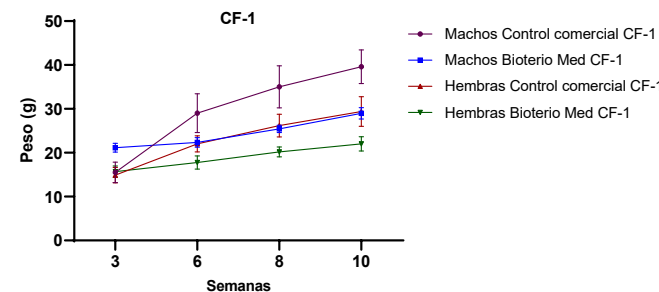
En las Figuras 2 y 3 puede observarse que no existen diferencias significativas entre las series de valores, tanto para la cepa Balb/c como para la CF-1. Esto puede deberse, al decir de Kunz (2004), a que en las nuevas instalaciones

los animales se encuentran en sitios más controlados evitando el gasto energético por factores ambientales, logrando así destinar la energía restante a los procesos de recuperación del estrés.

Los pesos corporales medios de ambas cepas tanto para los valores de animales del control y los del Bioterio Med-UNNE se fueron modificando en el tiempo de desarrollo de los animales, con efectos no significativos a las diferencias de alojamiento en las instalaciones enriquecidas. Algunos estudios previos han informado que los ratones enriquecidos, es decir, animales de laboratorios que cambian sus hábitats, que tenían pesos corporales o pesos de los órganos significativamente más pesados o más ligeros en valores medios en comparación con los animales no enriquecidos (Thiessen et al. 1962, Peters y Festing 1990). Esta variación en los resultados sugiere que los efectos del enriquecimiento pueden verse influidos por el tipo de enriquecimiento, la duración de los experimentos y el sexo y la raza de los animales examinados.



**Figura 2.** Comparación de las curvas de crecimiento de la cepa CF-1. Bioterio Med-UNNE versus cepa control



**Figura 3.** Comparación de las curvas de crecimiento de la cepa CF-1. Bioterio Med-UNNE versus cepa control

**Cálculo de tasa de fertilidad.** Los datos recabados correspondientes a la tasa de fertilidad según cepa, de dos periodos de 6 meses, uno anterior a la mudanza y otro posterior, se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Tasa de fertilidad por cepa durante 6 meses previos y posteriores al cambio de ambiente en el Bioterio Med-UNNE.

Cepa	Apareos	Crías	Tasa de fertilidad
<i>Periodo mayo-septiembre 2021</i>			
CF-1	40	428	10,7
Balb/c	28	130	4,6
<i>Periodo mayo-septiembre 2022</i>			
CF-1	28	255	9,1
Balb/c	18	64	3,6

Los resultados confirman lo esperable con respecto a la adaptación de los animales a las nuevas condiciones del ambiente (en donde las condiciones de ruido, control de olores, temperatura y humedad fueron mejorados), ya que la tasa de fertilidad disminuyó en ambas cepas. Esto concuerda con lo estudiado sobre el estrés causado por la modificación de las condiciones ambientales y la necesidad de los animales de adaptarse a las mismas (Saravia y Cruz 2003, Koscinczuk 2014).

Estos datos son de gran utilidad tanto para futuras investigaciones en murinos como para la toma de decisiones en lo que respecta a la crianza de los mismos en el establecimiento, a fin de mejorar la trazabilidad y las condiciones de trabajo.

En cuanto a la tasa de fertilidad, los resultados de este estudio indicaron que la misma disminuyó como era esperable, con el movimiento de la mudanza y el tiempo de adaptación de los animales a las condiciones del ambiente. Se requieren nuevos estudios para confirmar la relación de estas variables.

Paralelamente, este estudio sienta las bases de la importancia de un registro sistemático de las condiciones de cría y mantenimiento en el Bioterio de la Facultad de Medicina-UNNE, tendiente a la optimización de la calidad y bienestar de los animales experimentales.

**Agradecimientos.** Al Sistema Nacional de Bioterios por el otorgamiento del subsidio BFT-022 que permitió la instalación de equipamiento en las nuevas instalaciones, a la Facultad de Medicina-UNNE y al Rectorado de la Universidad Nacional del Nordeste, quienes aunaron sus esfuerzos para la construcción y optimización del nuevo Bioterio. Asimismo, a la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Facultad de Medicina UNNE que avaló el proyecto “Semillero de investigación: Modificaciones en el desarrollo y crecimiento de animales de experimentación a causa del cambio en las condiciones de alojamiento: estudio observacional y descriptivo”.

**REFERENCIAS**

1. Ayala MA. El Ratón como animal de experimentación. En: Ciencia y bienestar de los animales de laboratorio. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). 2021.
2. Chia R, Achilli F, Festing MFW, Fisher EMC. The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nat Genet.* 2005; 37(11): 1181-6.
3. Cossio-Bolaños M, Campos RG, Vargas R, Tadeu R, Fogaça H, De Arruda M. Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar *Nutr. Hosp.* 2013; 28(6): 2151-2156.
4. De La Guardia E, Frías M. Estudio preliminar de algunas características biológicas en dos sublíneas de ratones Balb/c. *Rev. Cub. Ciencias Vet.* 1991; 22(1): 47-54.
5. Envigo. Production Facility 206 [Internet]. Halsett, MI; 2008. Disponible en: <https://www.envigo.com/model/hsd-nsa-cf-1>.
6. Koscinczuk P. Ambiente, adaptación y estrés. *Rev. Vet.* 2014; 25(1): 67-76.
7. Kunz T, Orrel K. Energy cost of animal reproduction.

- Encyclopedia of Energy. Vol 5. Elsevier Inc. 2004.
8. Maschi FA, Rogers EC. Diseño y planificación de bioterios. En: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). 2021; pp. 46-59.
  9. Molina Páez EM. Comparación parámetros productivos y reproductivos a la especie *Mus musculus* del Bioparque la Reserva con la suplementación de tres dietas diferentes. 2020. Disponible en: <https://ciencia.lasalle.edu.co/zootecnia/1006>.
  10. National Laboratory Animal Center. Mahidol University. Balb/cMlac - Product Service [Internet]. Disponible en: <https://nlac-old.mahidol.ac.th/>.
  11. Navarro Hernández C, Ojeda R, Vélez V. Manual de Procedimientos Recomendables para la Investigación con Animales. Editorial SAMSARA. México. 2012.
  12. Peters A, Festing M. Population density and growth rate in laboratory mice. *Laboratory Animals*. 1990; 24: 273-279.
  13. Posadas O, Rosero RN, Rodríguez N, Costa AC. Estimación de parámetros de curvas de crecimiento de ganado Nellore criado en confinamiento. *Rev. MVZ Córdoba*. 2011; 16(3): 2701-2710.
  14. Sánchez Treto N, Pardo MLJ, Romo UT, Escofet RB, Vázquez GR, Valdés YH. Algunas características biológicas de ratones Balb/c del bioterio de la facultad de Ciencias Médicas de Ciego de Ávila. *Mediciego*. 1995; 1(1).
  15. Saravia C, Cruz G. Influencia del ambiente atmosférico en la adaptación y producción animal. *Fac. Agr. Nota técnica N° 50*. 2003; 36p. Uruguay.
  16. Thiessen DD, Zolman JF, Rodgers DA. Relation between adrenal weight, brain cholinesterase activity, and hole-in-wall behavior of mice under different living conditions. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1962; 55(2): 186-190.

Asociación Cooperadora

## de la Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional del Nordeste

Personería Jurídica N° 647/92 y 912/00

Sargento Cabral 2139

3400 Corrientes, Argentina

La Asociación Cooperadora de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE fue constituida el 10 de diciembre del año 1991 como entidad de bien público, con el objeto de promover y coadyuvar las actividades científicas, educativas y culturales relacionadas con las Ciencias Veterinarias. En tal sentido, implementa acciones para colaborar con la enseñanza, extensión, actualización y difusión científica que realiza dicha casa de estudios.

### *Beneficios que brinda a sus asociados:*

- Fotocopias con descuentos especiales en la Fotocopiadora *Copias.com* que funciona dentro del predio de la Facultad de Ciencias Veterinarias.
- Descuentos para la adquisición de libros de distintas editoriales.
- Descuentos especiales en otros rubros.

Página Web [www.vet.unne.edu.ar](http://www.vet.unne.edu.ar) • E-mail: [cooperadora@vet.unne.edu.ar](mailto:cooperadora@vet.unne.edu.ar)

Tel. +54 (379) 4423317/4423507 interno 186



## Uso de fármacos en la hembra canina preñada

Landoni, M.F. 

Cátedra de Farmacología General y Clínica, Facultad Ciencias Veterinarias, UNLP, Calle 60 y 118, La Plata, Argentina. CONICET. E-mail: [landoni@fcv.unlp.edu.ar](mailto:landoni@fcv.unlp.edu.ar)

### Resumen

Los cambios fisiológicos en la preñez inducen alteraciones profundas en las propiedades farmacocinéticas de muchos medicamentos. Estos cambios afectan la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción de los fármacos y, por lo tanto, pueden afectar sus propiedades farmacodinámicas. Es necesario comprender tanto la fisiología de la preñez como la farmacología específica de los diferentes agentes para lograr un tratamiento eficaz y limitar el riesgo materno y fetal. Desafortunadamente, la mayoría de los estudios de medicamentos excluyen a las hembras preñadas, aún cuando existen entidades patológicas que requieren ser tratadas durante la preñez (dolor, procesos infecciosos, etc). Esta revisión se inicia con un recordatorio de los conceptos básicos de farmacocinética y su relevancia clínica. Se describen los cambios fisiológicos durante la preñez y sus consecuencias en las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de muchos medicamentos. Como cierre, se analizan de manera particular las categorías terapéuticas más comúnmente indicadas en hembras preñadas.

**Palabras clave:** preñez, caninos, terapéutica, modificaciones fisiológicas, ADME.

## Use of drugs in pregnant canine

**Abstract.** Physiological changes during pregnancy induce profound alterations in the pharmacokinetic properties of many drugs. These changes affect the distribution, absorption, metabolism, and excretion of drugs and therefore may affect their pharmacodynamic properties. An understanding of both the physiology of pregnancy and the specific pharmacology of the different agents is necessary to achieve effective treatment and limit maternal and fetal risk. Unfortunately, most drug studies exclude pregnant females, even when there are pathological entities that need to be treated during pregnancy (pain, infectious processes, etc). This review begins with a reminder of the basic concepts of pharmacokinetics and their clinical relevance. Physiological changes in pregnancy and their consequences on the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of many drugs are described. As a closure, the therapeutic categories most commonly indicated in pregnant females are discussed.

**Key words:** pregnancy, canines, therapeutic, physiological alterations, ADME.

### INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista terapéutico las hembras preñadas, al igual que los gerontes y neonatos, son consideradas una población especial. Su terapéutica es una preocupación y un desafío para los profesionales médicos, tanto veterinarios como humanos.

Lo que transforma en especiales a estas poblaciones son las características fisiológicas y bioquímicas propias que conducen a cambios en la farmacocinética de los fá-

macos administrados que pueden afectar de manera significativa su eficacia terapéutica.

Es importante remarcar que la bibliografía sobre este tema en veterinaria es muy escasa, especialmente en lo referente a los cambios en la farmacocinética de los fármacos administrados a la hembra preñada. Si bien existen reportes sobre los efectos clínicos de fármacos administrados durante la preñez se refieren a casos individuales y se enfocan exclusivamente a la evolución de la patología involucrada. Esta situación nos obliga a recurrir a bibliografía de



medicina humana, la cual no siempre es extrapolable a las situaciones clínicas observadas en la clínica veterinaria.

La farmacodinamia es la rama de la farmacología que estudia los cambios que los fármacos son capaces de provocar en los organismos vivos. Si bien estos pueden ser extensos, son cambios fundamentalmente cuantitativos (estimular o inhibir una función biológica) y en ningún caso cualitativos (no existe ningún compuesto que induzca a una célula a realizar una función que no le es propia).

La farmacocinética estudia los cambios que el organismo induce en los fármacos. Permite estudiar y cuantificar el tránsito de las moléculas a través del organismo y engloba básicamente 4 procesos: absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME).

A efectos de cuantificar los procesos farmacocinéticos se generan los llamados parámetros cinéticos que reflejan la extensión o cuantía de cada uno de los procesos durante la disposición plasmática de fármacos.

Los parámetros más descriptivos y utilizados para los cálculos de dosis o para la construcción de los regímenes de dosificación son:

**Biodisponibilidad (F).** Es el porcentaje de la dosis que accede a la circulación sistémica tras la administración extravascular. Se asume que las administraciones intravasculares tienen una biodisponibilidad del 100%.

**Área bajo la curva concentración plasmática de fármaco vs tiempo (AUC).** Refleja la exposición sistémica de fármaco y permite evaluar la biodisponibilidad y la eficacia.

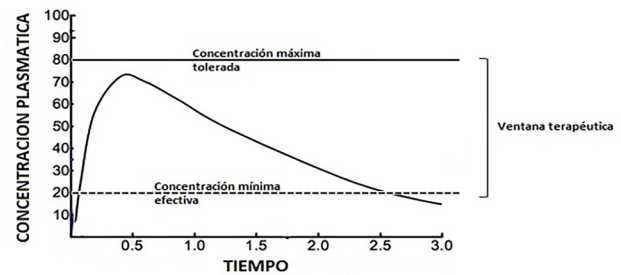
**Volumen de distribución (Vd).** Refleja la capacidad de los fármacos de distribuirse a través del organismo; su valor determina la concentración máxima en sangre (C<sub>max</sub>).

**Aclaramiento (Clearance (CLB)).** Refleja la capacidad del organismo de deshacerse de los fármacos. Este parámetro no diferencia metabolismo y excreción; está determinado por la capacidad de metabolizar fármacos (fundamentalmente del hígado) así como de la capacidad de excretar del riñón. Es uno de los más importantes para calcular la dosis.

**Vida media de eliminación.** Es un parámetro híbrido (refleja distribución y eliminación) generalmente sobrestimado tiene utilidad para calcular los intervalos interdosis.

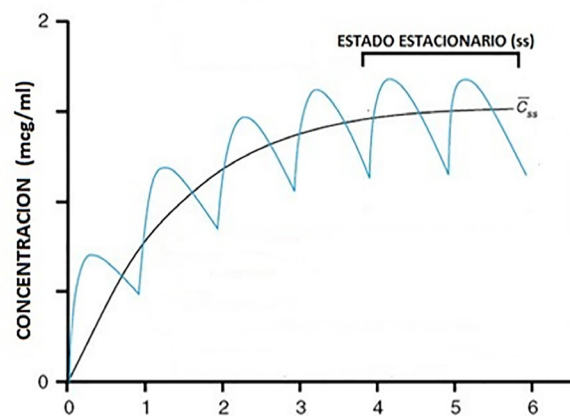
Es importante recordar que para cumplir el objetivo terapéutico planteado al seleccionar un tratamiento es necesario diseñar un régimen de dosificación. De acuerdo al objetivo propuesto se podrá requerir un tratamiento monodosis o multidosis.

En ambos casos lo que permite predecir la eficacia es la concentración sanguínea del fármaco que debe ubicarse en el interior de la llamada ventana terapéutica. Esta ventana está delimitada por la concentración mínima efectiva y la máxima tolerada. El tiempo de permanencia en ventana refleja la duración del efecto y determinará la selección del intervalo interdosis (Figura 1).



**Figura 1.** Curva de disposición plasmática de un fármaco tras su administración monodosis por vía extravascular.

En el caso de la administración de dosis repetidas (multidosis) quien permite predecir el efecto terapéutico es la llamada concentración en estado estacionario (C<sub>ss</sub>) (Figura 2).



**Figura 2.** Curva de disposición plasmática de un fármaco tras su administración multidosis por vía extravascular.

El tiempo requerido para llegar a la concentración en estado estacionario está directamente relacionado con la vida media del fármaco, requiriéndose 5 vidas medias para alcanzarlo. Si la vida media del fármaco es larga, por ejemplo 12 horas, se necesitarían 60 horas (12 x 5) para lograr que la concentración plasmática se ubique en el interior de la ventana terapéutica. Para acortar este tiempo, que dejaría al paciente sin la medicación adecuada, se hace uso de la llamada dosis de ataque, que permite alcanzar tras la primera dosis la ventana terapéutica. Una vez logrado ese objetivo el tratamiento se continúa aplicando la dosis de mantenimiento.

Al observar las Figuras, notamos que uno de los parámetros más importantes es la concentración máxima (C<sub>max</sub>) que está determinada por la dosis administrada y el volumen de distribución del fármaco. La capacidad de un fármaco de distribuirse en mayor o menor grado es reflejo de su capacidad de atravesar membranas; por lo tanto las moléculas liposolubles no ionizadas se distribuirán en mayor grado. Por otro lado, como los fármacos cuando llegan a la circulación pueden unirse a las proteínas plasmáticas (principalmente albúminas) por lo que existirán 2 fracciones, la libre y la conjugada a proteínas; dado que las proteínas por su tamaño no pueden atravesar las membranas normales (no inflamadas), solo la fracción libre saldrá

del torrente sanguíneo siendo considerada desde el punto de vista farmacológico la fracción activa.

La velocidad de disminución de las concentraciones en sangre refleja la capacidad del organismo de eliminar el fármaco. Los fármacos son eliminados del organismo por diferentes procesos. Los hidrosolubles, se eliminan fundamentalmente por filtración y/o secreción activa a nivel renal, mientras que los liposolubles requieren metabolismo que los transforma en compuestos (metabolitos) hidrosolubles/polares. El metabolismo se lleva a cabo en muchos órganos y tejidos, sin embargo, el hígado es el más importante. Entre las diferentes reacciones metabólicas de fármacos la oxidación, a través de la familia de citocromos P450, es la más común.

**La hembra preñada.** Es importante remarcar que al referirse a la terapéutica de la hembra preñada en realidad nos referimos a la unidad materno-fetal, ya que todo fármaco que se administre a la hembra preñada va a provocar efectos (mayores o menores, nocivos o inocuos) en el embrión/feto (Cooper et al. 1999).

La terapéutica de la hembra preñada es, como se mencionó previamente, un desafío. Ante la llegada de una hembra preñada al consultorio, hay ciertas preguntas que el clínico debe hacerse; la primera: *si es imprescindible tratarla farmacológicamente* y la segunda, *si la patología permite (aplicando medidas de contención) retrasar el inicio del tratamiento hasta finalizada la preñez.*

La hembra preñada, desde el punto de vista farmacocinético, es una paciente con importantes cambios fisiológicos que modificarán de manera significativa el perfil de disposición de los fármacos (Pavek et al. 2009).

**Cambios fisiológicos durante la preñez con efecto sobre la farmacocinética de los fármacos.** Los cambios fisiológicos más importantes (por sus consecuencias en los procesos farmacocinéticos) se observan a nivel cardiovascular (Pacheco et al. 2013). Éstos tienen un ritmo temporal, siendo máximos al día 40 de la preñez; posteriormente comienzan a descender hasta alcanzar los valores de la hembra no preñada el día 20-30 postparto (Ward et al. 2020).

El cambio más notorio es el aumento entre el 30 y el 40% del gasto cardíaco. Los mecanismos de este aumento no son claros; por un lado existe evidencia de una disminución de la resistencia vascular periférica inducida por las hormonas gestacionales que activa el sistema renina-angiotensina-aldosterona, conduciendo al incremento en la reabsorción de sodio a nivel renal y por ende, al aumento del volumen sanguíneo (Pacheco et al. 2013, Costantine 2014, Almeida et al. 2017).

Asimismo, se observa un cambio en los flujos sanguíneos regionales a los diferentes órganos, con un aumento a nivel genitourinario y piel y una disminución compensatoria en el músculo esquelético (Metcalf et al. 1955).

El aumento del flujo sanguíneo de la piel tiene el objetivo de disipar el calor producido por el feto. El flujo sanguíneo hepático no sufre modificaciones a diferencia del renal que sufre un aumento importante, reflejado por el incremento de la tasa de filtración glomerular (Ginsburg y Duncan 1967).

Otro cambio fisiológico importante, relacionado al aumento del volumen sanguíneo, es el cambio en la distribución del agua corporal, con una expansión del espacio extracelular y, en menor medida, del intracelular (Pavek et al. 2009).

A nivel respiratorio, se observa una estimulación del centro respiratorio (inducida por progesterona) que conduce al aumento en la presión parcial de oxígeno con una disminución en la presión parcial de CO<sub>2</sub> (para facilitar el pasaje del CO<sub>2</sub> del feto a la madre) (LoMauro y Aliverti 2015). Para compensar, aumenta la excreción renal de bicarbonato, lo que conduce a una disminución del bicarbonato sérico con un leve aumento del pH sanguíneo; es decir que hay un estado de alcalosis respiratoria parcialmente compensada (Pacheco et al. 2013). Es importante remarcar que los estados de alcalosis pueden afectar la unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas (Tillement et al. 1978).

Con respecto a la concentración plasmática de albúminas hay caída neta por cambios en el ciclo de síntesis/catabolismo hepático (Papich y Davis 1986).

Es importante remarcar, que no todos estos cambios tendrán consecuencias clínicamente apreciables (Loebstein et al. 1997). Se debe poner especial atención en los fármacos con ventana terapéutica estrecha, los cuales verán modificado su efecto clínico (aumentado o disminuido) lo que en muchos casos obligará a aplicar correcciones en el régimen de dosificación (Pavek et al. 2009).

#### **Absorción de fármacos en la hembra preñada.**

**Vías enterales.** A nivel gastrointestinal se observan numerosos cambios fisiológicos con potencial capacidad de modificar la absorción de fármacos

Por acción de progesterona se induce la disminución de la velocidad de vaciado gástrico (Alqudah et al. 2022) y de la motilidad del intestino delgado (Lawson et al. 1985). Estos cambios pueden provocar un aumento del tiempo de aparición de la concentración máxima (T<sub>max</sub>), lo que se va a traducir en un aumento del tiempo de latencia del efecto (Pacheco et al. 2013).

A nivel gástrico disminuye la secreción de hidrogeniones lo que conduce a una elevación del pH acompañado por un aumento en la producción de moco (Pavek et al. 2009). La consecuencia del cambio de pH va a afectar a los fármacos ácidos, que se van a absorber menos (porque van a estar más ionizados y por ende menos liposolubles), lo contrario pasará con los básicos (Rowland y Tozer 2011). Con respecto a los fármacos sensibles al pH ácido (como la eritromicina), la biodisponibilidad estará aumentada (Cooper et al. 1999).

**Vías parenterales.** En el caso de la administración intramuscular, por la disminución del flujo sanguíneo local, la absorción será lenta y escasa, lo que se reflejará en un T<sub>max</sub> más prolongado y una C<sub>max</sub> menor que la observada en la hembra no preñada (Krauer y Krauer 1977).

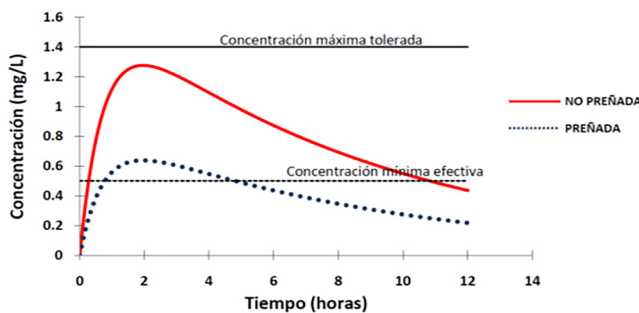
Lo contrario se observa a nivel subcutáneo, ya que el flujo sanguíneo a este nivel está aumentado, lo que conduce a una absorción mayor y más rápida reflejada por un T<sub>max</sub> más corto y una C<sub>max</sub> mayor (Soldin y Mattison 2009).

### Distribución de fármacos en la hembra preñada.

Los cambios en el proceso de distribución son consecuencia directa de los cambios a nivel cardiovascular y de la redistribución del agua corporal. Considerando el aumento del volumen plasmático, con el consecuente aumento del espacio vascular y extravascular, se creará un mayor espacio para la dilución de los fármacos. En consecuencia el volumen de distribución se verá aumentado (Pavek et al. 2009).

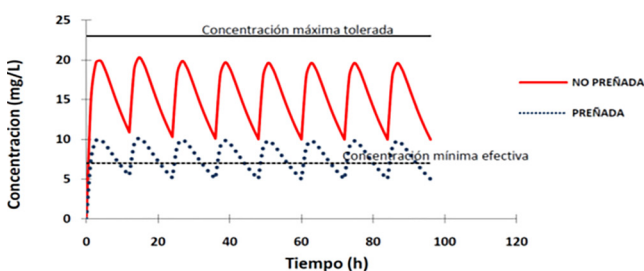
En el caso de los fármacos liposolubles con alta unión a proteínas plasmáticas, la baja concentración de albúminas incrementará aún más el volumen de distribución (Frederiksen 2001) incrementando el acceso del fármaco al feto (Rebuelto y Loza 2010).

En un esquema de administración monodosis, y considerando que la dosis administrada es la indicada para la hembra no preñada, el aumento del volumen de distribución conducirá a una disminución de la  $C_{max}$  y del AUC, lo que resulta en un acortamiento del tiempo durante el cual las concentraciones plasmáticas estarán por encima de la concentración mínima efectiva (Figura 3).



**Figura 3.** Consecuencias de las alteraciones del proceso de distribución sobre la curva de disposición plasmática de un fármaco tras su administración monodosis por vía extravascular.

En un esquema de administración multidosis, el más utilizado en la práctica, el aumento del volumen de distribución, conduce a la disminución de la concentración en estado estacionario (Figura 4).



**Figura 4.** Consecuencias de las alteraciones del proceso de distribución sobre la curva de disposición plasmática de un fármaco tras su administración multidosis por vía extravascular.

Una solución para mantener las concentraciones plasmáticas por encima de la mínima efectiva sería el aumento de la dosis administrada. Sin embargo, la corrección no es tan simple ya que, como se mencionó previamente, se podría generar toxicidad en el feto (Abdelwahab et al.

2022). En la segunda parte de la revisión, se discutirán las posibles soluciones a estas situaciones para los fármacos más indicados en las hembras gestantes.

### Eliminación de fármacos en la hembra preñada.

Los fármacos se metabolizan con el objetivo de aumentar su excreción, por lo que este proceso conduce a un aumento de la hidrosolubilidad/polaridad de las moléculas. Los fármacos altamente hidrosolubles no sufren un metabolismo importante; por el contrario cuanto más liposoluble es un fármaco mayor será su metabolismo (Rowland y Tozer 2011).

Las reacciones metabólicas se dividen en dos categorías: de fase 1 y de fase 2. La oxidación es la más importante dentro de la fase 1 debido a que es la más común, es inducible y los metabolitos formados pueden resultar inactivos, menos activos o más activos que el fármaco madre. Dentro de las reacciones de fase 2, también llamadas de conjugación, la más importante es la glucuronooconjugación (Rowland y Tozer 2011).

El proceso de oxidación es mediado por diferentes enzimas. Las más importantes son las citocromo P450, una familia amplia de enzimas que se diferencian por sus sustratos.

Estas citocromo son modificadas de distinta manera y en distinto grado por los estrógenos y la progesterona (Noyola-Martínez et al. 2019). La mayoría son inducidas, como la 2D6, que corresponde en el perro a la 2D15, la 3A y la 2C9, que corresponde en el perro al 2C21/41 (Antonovic y Martínez 2011, Feghali et al. 2015). La inducción de estas enzimas conduce al aumento del aclaramiento (clearance) y por lo tanto, a la disminución de la vida media (Ryu y Hebert 2022). Algunos ejemplos de fármacos que se metabolizan por citocromos son fenobarbital, cloranfenicol, doxiciclina, dexametasona, clorpromacina, diazepam.

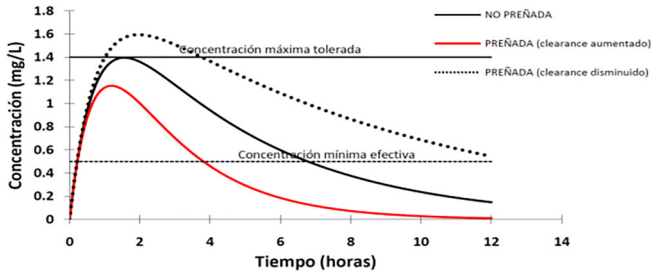
Si bien la mayoría de las citocromo son inducidas durante la preñez, una de ellas la 1A2 es inhibida; por lo tanto para los fármacos que son sustrato de esta vía metabólica, como naproxeno, paracetamol o las metilxantinas, se observará una disminución del aclaramiento, con el correspondiente alargamiento de la vida media (Noyola-Martínez et al. 2019, Pariente 2016).

Las consecuencias de la inducción enzimática en la eficacia de los fármacos son complejas y solo pueden predecirse si se conoce la actividad farmacológica de los metabolitos (Lynch y Neff 2007). Como se mencionó previamente, los metabolitos formados pueden tener mayor, menor o ninguna actividad farmacológica en relación a la droga madre, por lo tanto una inducción del metabolismo puede resultar en mayor (enrofloxacina) o menor actividad terapéutica (lincomicina) (Lynch y Neff 2007).

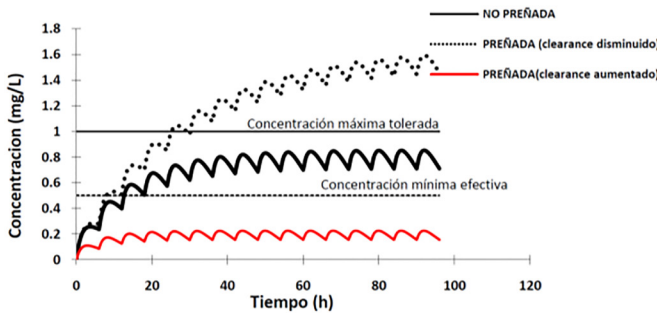
En la hembra preñada la excreción también estará profundamente modificada. Los estrógenos reducen el flujo biliar, entonces para aquellos fármacos que se excretan por bilis y sufren ciclo enterohepático habrá un retraso en la excreción, es el caso de las tetraciclinas (Anderson 2005).

A nivel renal, el importante aumento del flujo renal y de la filtración glomerular (que llega al 160% al final de la gestación) conducirá a un aumento neto de la excreción, en especial de los fármacos hidrosolubles (por ejemplo los aminoglucósidos) (Frederiksen 2001).

Los cambios en la eliminación de fármacos en la hembra preñada ya sea, por inducción /inhibición del metabolismo o incremento de la excreción conducirá a dos escenarios, el aumento y la disminución significativa del aclaramiento. Estos cambios, como se muestra a continuación conducen a la modificación del perfil plasmático de los fármacos (Figura 5 y 6).



**Figura 5.** Consecuencias de las alteraciones del proceso de eliminación sobre la curva de disposición plasmática de un fármaco tras su administración monodosis por vía extravascular.



**Figura 6.** Consecuencias de las alteraciones del proceso de eliminación sobre la curva de disposición plasmática de un fármaco tras su administración multidosis por vía extravascular.

La inhibición del metabolismo se va a reflejar como un aumento de la vida media; las concentraciones plasmáticas estarán por encima de la mínima efectiva aproximadamente por el doble de tiempo que en la hembra vacía (Pavek et al. 2009). Es importante ser cuidadosos al extraer conclusiones sobre este cambio ya que, si el fármaco tiene metabolitos activos, el resultado sobre la eficacia es la disminución de la misma (Lynch y Neff 2007).

La inducción de los sistemas enzimáticos oxidativos o el incremento en la excreción renal (en caso de fármacos hidrosolubles que no sufren metabolismo) resulta en un acortamiento de la vida media. Sin embargo, si el fármaco en cuestión tiene metabolitos más activos que la droga madre el cambio se reflejará en un aumento de la eficacia (Feghali et al. 2015).

### Corrección de los regímenes de dosificación.

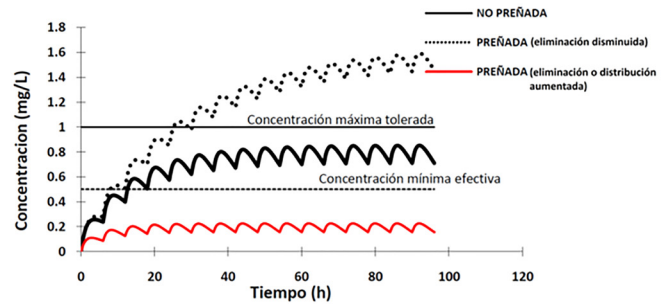
Existen dos estrategias para intentar reubicar el perfil de disposición plasmática del fármaco dentro de la ventana terapéutica: modificar la dosis o modificar el intervalo interdosis (Thummel et al. 2006).

En los diseños de dosificación monodosis, la reducción del tiempo de permanencia de las concentraciones

de fármaco dentro de la ventana terapéutica, ya sea por el aumento del volumen de distribución o del aclaramiento podría ser corregido aumentando la dosis (Mehvar 1998). Sin embargo, no es aconsejable por el riesgo de aumentar la llegada de fármaco al feto.

En los esquemas multidosis la situación es más compleja, aunque debemos recordar que la corrección de dosis o intervalo solo es necesaria cuando la concentración plasmática escapa de manera significativa de la ventana terapéutica (Thummel et al. 2006).

Un aumento en la eliminación o en la distribución se refleja en concentraciones por debajo de la mínima efectiva. Mientras que, en el caso de una disminución en la eliminación las concentraciones superarán a la máxima tolerada (Mehvar 1998) (Figura 7).

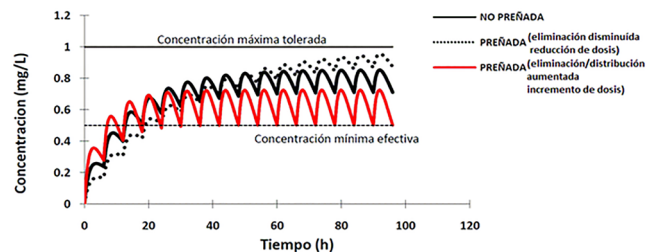


**Figura 7.** Alteraciones de la curva de disposición plasmática de un fármaco tras su administración multidosis por vía extravascular que requieren corrección.

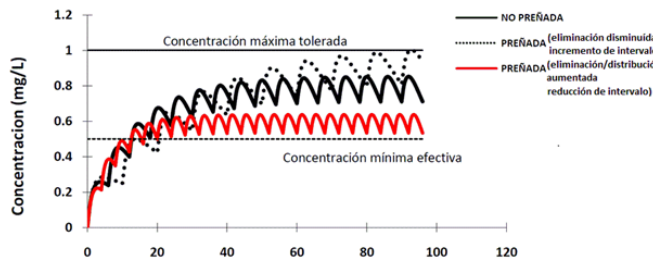
La selección del método de corrección dependerá del origen del cambio en el trazado. En el caso de una paciente con la eliminación aumentada es preferible reducir el intervalo interdosis, ya que como muestran las Figuras 8 y 9 la fluctuación de las concentraciones es menor comparado con el aumento de la dosis. Esto es consecuencia de que la fluctuación de las concentraciones depende de la relación intervalo interdosis/vida media (Mehvar 1998).

En pacientes con la eliminación disminuida por el contrario, es aconsejable disminuir la dosis ya que la fluctuación será menor (Figuras 8 y 9).

Sin embargo, las generalizaciones no son siempre apropiadas, por esa razón en las siguientes secciones se discutirá la necesidad y el método de corrección más adecuado para cada fármaco en particular.



**Figura 8.** Modificación de la curva de disposición plasmática de un fármaco tras su administración multidosis por vía extravascular aplicando corrección de dosis.



**Figura 9.** Modificación de la curva de disposición plasmática de un fármaco tras su administración multidosis por vía extravascular aplicando corrección de intervalo interdosis.

**La unidad materno-fetal.** La placenta, independientemente de su tipo (en el caso de la perra endoteliocorial), no se considera una barrera de amplia capacidad para el pasaje de fármacos al feto (Papich y Davis 1986, Audus 1999). Aún cuando posee enzimas metabolizadoras de fase 1 y 2 y transportadores del tipo P-glicoproteína y de aniones y cationes (que reforzarían su capacidad de barrera) con concentraciones circulantes de fármacos altas y/o sostenidas estos sistemas son rápidamente saturados (Rebuelto y Loza 2010).

Los fármacos liposolubles van a atravesarla fácilmente mientras que, los hidrosolubles, ionizados, polares o altamente unidos a proteínas plasmáticas lo van a hacer con mayor dificultad (Langston 2001). En general, lo único que limita el pasaje de fármaco desde la sangre de la madre al feto es el flujo sanguíneo y éste se incrementa de manera importante a medida que aumenta el tiempo de gestación (Ward 1989, Flaherty 2013).

Los fármacos que atraviesan la placenta van a llegar al feto a través de la sangre venosa umbilical; el 50% de la misma ingresa a la circulación hepática fetal y el resto atraviesa el ducto venoso (Dawes y Chowienzyk 2001). De esta manera, la mitad del fármaco podría ser metabolizado en el hígado fetal, ya que el feto a la semana 8 posee capacidad metabólica tanto de fase 1 y 2 (aunque más baja comparado con el feto humano) (Mathews 2008).

Tanto los metabolitos como los fármacos sin metabolizar difunden de regreso a la sangre materna. Sin embargo, como los metabolitos son hidrosolubles su eliminación por difusión a la sangre materna es significativamente más baja que la de los fármacos sin metabolizar (Langston 2001).

A partir del día 40 el riñón fetal tiene desarrollo suficiente para comenzar a excretar sustancias (incluidos metabolitos) al líquido amniótico (Langston 2001). Es importante remarcar que los metabolitos tanto los de fase 1 (desmetildiacepam, desmetiltramadol, etc) como los de fase 2 (morfina-6-glucurónido, tetraciclina glucurónido, etc) quedarán retenidos en el líquido amniótico lo que es una de las fuentes de acumulación de fármacos en los compartimientos fetales (Mathews 2008). Por otro lado, dado que el pH del feto es levemente más ácido que el de la madre, los fármacos liposolubles de naturaleza básica no van a difundir y también se acumularán en el feto (Mathews 2008).

### Categorías terapéuticas utilizadas comúnmente en la hembra preñada.

Es importante remarcar que solamente se debe iniciar un tratamiento cuando es indispensable. Como se

mencionó previamente, en los casos que se pueda, se debe intentar evitar por todos los medios el tratamiento farmacológico sistémico.

La Food and Drug Administration (FDA) ha establecido, basado en estudios controlados en embarazadas y estudios en animales, cinco categorías (A, B, C, D, X) para indicar el nivel de riesgo de los fármacos de producir teratogenicidad (FDA 1979) (ver Tabla 1).

Existen contados grupos de fármacos que podrían requerirse de manera inexorable aún durante la preñez, ellos son: los antiepilépticos, los analgésicos y los antimicrobianos.

**Antiepilépticos.** Si bien es un tema importante en medicina humana, en veterinaria su importancia es relativa. En primer lugar, porque ante una preñez en una hembra epiléptica la decisión más racional es el aborto. Sin embargo, existen situaciones en las cuales los tutores deciden continuar la preñez y en otros casos, hasta la buscan. Como sea, la obligación del médico veterinario es intentar llevar a término la preñez con el mínimo riesgo para la madre y la cría (en muchos casos, el veterinario se puede negar, pero los tutores la continúan sin apoyo médico, lo que en definitiva es más peligroso para la hembra y la cría).

Si bien existen numerosos fármacos antiepilépticos en el mercado, los más comúnmente utilizados (y estudiados) en caninos son la fenitoína, el fenobarbital y su pro-droga, la primidona. La complicación más importante del uso de antiepilépticos en la hembra preñada es que, excepto los bromuros, todos están clasificados como clase X, o sea con alto riesgo de provocar efectos deletéreos en el feto. Asimismo, y con la misma excepción, sufren metabolismo oxidativo hepático a través de las enzimas citocromo P450 las cuales, como se mencionó, son modificadas por los estrógenos y progesterona. Esta situación, sumada a la propia capacidad de estos fármacos de inducir el metabolismo hepático, genera situaciones clínicas difíciles de predecir, sobre las cuales los reportes son contradictorios (Dupont y Vercueil 2021).

Existen dos estrategias a seguir, la primera, cada vez más común en medicina humana, es reducir la dosis al mínimo posible y en algunos casos interrumpir el tratamiento hasta el parto (Barut 2021); la segunda es utilizar los bromuros, especialmente de potasio (más potente) (Beghi 2011). Los bromuros tienen la ventaja de no ser teratogénicos y no sufrir metabolismo hepático (HPRA 2019). Si bien se eliminan por riñón y su eliminación estaría aumentada (Baird-Heinz et al. 2012), los reportes empíricos sugieren que no es necesario modificar la dosis. Los bromuros tienen vida media muy larga (25 días), lo que implica que el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario es de alrededor de 4 meses, por lo tanto es imprescindible aplicar una dosis de ataque (Bhatti et al. 2015). Si bien hay distintos esquemas el más reportado consiste en la administración oral de 400 a 600 mg kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> divididos en 2 o tres administraciones, siempre con el alimento. Esta dosis se administra por alrededor de 5 días (se debe monitorear la concentración plasmática) y luego se continua con la dosis de mantenimiento que es de 20 a 30 mg kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup> (Bhatti et al. 2015). Este esquema implica que los responsables de la mascota deberán planificar con antelación la preñez e iniciar el tratamiento al menos 1 mes antes del servicio.

**Tabla 1.** Clasificación de fármacos de acuerdo al riesgo de provocar efectos teratogénicos (FDA 1979).

Categoría	Descripción	Ejemplos
A	Estudios controlados en animales y humanos no demuestran riesgo para el feto.	Acido ascórbico; Calcifediol; Calcio (excepto acetato), Calcitriol; Cianocobalamina; Colecalciferol ; Acido fólico; Folinato cálcico ; Gluconato de hierro ; Levotiroxina ; Piridoxina; Tirosina; Tocoferol
B	Estudios no controlados en animales no indican riesgo. No existen estudios en humanos. Se acepta su uso durante la preñez	Amoxicilina; Amoxicilina / Ácido Clavulánico; Ampicilina; Anfotericina; Azitromicina; Bencilpenicilina; Carnitina; Cefaclor; Cefadroxilo; Cefalexina; Cefalotina; Cefapirina; Cefazolina; Cefoxitina; Cefpodoxima; Ceftazidima ; Ceftriaxona; Cefuroxima; Cimetidina; Clindamicina; Clotrimazol; Cloxacilina; Eritromicina; Fosfomicina; Metronidazol; Nitrofurantoína; Penicilinas G y V; Permetrina; Sucralfato;
C	Estudios no controlados en animales demuestran efectos adversos en el feto. Su utilización debe analizarse valorando el costo beneficio	Acetazolamida; Albendazol; Amikacina; Bacitracina; Betametasona; Ciprofloxacina; Claritromicina; Clonazepam; Dexametasona; Espiramicina; Fentanilo; Furosemida; Gabapentina; Gentamicina; Griseofulvina; Itraconazol; Ketoconazol; Levofloxacina; Mebendazol; Meloxicam; Neomicina; Norfloxacina; Ofloxacina; Omeprazol; Rifampicina; Tramadol;
D	Estudios controlados demuestran evidencias de daño fetal. En ocasiones el beneficio puede superar el riesgo. Utilizar cuando no existe otra alternativa	Acido acetilsalicílico; Alprazolam; Bleomicina; Diazepam; Doxiciclina; Estreptomina; Fenitoína; Fenobarbital ; Midazolam; Minociclina; Penicilamina; Tobramicina; Acido Valproico.
X	Estudios controlados demuestran evidencias de daño fetal. El riesgo potencial supera ampliamente el beneficio. Contraindicados durante la preñez.	Torvastatina; Estradiol; Estrógeno conjugado; Finasterida; Flurazepam; Fluvastatina; Isotretinoína; Lovastatina; Misoprostol; Nandrolona; Raloxifeno; Simvastatina

**Analgésicos.** El dolor es otra situación clínica que puede presentarse en la hembra preñada y que debe ser tratada. En casos de dolor severo, la primera elección son los opioides (Mathews 2008). Dentro del grupo, los más estudiados en preñez en humanos son morfina, metadona e hidromorfona. Los reportes en caninos son escasos y se refieren al periodo periquirúrgico de las cesáreas.

Las dosis recomendadas durante la preñez son, para morfina 0,5-2 mg kg<sup>-1</sup> IM, SC c 3-4 h, para metadona (está en el país una presentación para humanos, laboratorios LIF) 1-1,5 mg kg<sup>-1</sup> IV, IM o SC c 4-6 h y para hidromorfona (Dolonovag, importado) 0,05-0,2 mg kg<sup>-1</sup> IV, IM, SC c 2-6 h.

Otros opioides, como fentanilo, meperidina, butorfanol y nalbufina no están indicados; son más liposolubles y alcanzan mayores concentraciones en el feto (Cooper et al. 1999, WSAVA 2014).

La 2da opción, cuando es posible, son los anestésicos locales los más seguros y no teratogénicos (WSAVA 2014).

Los AINEs, los alfa2 agonistas y la ketamina están contraindicados en la hembra preñada. Los AINEs son teratogénicos e interfieren el desarrollo fetal (WSAVA 2014). Los alfa 2 agonistas reducen el flujo sanguíneo uterino y pueden provocar muerte embrionaria (Flaherty 2013) y la ketamina, aumenta el tono uterino (WSAVA 2014).

**Antimicrobianos.** De los numerosos grupos de los que se dispone para tratar procesos infecciosos en caninos, son pocos los indicados para el tratamiento de la hembra

preñada.

Los antibióticos de primera línea en hembra preñada, son los betalactámicos (en especial, las penicilinas y las cefalosporinas de primera generación (cefalexina, cefradroxil, cefalotina y cefazolina) (Rebuelto y Loza 2010).

Los betalactámicos en general y las penicilinas en particular tienen un perfil cinético óptimo para uso en hembras preñadas (baja unión a proteínas plasmáticas y ausencia de metabolismo a nivel hepático). Asimismo, para el grupo no se reporta riesgo teratogénico (Mylonas 2011).

Las penicilinas se eliminan por secreción renal y si bien la eliminación renal de fármacos en las hembras preñadas está incrementada, no afecta en grado importante la eficacia (excepto en infecciones por bacterias de alto valor de CIM) (Heikkilä y Erkkola 1994). Las penicilinas, se clasifican como antimicrobianos con cinética de muerte bacteriana tiempo dependiente. Esto significa que la mayor eficacia se presenta cuando las concentraciones en sangre están por encima de CIM de la bacteria por al menos el 50% del intervalo interdosas. Es por esto, que solo en infecciones por bacterias con alto valor de CIM es necesario incrementar la dosis (Chow y Jewesson 1985, Einarson et al. 2001). De las penicilinas, las más estudiadas en hembras preñadas son la G y las bencilpenicilinas (amoxicilina y ampicilina). En los casos en que la bacteria productora de la infección ha sido identificada como Gram + no productora de betalactamasas, el compuesto de elección es la penicilina G (la más potente del grupo frente a bacterias

Gram+) (Mylonas 2011). En casos de infecciones, como las de las vías urinarias, en las cuales se desconoce si la bacteria es Gram positiva o negativa, la elección es amoxicilina. Ampicilina en caninos tiene una absorción oral errática y reducida (Papich 2013).

Con relación a la administración de las asociaciones amoxicilina-ácido clavulánico o subclactam la evidencia empírica indica que el riesgo de provocar efectos teratogénicos es bajo (Papich y Davis 1986, Rebuelto y Loza 2010).

El grupo indicado para infecciones por bacterias Gram-negativas en hembras preñadas es el de los aminoglucósidos (excepto estreptomycin y neomicina).

Estos antimicrobianos tienen un perfil cinético similar al de los betalactámicos; son moléculas polares, con baja unión a proteínas plasmáticas, distribución exclusivamente al espacio extracelular, carecen de metabolismo hepático y se eliminan por filtración glomerular. Desde el punto de vista farmacodinámico son del tipo concentración dependiente, esto significa que la mayor eficacia se presenta tras la administración de dosis altas una vez al día. Asimismo, esta estrategia de administración disminuye la incidencia de efectos tóxicos tanto a nivel del túbulo renal como en el oído interno.

Su administración en la hembra preñada debe ser cuidadosa, porque normalmente se requiere aumentar la dosis (la eficacia se asocia con una C<sub>max</sub> alta, y en la hembra preñada ésta se reduce) (Briggs et al. 2005). En preñeces avanzadas cuando el feto posee capacidad de filtración renal, el aminoglucósido se excretará al líquido amniótico y por su alta polaridad quedará retenido en el mismo con el peligro de acumulación y pasaje a todos los compartimientos fetales (Briggs 2014). De todos los compuestos, el de perfil más seguro es gentamicina (Papich y Davis 1986, Heikkila 1993).

Los macrólidos han sido utilizados en medicina humana por muchos años, sin embargo, debido a reportes contradictorios en referencia a su eficacia y seguridad, ya no se los considera de 1era elección (Fan et al. 2019, Fan et al. 2020). Los macrólidos son fármacos básicos y de gran tamaño por lo que su pasaje a través de la placenta es bajo; eritromicina es el compuesto que mayor pasaje reporta y no supera el 20%. Azitromicina, claritromicina y telitromicina no están aconsejadas para usar en hembras preñadas debido a su potencial de provocar defectos en el feto.

Con respecto a las fluoroquinolonas, no están indicadas en ningún momento de la preñez por su capacidad de reducir la osificación y provocar lesiones en el cartílago articular del feto. Se ha reportado que altas dosis producen a aborto.

Cloranfenicol está contraindicado en todas las especies por su capacidad de provocar parto prematuro acompañado del llamado síndrome del bebe gris, que refleja un colapso cardiovascular por acumulación del fármaco en los compartimientos fetales.

Las tetraciclinas afectan la osificación y el desarrollo fetal y se las asocia con hepatopatías en el feto. Solo deben utilizarse en casos donde no exista otra posibilidad de tratamiento. Si se decide la administración se aconseja no modificar la dosis.

**Consideraciones finales.** La terapéutica de las hembras preñadas es un desafío terapéutico debido a las modificaciones fisiológicas y bioquímicas de la preñez que conducen a cambios en la farmacocinética de los fármacos administrados. Ante la llegada de una hembra preñada al consultorio, no se deben olvidar las preguntas clave: ¿Es imprescindible tratarla farmacológicamente? ¿La patología permite (aplicando mediadas de contención) retrasar el inicio del tratamiento hasta el parto?.

De ser imprescindible el tratamiento, se deben buscar las opciones más seguras sin olvidar que todas ellas esconden un riesgo. Sin embargo, el conocimiento de las consecuencias que los cambios fisiológicos de nuestra paciente tendrán en el comportamiento farmacocinético del fármaco seleccionado reducirá de manera significativa los riesgos e incrementará el éxito terapéutico.

## ORCID

Landoni, M.F.  <https://orcid.org/0000-0001-7549-0866>

## REFERENCIAS

1. Abdelwahab M, Costantine M, Pacheco, L. Physiologic changes during pregnancy. In: *Clinical Pharmacology During Pregnancy*. 2022; pp. 5-17. Academic Press.
2. Almeida V, Uscategui R, Silva P, Avante M, Simões A, Vicente W. Hemodynamic gestational adaptation in bitches. *Ciência Rural*. 2017; 47.
3. Alqudah M, Al-Shboul O, Al Dwairi A, Al-U'Datt DG, Alqudah A. Progesterone inhibitory role on gastrointestinal motility. *Physiol. Res*. 2022; 2: 193-198.
4. Anderson G. Pregnancy-induced changes in pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet*. 2005; 44: 989-1008.
5. Antonovic L, Martinez M. Role of the cytochrome P450 enzyme system in veterinary pharmacokinetics: where are we now? Where are we going?. *Future Med. Chem*. 2011; 3: 855-879.
6. Audus K. Controlling drug delivery across the placenta. *Eur. J. Pharm. Sci*. 1999; 8: 161-165.
7. Baird-Heinz H, Van Schoick A, Pelsor F, Ranivand L, Hungerford L. A systematic review of the safety of potassium bromide in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 2012; 240: 705-15.
8. Barut S. Women with epilepsy, pregnancy, birth and postparture. *Trends in interprofessional care management in healthcare*. 2021; 141: 148-159
9. Beghi E. AED discontinuation may not be dangerous in seizure-free patients. *J. Neural. Transm*. 2011; 118: 187-91.
10. Bhatti S, De Risio L, Muñana K. International Veterinary Epilepsy Task Force consensus proposal: medical treatment of canine epilepsy in Europe. *BMC Vet. Res*. 2015; 11: 176-180.
11. Briggs G. *Drugs in pregnancy and lactation*. 2014; Baltimore, MD: *Williams and Wilkins*.
12. Briggs G, Freeman K, Yaffe S. *Drugs in Pregnancy and Lactation*. 2005; 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

13. Cooper J, Jauniaux E, Gulbis B. Placental transfer of fentanyl in early human pregnancy and its detection in fetal brain. *Br. J. Anaesth.* 1999; 82: 929-931.
14. Costantine M. Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy. *Front Pharmacol.* 2014; 5: 65-69.
15. Chow A, Jewesson P. Pharmacokinetics and safety of antimicrobial agents during pregnancy. *Rev. Infect. Dis.* 1985; 7: 287-313.
16. Dawes M, Chowienzyk PJ. Drugs in pregnancy. Pharmacokinetics in pregnancy. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2001; 15: 819-26.
17. Dupont S, Vercueil L. Epilepsy and pregnancy: What should the neurologists do? *Rev. Neurol.* 2021; 177: 168-179.
18. Einarson A, Shuhaiber S, Koren G. Effects of antibacterials on the unborn child: what is known and how should this influence prescribing. *Paediatr. Drugs.* 2001; 11: 803-16.
19. Fan H, Li L, Wijlaars L, Gilbert R. Associations between use of macrolide antibiotics during pregnancy and adverse child outcomes: a systematic review and meta-analysis. *PLoS one.* 2019; 14 e0212212.
20. Fan H, Gilbert R, O'Callaghan F, Li L. Associations between macrolide antibiotics prescribing during pregnancy and adverse child outcomes in the UK: population based cohort study. *Bmj.* 2020; 368:331-339
21. Feghali M, Venkataramanan R, Caritis S. Pharmacokinetics of drugs in pregnancy. *Semin. Perinatol.* 2015; 39: 512-519.
22. Flaherty D. Alpha2-adrenoceptor agonists in small animal practice 1. Why they do what they do. *In Practice.* 2013; 35: 524-530.
23. Frederiksen M. Physiologic changes in pregnancy and their effect in drug disposition. *Semin. Perinatol.* 2001; 25: 120-123.
24. Food and Drug Administration. Pregnancy categories for prescription drugs. Food and Drugs Administration. Bulletin 1979; September.
25. Ginsburg J, Duncan S. Peripheral blood flow in normal pregnancy. *Cardiovasc. Res.* 1967; 1:132-137.
26. Heikkilä A, Erkkola R. Review of beta-lactam antibiotics in pregnancy. The need for adjustment of dosage schedules. *Clin. Pharmacokinet.* 1994; 27: 49-62.
27. Heikkilä AM. Antibiotics in pregnancy—a prospective cohort study on the policy of antibiotic prescription. *Ann. Med.* 1993; 5: 467-71.
28. Irish Health Products Regulatory Authority (HPRA). Disponible en [https://www.hpra.ie/img/uploaded/swedocuments/Public\\_AR\\_VPA22622-015-001\\_07012019154725.pdf](https://www.hpra.ie/img/uploaded/swedocuments/Public_AR_VPA22622-015-001_07012019154725.pdf) 2019.
29. Krauer B, Krauer F. Drug kinetics in pregnancy. *Clin. Pharmacokinet.* 1977; 2: 167-81.
30. Langston C. Pharmacotherapy of neonates and pregnant animals. Proceedings 12<sup>th</sup> biennial Symposium AAVPT Denver, Co. 2001; 152-155.
31. Lawson M, Kern F, Everon G. Gastrointestinal transit time in human pregnancy: prolongation in the second and third trimesters followed by post partum normalization. *Gastroenterol.* 1985; 89: 996-999.
32. Loebstein R, Lalkin A, Koren G. Pharmacokinetic changes during pregnancy and their relevance. *Clin. Pharmacokinet.* 1997; 33: 328-343.
33. LoMauro A, Aliverti A. Respiratory physiology of pregnancy: physiology masterclass. *Breathe.* 2015; 11: 297-301.
34. Lynch T, Neff A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *Am. Fam. Physician.* 2007; 76: 391-396.
35. Mathews K. Pain management for the pregnant, lactating and neonatal to pediatric cat and dog. *Vet. Clin. Small. Anim.* 2008; 38: 1291-1308.
36. Mehvar R. Pharmacokinetic-based design and modification of dosage regimens. *Am. J. Pharm. Educ.* 1998; 62: 189-95.
37. Metcalfe J, Romney S, Ramsey L. Estimation of utrine blood flow in women at term. *J. Clin. Invest.* 1955; 34: 1632-1638.
38. Mylonas I. Antibiotic chemotherapy during pregnancy and lactation period: Aspects and considerations. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2011; 283: 7-18.
39. Noyola-Martínez N, Halhali A, Barrera D. Steroid hormones and pregnancy. *Gynecol. Endocrinol.* 2019; 35: 376-384.
40. Pacheco L, Costantine M, Hankins G. Physiologic changes during pregnancy. In *CLINICAL PHARMACOLOGY DURING PREGNANCY*. Elsevier Inc. 2013; 5-16.
41. Pariente G, Leibson T, Carls A, Adams-Webber T, Ito S, Koren G. Pregnancy-Associated Changes in Pharmacokinetics: A Systematic Review. *PLoS Med.* 2016; 13 e1002160.
42. Papich M. Antimicrobial Drugs. In: Washabau R, Day M editors. *Canine and Feline Gastroenterology*; W.B. Saunders. 2013; pp. 471-476
43. Papich M, Davis L. Drug therapy during pregnancy and in the neonate. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.* 1986; 16 525-538.
44. Pavék P, Ceckova M, Staud F. Variation of drug kinetics in pregnancy. *Curr. Drug. Metab.* 2009; 10: 1-9.
45. Rebuelto M, Loza M. Antibiotic treatment of dogs and cats during pregnancy. *Vet. Med. Int.* 2010; e385640.
46. Rowland M, Tozer T. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: concepts and applications. 4<sup>th</sup> edition. Philadelphia. 2011; Lippincott Williams & Wilkins.
47. Ryu R, Hebert M. Impact of pregnancy on maternal pharmacokinetics of medications. In *Clinical Pharmacology During Pregnancy*. Academic Press; 2022; pp. 19-46.



48. Soldin O, Mattison D. Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet.* 2009; 48: 143-157.
49. Tillement J, Lhoste F, Giudicelli J. Diseases and drug protein binding. *Clin. Pharmacokinet.* 1978; 3: 144-154.
50. Thummel K, Shen D, Isoherranen N, Smith H Design and optimization of dosage regimens: pharmacokinetic data. In: Brunton LL, Lazo LL, Parker KL editors, Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics 11 ed McGraw-Hill, New York. 2006; pp. 1787-1888.
51. Ward R. Maternal-placental- fetal unit: unique problems of pharmacologic studies. *Pediatr. Clin. North. Amer.* 1989; 36: 1075-1088.
52. Ward J, Mochel J , Seo Y, Sathe S. Effects of the estrous cycle and pregnancy status on cardiovascular variables in healthy bitches. *J. Vet. Cardiol.* 2020; 30: 57-68.
53. WSAVA Global Pain Council. Pregnant or lactating patients. Disponible en <https://wsava.org/wp-content/uploads/2020/01/Pregnant-or-lactating-patients.pdf> ; 2014.



## **Revista Veterinaria** mantiene su índice de impacto

Noticias de Scimago Research Group (*Scimago Journals & Country Ranks, Scopus-Elsevier*) comunican que la publicación de nuestra casa, *Revista Veterinaria*, aumentó su índice de impacto. El índice SJR mide la influencia científica (impacto) del artículo de una revista, expresando cuán importante es el "artículo promedio" de la publicación en la discusión científica global (sistema Thomson Reuters).

Para nuestra revista, tal indicador había sido de 0,03 entre 2008 y 2011, aumentando a 0,05 en 2012, a 0,11 en 2013, a 0,100 en 2017 y a 0,14 en 2022, último período evaluado. Asimismo, surge para nuestra publicación un sostenido descenso del indicador que relaciona "citas versus autocitas", demostrando que los autores de los artículos están abandonando la práctica de citar sus propias publicaciones anteriores.

Por último, se advierte que según este portal, nuestra "*Revista Veterinaria*" continúa siendo la única publicación de esta rama de la ciencia que posee índice de impacto en Argentina. Para el resto del cono sur tal distinción recae en Brasil, Chile, Colombia y Venezuela. En revistas de veterinaria, a nivel mundial el mayor índice de impacto (2,911 puntos) recae en *Annual Review of Animal Biosciences* (Estados Unidos).

Fuente: <https://www.scimagojr.com/journalsearch.php?q=7200153136&tip=sid&clean=0>. Metrics based on Scopus® data as of April 2023.

# Instrucciones a los autores

El siguiente es un compendio de las normas de publicación. Se recomienda examinar la versión completa en la página web <http://www.vet.unne.edu.ar>

---

## 1. Forma y preparación de manuscritos

- a. Lea atentamente las instrucciones y sígalas rigurosamente, esto ayudará a que la revisión y publicación del trabajo sea lo más rápida posible.
- b. Envíe sus manuscritos como documentos en formatos editables, preferiblemente como archivo .doc o .docx; escritos en hojas A4 (210 x 297 mm) numeradas correlativamente en la parte inferior derecha, utilizando tipo de letra Times New Roman tamaño 12 p., texto justificado, una columna, interlineado doble y márgenes de 3 cm.
- c. Los manuscritos no deberán ser presentados simultáneamente a otra/s revista/s.
- d. Se recomienda a los autores examinar algún ejemplar reciente de la *Revista Veterinaria* con el fin de adecuarse a su estilo y formato.
- e. Los manuscritos se revisan previamente para garantizar que la presentación se ajuste al alcance de la revista y que se cumplan los requisitos de idioma y formato.
- f. Los manuscritos enviados para publicación son evaluados por dos revisores, pertenecientes a instituciones educativas y/o de instituciones de investigación nacional como internacional.
- g. El Comité Editorial decide sobre la aceptación o rechazo del manuscrito al considerar las críticas recibidas y las correspondientes correcciones sugeridas por los revisores.
- h. Se invita a enviar nombres y contactos de correo electrónico de 2 revisores con experiencia y/o publicaciones en el área temática y sin conflicto de intereses (que no sea miembro de su universidad, ni alguien con quien haya publicado o colaborado en los últimos 3 años).

Los artículos podrán estructurarse acorde a las siguientes categorías:

Trabajos de Investigación, Comunicaciones Breves y Revisiones Bibliográficas.

## 2. Trabajos de Investigación

Son aportes originales que por la magnitud de los nuevos conocimientos generados requieren amplio desarrollo, detallada descripción metodológica, pertinente tratamiento estadístico y adecuada discusión de los resultados. Las secciones del artículo responderán al siguiente ordenamiento: título, autores, institución (con dirección), resumen, palabras clave, introducción, material y métodos, resultados, discusión (o resultados y discusión), agradecimientos y referencias. Los subtítulos principales (introducción, material y métodos, resultados, discusión

y referencias) se escribirán sobre el margen izquierdo (sin sangría), en negrita con letra inicial en mayúscula y el resto irá en minúscula. Se recomienda que el número de referencias bibliográficas no exceda las 30, que el número de autores no supere los 10 y que el número de páginas, incluidas tablas y figuras, no sea superior a 25.

## 3. Título

El título debe ser conciso, pero suficientemente informativo del contenido del trabajo, no debiendo superar los 150 caracteres, incluidos los espacios. Escriba en minúsculas, excepto la primera letra (tipo oración), resaltado en negrita, sin abreviaturas, sin subrayar y centrado. Géneros y especies, así como vocablos latinos, irán en cursiva. En el siguiente renglón, proporcione un título abreviado de hasta 50 caracteres, incluidos los espacios.

El apellido de los autores se consignará en minúsculas, excepto la primera letra, seguido de las iniciales del nombre con punto. Separe a los coautores por una coma. En el renglón siguiente escriba las institución/es a la que pertenecen los autores, incluyendo dirección postal, correos electrónicos válidos y números ORCID. Indique con números (superíndices) los lugares de trabajo de cada uno de los autores. Use un asterisco (\*) que identifique al único autor de correspondencia y proporcione su correo electrónico. Se recomienda que la cantidad de autores sea coherente con la magnitud e importancia de la investigación. Se recuerda que las normas internacionales establecen como autores a aquellos cuya contribución fue esencial en la concepción del trabajo, diseño experimental, interpretación de los resultados y redacción del artículo, por lo cual asumen la responsabilidad científica y legal de los contenidos vertidos en el mismo. Las personas que hayan colaborado en la toma de muestras, revisión del manuscrito, corrección idiomática y otros trabajos colaterales deben consignarse en **Agradecimientos**, con indicación de la labor realizada.

## 4. Resumen

Los artículos presentados en español e inglés deberán incluir resúmenes en ambos idiomas (**Resumen** y **Abstract**) y los trabajos escritos en portugués incluirán resúmenes en portugués (**Resumo**) e inglés. Los resúmenes no deben exceder las 300 palabras y contendrán una sinopsis del objetivo, metodología, resultados y conclusiones (con expresiones numéricas y significación estadística si correspondiere). Escriba en forma corrida, sin puntos y aparte. Encabece cada resumen con el título del trabajo en sendos idiomas y, a renglón seguido, hasta seis palabras clave (key words, palavras chave) o grupos de palabras, separadas por comas. Evite el uso corriente de términos técnicos de

significado restrictivo (significativo, correlación, normal, aleatorio, muestra, etc). Los resúmenes no deben contener citas bibliográficas, tablas o figuras.

#### 5. **Introducción**

Será breve y en ella se detallará en forma concisa los antecedentes, el origen del problema investigado y su importancia, reservando el último párrafo para describir el objetivo del trabajo. La introducción debe asumir el fundamento lógico del estudio, sin incurrir en revisiones extensas sobre el tema. Cada párrafo se iniciará con una sangría de 12 mm. Toda sigla o abreviatura inusual que se repita en el texto deberá ser aclarada al usarla por primera vez. Dentro del texto, coloque las citas en el sistema nombre-año, generalmente entre paréntesis, como (Volkoff 2006). En caso de citas múltiples dentro de un solo paréntesis, ordene cronológicamente a partir de la más antigua a la más reciente y si varias citas son del mismo año, ordénelas alfabéticamente. Dos o más artículos del mismo autor/es en el mismo año deben distinguirse con letras (a, b, c, etc.) después del año. Dos autores: use “y” (“and” en textos sometidos en inglés) entre apellidos, y en caso de tres o más autores: use el apellido del primer autor seguido de “et al.” (sin cursiva y sin separar el año de publicación por una coma). Citas múltiples dentro de un solo paréntesis serán separadas por coma. Ejemplo: (Hernández et al. 2012a,b, Rovira 2012, Slanac et al. 2014, Mussart y Rosas 2022).

#### 6. **Material y Métodos**

Describa los sujetos u objetos estudiados, así como los procedimientos efectuados, de tal manera que otro investigador pueda reproducir el experimento y obtener resultados semejantes. Solo se describirán in extenso los métodos nuevos o las modificaciones introducidas a métodos preexistentes, pudiendo los restantes referirse con la denominación usual de la técnica o una cita bibliográfica. Podrán utilizarse subtítulos, por ejemplo: **Sujetos experimentales, Toma de muestras, Técnicas de laboratorio**. Es importante que se indique el diseño experimental y los análisis estadísticos realizados, con el correspondiente nivel de significancia. Cuando corresponda, esta sección debe indicar el Comité de Ética que evaluó las normas que fueron adoptadas para el mantenimiento y tratamientos experimentales de animales.

#### 7. **Resultados**

Expresé los resultados en forma concreta, clara y secuencial, siendo aconsejable el uso de tablas y figuras. No incluya datos cuya obtención no esté descrita en la metodología. No repita en el texto los datos consignados en tablas y figuras. De resultar necesario, incorpore subtítulos en el texto. Los datos numéricos y las unidades de magnitud podrán ser expresados con su denominación usual (sistema métrico decimal) o aplicando el SI (sistema internacional de unidades). Se recuerda que, salvo excepciones, la mayoría de las unidades se escriben en minúsculas (excepto las derivadas de nombres propios), sin punto y solamente en singular. Los decimales se separarán con coma

(español, portugués) o con punto (inglés). Podrá optarse por la presentación conjunta de “**Resultados y Discusión**”. Gramaticalmente se sugiere el uso del modo indicativo, tanto en tiempo presente (“este hallazgo indica que...”) como pretéritos en voz pasiva (“los animales fueron examinados...”), utilizando el modo condicional cuando resultare necesario (“la alteración hallada sería similar a la descrita por...”).

8. **Tablas y Figuras**, de tamaño compatible con la caja de la Revista, se numerarán correlativamente en arábigos, con leyendas superior e inferior respectivamente, insertadas en el lugar donde se desea que aparezcan. Se confeccionarán con el mismo tipo de letra usado en el texto, en blanco y negro, sin sombreado, sin marco. La cantidad de tablas y figuras no deberá ser excesiva y guardará relación con la índole del trabajo. Todas deberán estar citadas en el texto y sus leyendas deberán ser suficientemente explicativas del contenido. Las tablas se estructurarán sin líneas verticales ni horizontales interiores, remarcando las diferencias significativas y evitando que el exceso de datos las torne confusas. Para las notas al pie de la tabla, utilice letras minúsculas en superíndice o asteriscos para indicar la significación estadística. Las figuras serán gráficos, dibujos o mapas, así como fotografías con buen contraste. Evite fotografías aisladas agrupándolas en figuras. Las figuras serán enviadas como archivos de formato estándar (TIFF, JPEG, GIF) y de alta calidad (300 dpi). En la edición impresa las figuras serán reproducidas en escala de grises mientras que en la edición On-line las figuras serán reproducidas en colores.

#### 9. **Discusión**

La discusión debe girar en torno a la interpretación de los hallazgos, sin repetir datos consignados en **Resultados**. Se centrará exclusivamente a confrontar con objetividad los nuevos conocimientos en el contexto de los antecedentes previos, así como a elaborar predicciones que puedan dar lugar a nuevas hipótesis. No deben omitirse los hallazgos contradictorios ni soslayarse las limitaciones del estudio. El último párrafo deberá contener la pertinente conclusión, donde se resaltarán los aportes más importantes de la investigación, los cuales deberán guardar estrecha relación con los objetivos planteados. No emita conclusiones que excedan el marco de los resultados.

#### 10. **Agradecimientos**

Se mencionarán a las personas o entidades que colaboraron en el desarrollo del trabajo (apoyo financiero, técnico o de otra índole), con expresa mención del tipo de ayuda proporcionada.

#### 11. **Referencias**

Todas las referencias del cuerpo del trabajo deben estar citadas en la bibliografía, y ésta no deberá contener más referencias que las consignadas en el texto. Podrán listar publicaciones periódicas, libros, tesis, anales de reuniones científicas y trabajos *On-line* siguiendo las normas Citing Medicine (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>) y nombres abreviados en National Library of Medicine (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

nlmcatalog/journals/) o (<https://academic-accelerator.com/Journal-Abbreviation-Search-Engine>).

## 12. Ejemplos de Referencias:

**Importante.** Este es un cambio con respecto a nuestras pautas anteriores y estará vigente a partir de enero de 2023.

Se listarán por orden alfabético de autores.

Artículo de revista:

Volkoff H. The role of neuropeptide Y, orexins, cocaine and amphetamine-related transcript, cholecystokinin, amylin and leptin in the regulation of feeding in fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 2006; 144: 325-331.

Volkoff H. The neuroendocrine regulation of food intake in fish: a review of current knowledge. *Front. Neurosci.* 2016; 10: 1-31.

Volkoff H, Canosa LF, Unniappan S, Cerdá-Reverter JM, Bernier NJ, Kelly SP, Peter RE. Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2005; 142(1-2): 3-19.

Libro:

Martin M. Small animal ECGs: an introductory guide. 3rd ed. Oxford (UK): John Wiley & Sons; 2015. p. 156.

Capítulo de libro:

Brooks M. von Willebrand disease. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, editors. *Schalm's veterinary hematology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; c2000. p. 509-15.

Tesis de Doctorado o Maestría:

Gutiérrez JE. Acciones de la leptina sobre la absorción de galactosa en el intestino del ternero. Tesis Doctoral (o PhD o MSci), Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina. 2003. p. 80-91.

Actas de congresos y conferencias:

Gómez HF, Candía RJ. Efectos del ácido metacresol sulfónico en las úlceras granulomatosas del caballo. XXIII Sesión de Comunicaciones Científicas, Facultad de Ciencias Veterinarias UNNE, Corrientes, Argentina. 2002. p. 72-73.

Recursos en internet:

Villagran EN. Estrategias de venta del ganado bovino de los pequeños y medianos productores ganaderos del Dpto. Chamental. *Tecnoárido*. 2022; 4 (6): 57-61. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12123/12759>. Último acceso ##### 2022.

## 13. Comunicaciones Breves

Son reportes que requieren rápida publicación (primer hallazgo), o bien investigaciones cortas, informes de avance de proyectos, descripción de nuevas técnicas,

datos de casuística y -en general- abarcarán la difusión de nuevos conocimientos factibles de ser compendios. Responderán en lo posible a la estructura del trabajo de investigación, aunque sin los títulos de las secciones (excepto para los resúmenes en ambos idiomas y referencias), pudiendo contener hasta una tabla y una figura. Se recomienda que el número de referencias no supere las 15, el número de autores no supere los 10 y que la extensión máxima no supere las 3000 palabras.

## 14. Revisiones Bibliográficas

Son compilaciones actualizadas donde se contemplan distintas opiniones sobre un mismo tema, implicando un exhaustivo examen de todos los conocimientos publicados al respecto y la elaboración de conclusiones propias a partir de una discusión crítica, requiriéndose que el autor o los autores tengan amplia experiencia en el tema. Contendrán resúmenes en ambos idiomas y se dividirán en secciones que incluyan: objetivos, subtítulos por temas (donde se efectúe la discusión de los hallazgos y se elaboren predicciones en torno a la cuestión), conclusiones y referencias (por lo menos contendrá 60 citas bibliográficas). Podrán incluir hasta 5 tablas y 5 figuras, sin exceder 50 páginas dactilografiadas. Tablas y Figuras deben ser originales, caso contrario tendrán que estar acompañadas del permiso escrito de los autores para su reproducción.

## 15. Envío de manuscritos

Los manuscritos deberán enviarse a la Dirección de la *Revista Veterinaria*, Facultad de Ciencias Veterinarias-UNNE, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina. E-mail: [revista@vet.unne.edu.ar](mailto:revista@vet.unne.edu.ar). Deberá acompañarse una solicitud de publicación firmada en conformidad por todos los autores del trabajo y una lista de verificación ([copyright](#)), donde las publicaciones pasan a ser propiedad de la revista. Los autores deberán retener copia de todo el material enviado ya que la Revista NO se responsabiliza por daño o pérdida de trabajos enviados.

En caso de tener inconvenientes por esta vía contactarse mediante correo electrónico a: Administración de la Revista Veterinaria - [secadm@vet.unne.edu.ar](mailto:secadm@vet.unne.edu.ar)

Los autores deberán prestar preferencial atención al corregir la versión final del artículo (prueba de imprenta), pues será publicada textualmente.

Las copias podrán ser obtenidas a partir de la página web citada precedentemente.

No se aceptarán trabajos efectuados sobre animales que no hayan respetado las normas éticas en vigencia (<http://medicinabuenosaires.com/vol156-96/5/animalesdexp.htm>). Las afirmaciones vertidas en los trabajos serán de exclusiva responsabilidad de los autores.

## Instruction to authors (brief version)

### Form and preparation of manuscripts

a. Please read the instructions carefully and follow them strictly, this will help the review and publication of the work to be as fast as possible.

b. Submit your manuscripts as documents in editable formats, preferably as a .doc or .docx file; written on A4 sheets (210 x 297 mm) numbered consecutively in the lower right corner, using Times New Roman font, size 12 p., justified text, one column, double spacing and 3 cm margins.

c. Manuscripts should not be simultaneously submitted to another journal/s.

d. Authors are recommended to examine a recent issue of the *Revista Veterinaria* in order to adapt to its style and format.

d. Manuscripts are pre-reviewed to ensure submission fits within the scope of the journal and that language and format requirements are met.

F. Manuscripts sent for publication are evaluated by two reviewers from to educational institutions and/or national and international research institutions.

g. The Editorial Committee decides on the acceptance or rejection of the manuscript when considering the criticisms received and the corresponding corrections suggested by reviewers.

h. You are invited to submit names and email contacts of 2 reviewers with experience and/or publications in the subject area and without conflict of interest (who must not be a member of your university, or someone you have published or collaborated with in the last 3 years).

Articles may be structured according to the following categories:

Research Article, Short Communications and Bibliographic Reviews.

### Research Articles

They are original contributions that, due to the magnitude of the new knowledge generated, require extensive development, detailed methodological description, pertinent statistical treatment and adequate discussion of the results. The sections of the article will respond to the following ordering: title, authors, institution (with address), abstract, keywords, introduction, material and methods, results, discussion (or results and discussion), acknowledgments and references. The main subheadings (introduction, material and methods, results, discussion and references) will be written on the left margin (without indentation), in bold with an initial capital letter and the rest will be in lowercase. It is recommended that the number of bibliographical references does not exceed 30, a maximum number of 10 authors per paper and that the number of pages, including tables and figures, does not exceed 25.

### Title

The title must be concise, but sufficiently informative of the content of the work, and must not exceed 150 characters, including spaces. Type in lowercase, except for the first letter (sentence type), bold highlighting, no abbreviations, no underlining, and centered. Genres and species, as well as

Latin words, will be in italics. On the next line, provide an abbreviated title of up to 50 characters, including spaces.

The authors' last name will be entered in lower case, except for the first letter, followed by the initials of the name with a period. Separate co-authors by a comma. In the next line write the institution(s) to which the authors belong, including postal address, valid emails and ORCID numbers. Indicate with numbers (superscripts) the workplace of each author. Use an asterisk (\*) to identify the sole author of correspondence and provide their email. It is recommended that the number of authors be consistent with the magnitude and importance of the research. It is recalled that international standards establish as authors those whose contribution was essential in the conception of the work, experimental design, interpretation of the results and writing of the article, for which they assume the scientific and legal responsibility of the contents poured into it. The people who have collaborated in taking samples, reviewing the manuscript, language correction and other collateral work should be mentioned in Acknowledgments, indicating the work done.

### Abstract

Articles submitted in Spanish and English must include abstracts in both languages (Resumen and Abstract) and papers written in Portuguese will include abstracts in Portuguese (Resumo) and English. The abstracts must not exceed 300 words and will contain a synopsis of the objective, methodology, results and conclusions (with numerical expressions and statistical significance if applicable). Write in continuous form, without periods and asides. Head each abstract with the title of the work in both languages and, immediately after, up to six keywords or groups of words, separated by commas. Avoid the common use of technical terms with a restrictive meaning (significant, correlation, normal, random, sample, etc). Abstracts should not contain bibliographic citations, tables or figures.

### Introduction

It will be brief and it will concisely detail the background, the origin of the researched problem and its importance, reserving the last paragraph to describe the objective of the work. The introduction should assume the logical foundation of the study, without incurring in extensive reviews on the subject. Each paragraph will start with an indentation of 12 mm. Any unusual acronym or abbreviation that is repeated in the text should be clarified when using it for the first time. Within the text, place citations in the name-year system, usually in parentheses, such as (Volkoff 2006). In case of multiple citations within a single parenthesis, order chronologically from oldest to most recent, and if multiple citations are from the same year, order them alphabetically. Two or more articles by the same author/s in the same year must be distinguished with letters (a, b, c, etc.) after the year. Two authors: use "and" between last names, and in case of three or more authors: use the last name of the first author followed by "et al." (without italics and without separating the year of publication by a comma). Multiple citations within a single parenthesis will be separated by commas. Example: (Hernández et al. 2012a,b, Rovira 2012, Slanac et al. 2014, Mussart and Rosas 2022).

## Material and methods

Describe the subjects or objects studied, as well as the procedures carried out, in such a way that another researcher can reproduce the experiment and obtain similar results. Only the new methods or the modifications introduced to pre-existing methods will be described in full, and the rest can be referred to with the usual name of the technique or a bibliographical citation. Subtitles may be used, for example: **Experimental subjects, Sampling, Laboratory techniques**. It is important to indicate the experimental design and the statistical analyzes performed, with the corresponding level of significance. When applicable, this section should indicate the Ethics Committee that evaluated the standards adopted for the maintenance and experimental treatments of animals.

## Results

Express the results in a concrete, clear and sequential way, the use of tables and figures is advisable. Do not include data whose collection is not described in the methodology. Do not repeat in the text the data contained in tables and figures. If necessary, incorporate subheadings into the text. The numerical data and the units of magnitude may be expressed with their usual denomination (decimal metric system) or by applying the SI (international system of units). Remember that, with few exceptions, most units are written in lower case (except those derived from proper names), without a point and only in the singular. Decimals will be separated with a comma (Spanish, Portuguese) or a period (English). You may opt for the joint presentation of **“Results and Discussion”**. Grammatically, the use of the indicative mood is suggested, both in the present tense (“this finding indicates that...”) and past tense in the passive voice (“the animals were examined...”), using the conditional mood when necessary (“the alteration found would be similar to that described by...”).

Tables and Figures, of a size compatible with the Journal box, will be numbered consecutively in Arabic, with upper and lower legends respectively, inserted in the place where you want them to appear. They will be made with the same font used in the text, in black and white, without shading, without a frame. The number of tables and figures should not be excessive and will be related to the nature of the work. All must be cited in the text and their legends must be sufficiently explanatory of the content. The tables will be structured without interior vertical or horizontal lines, highlighting the significant differences and avoiding that the excess of data makes them confusing. For table footnotes, use superscript lowercase letters or asterisks to indicate statistical significance. The figures will be graphs, drawings or maps, as well as photographs with good contrast. Avoid isolated photographs by grouping them into figures. The figures will be sent as standard format files (TIFF, JPEG, GIF) and high quality (300 dpi). In the printed edition the figures will be reproduced in grayscale while in the online edition the figures will be reproduced in color.

## Discussion

The discussion should revolve around the interpretation of the findings, without repeating data recorded in **Results**. It will focus exclusively on objectively confronting new knowledge in the context of previous antecedents, as well as making predictions that may give rise to new hypotheses. Conflicting findings should not be omitted or limitations of the study overlooked. The last paragraph must contain the pertinent conclusion, where the most important contributions of the research will be highlighted, which must be closely related to the proposed objectives. Do not draw conclusions that exceed the framework of the results.

## Acknowledgments

The people or entities that collaborated in the development of the work (financial, technical or other support) will be mentioned, expressly indicating the type of help provided.

## References

All the references mentioned in the body of the work must be cited in the bibliography, and this must not contain more references than those consigned in the text. They may list periodicals, books, theses, annals of scientific meetings, and online papers following the Citing Medicine standards (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>) and abbreviated names in the National Library of Medicine (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals/>) or (<https://academic-accelerator.com/Journal-Abbreviation-Search-Engine>).

## Examples of References:

Important: This is a change from our previous guidelines and will be effective from January 2023.

They will be listed in alphabetical order of authors.

### Journal article:

Volkoff H. The role of neuropeptide Y, orexins, cocaine and amphetamine-related transcript, cholecystokinin, amylin and leptin in the regulation of feeding in fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 2006; 144: 325-331.

Volkoff H. The neuroendocrine regulation of food intake in fish: a review of current knowledge. *Front. Neurosci.* 2016; 10: 1-31.

Volkoff H, Canosa LF, Unniappan S, Cerdá-Reverter JM, Bernier NJ, Kelly SP, Peter RE. Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2005; 142(1-2): 3-19.

### Books:

Martin M. Small animal ECGs: an introductory guide. 3rd ed. Oxford (UK): John Wiley & Sons; 2015. p. 156.

### Book chapter:

Brooks M. von Willebrand disease. In: Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, editors. Schalm's veterinary hematology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; c2000. p. 509-15.

### Doctoral or Master's Thesis:

Gutiérrez JE. Acciones de la leptina sobre la absorción de galactosa en el intestino del ternero. Tesis Doctoral (o PhD o MSci), Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina. 2003. p. 80-91.

### Proceedings of congresses and conferences:

Gómez HF, Candia RJ. Efectos del ácido metacresol sulfónico en las úlceras granulomatosas del caballo. XXIII Sesión de Comunicaciones Científicas, Facultad de Ciencias Veterinarias UNNE, Corrientes, Argentina. 2002. p. 72-73.

### Internet resources:

Villagran EN. Estrategias de venta del ganado bovino de los pequeños y medianos productores ganaderos del Dpto. Chemical. *Tecnoárido*. 2022; 4 (6): 57-61. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12123/12759>. Último acceso ##### 2022.

### Short Communications

They are reports that require rapid publication (first finding), or short investigations, project progress reports, description of new techniques, casuistry data and -in general- they will cover the dissemination of new knowledge that can be summarized. The organization of Short Communications will have the same structure as that of Research Articles although the titles of the different sections may be avoided (except for the abstracts in both languages, as well as references). It can contain up to a table and a figure. It is recommended that the number of bibliographical references does not exceed 15, a maximum number of 10 authors per paper and that the maximum length does not exceed 3000 words.

### Bibliographic Reviews

They are updated compilations where different opinions on the same subject are contemplated, implying an exhaustive examination of all the knowledge published in this regard and the elaboration of their own conclusions from a critical discussion, requiring that the author or authors have extensive experience in the subject. They will contain summaries in both languages and will be divided into sections that include: objectives, subtitles by topic (where the findings are discussed and predictions are made around the issue), conclusions and references (it will contain at least 60 bibliographical citations). They may include up to 5 tables and 5 figures, without exceeding 50 typed pages. Tables and Figures must be original; otherwise they must be accompanied by the written permission of the authors for their reproduction.

### Manuscript submission

Manuscripts should be sent to the E-mail: revista@vet.unne.edu.ar A request for publication signed in accordance by all the authors of the work and a checklist (copyright) must be attached, where the publications become the property of the journal. Authors should keep a copy of all the material sent since the Journal is NOT responsible for damage or loss of works sent.

In case of having inconveniences in this way, contact by email to: Administration of the *Revista Veterinaria* - secadm@vet.unne.edu.ar

The authors should pay preferential attention when correcting the final version of the article (print proof), since it will be published verbatim. Copies may be obtained from the aforementioned website.

Work carried out with animals without respecting current ethical standards (<http://medicinabuenaosaires.com/vol56-96/5/animalesdexp.htm>) will not be accepted. The statements expressed in the works will be the sole responsibility of the authors.