

VETERINARIA



Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay

Año LXXI Vol. 47 N° 182 Abril - Junio de 2011

Cerro Largo 1895 - Montevideo - Uruguay - Tel-Fax (598) 2408 6174 - 2409 9458 - E-mail: smvu@smvu.com.uy

Página Web: www.smvu.com.uy

Contenido

Editorial

Trabajo Científico - Arbitrado

Primer diagnóstico molecular y caracterización parcial del gen de la nucleoproteína del virus Distemper Canino en Uruguay **Diagnóstico - arbitrado**

Sarute, N.; Pérez, R.; Francia, L.; Hernandez, M.; Bedó, G.; Bonilla, B.; Guasco, S.; Cardeillac, A.; Panzer, Y. 7

Comunicación corta- Arbitrado

La época del año y el plano nutricional y su influencia sobre la morfología espermática en carneros Corriedale en pastoreo **Artículo Original**

López, A.; Regueiro, M.; Castrillejo, A.; Pérez-Clariget, R. 15

Comparación de tres métodos de sincronización de celos y ovulaciones con y sin inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en vaquillonas para carne **Artículo Original**

Rusiñol, C.; Cavestany, D. 23

De Interés

Intoxicación por *Senecio* spp. (Asteraceae) en equinos en Uruguay **Diagnóstico**

Rivero, R.; Matto, C.; Adrien, M.L.; Alvarez, V. 29

Este número se ubica únicamente en la página web de la SMVU.

El volumen completo (números 181-184) será impreso a fin de año y será distribuido sin costo a todos los socios de la SMVU.

Los contenidos y opiniones incluidos en los artículos son responsabilidad exclusiva de los autores.

Se autoriza la reproducción parcial o total de lo editado mencionando la fuente.

Por convenio de la SMVU y Facultad de Veterinaria (16-12-1988), el Dpto. de Documentación y Biblioteca de la Facultad de Veterinaria, se realiza el canje internacional por otras publicaciones científicas.



SOCIEDAD DE MEDICINA VETERINARIA DEL URUGUAY

(Creada el 10 de mayo de 1907)

Correo electrónico: revistavet@yahoo.com - Web: www.smvu.com.uy
ISSN 0376 - 4362 - Indizada en: Vet-CD/BEASTCD

REDACTOR RESPONSABLE:

Dr. Carlos Morón

CONSEJO EDITOR "Profesor Walter García Vidal":

Dr. Luis Barros (MSc, PhD)
Dr. Uruguaysito Benavides
Dra. Cecilia Cajarville (MSc)
Dr. Daniel Cavestany (MSc, PhD)
Dr. Ulises Cuore
Dra. Valeria Gayo (MSc)
Dra. Jacqueline Maisonnave (MSc-MPVM, PhD)
Dr. Bernardo Otero
Dr. Rodrigo Puentes (MSc)
Dra. María A. Solari

Asesor Bibliotecológico:

Elba Domínguez

ARBITROS de los TRABAJOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS (1997 - 2011)

| | | | | | |
|-------------------|-------------|-----------|--------------------|-------------|-----------|
| Arbiza, S. | (Ing. Agr.) | URUGUAY | Lazaneo, E. † | (DMV) | URUGUAY |
| Bañales, P. | (DMV) | URUGUAY | Leites, O. | (DMV) | URUGUAY |
| Berthelot, X. | (DMV) | FRANCIA | Maisonnave, J. | (DMV) | URUGUAY |
| Camarotte, D. | (DMV) | URUGUAY | Martin, E. | (DMV) | URUGUAY |
| Cajarville, C. | (DMV) | URUGUAY | Martino, P. | (DMV) | URUGUAY |
| Cardelino, R. | (Ing. Agr.) | URUGUAY | Meikle, A. | (DMV) | URUGUAY |
| Cardozo, E. | (DMV) | URUGUAY | Merola, L. | (Dr.) | URUGUAY |
| Cardozo, H. | (DMV) | URUGUAY | Orcasberro, R. | (Ing. Agr.) | URUGUAY |
| Carluccio, J. | (DMV) | URUGUAY | Oswa, T. | (DVM) | JAPÓN |
| Castrillejo, A. | (DMV) | URUGUAY | Pellegrini | (DMV) | ARGENTINA |
| Carreto, L. | (DMV) | URUGUAY | Pérez Clariget, R. | (DMV) | URUGUAY |
| Castells, D. | (DMV) | URUGUAY | Petrucci | (Ing. Agr.) | URUGUAY |
| Casas, O.R. | (DMV) | URUGUAY | Pimentel, C. | (DMV) | BRASIL |
| Cattaneo, G. | (DMV) | CHILE | Riet Correa, F. | (DMV) | BRASIL |
| Cuore, U. | (DMV) | URUGUAY | Rodríguez, H. | (DMV) | SUECIA |
| De Marco, R. | (MD) | URUGUAY | Sienra, R. | (DV) | URUGUAY |
| Dutra, F. | (DMV) | URUGUAY | Theis, J.H. | (DVM) | USA |
| Easton, C. | (DMV) | URUGUAY | Traldi, A. | (DMV) | BRASIL |
| Eddi, C. | (DMV) | ARGENTINA | Trejo González, A. | (DC) | MÉXICO |
| Eguaras, M. (DMV) | | ARGENTINA | Trica, G. | (DMV) | URUGUAY |
| Feinstein, R. | (DMV) | SUECIA | Tortora, J. | (DMV) | MÉXICO |
| Fernández, G. | (DMV) | URUGUAY | Toscano, H. | (DMV) | URUGUAY |
| Flores, E. | (DMV) | CHILE | Uriarte, G. | (DMV) | URUGUAY |
| Galosi, C. | (DMV) | ARGENTINA | Varela, G. | (DMV) | URUGUAY |
| Gayo, V. | (DVM) | URUGUAY | Vargas, L. | (DMV) | BRASIL |
| Gil, A. | (DMV) | URUGUAY | Weiblen, R. | (DMV) | BRASIL |



Este año se festejan los 250 años de la fundación de la primer Facultad de Veterinaria de Lyon Francia. Las ciencias Veterinarias ya existían mucho antes de la fundación de la Escuela de Veterinaria de Lyon, existían quienes curaban a los animales, en Egipto, en Grecia y en la Mesopotamia. Existen tratados referentes a los tratamientos de los animales y del hombre. Pero lo que hoy festejamos es la institucionalidad de la enseñanza de la profesión Veterinaria en el mundo moderno.

Los tres principios para este festejo están siendo: Veterinarios para la Salud Animal, Veterinarios para los Alimentos y Veterinarios para el Planeta.

Todos los asistentes a este 39 Congreso Buiatría, en algún momento de su vida han consumido algún medicamento o han sido tratados o van a ser tratados por alguna dolencia en especial y tomaron o van a tomar medicamentos, los cuales en su fase o protocolo de experimentación, de prueba en animales de laboratorio, fueron supervisados por Médicos Veterinarios.

Los alimentos de origen animal, que hoy disfrutan en la mesa de sus casas cualquier ciudadano del planeta, ha sido avalado como no trasmisor de enfermedades por un Veterinario.

Hoy conviven en las casas del Uruguay más de 400.000 animales de compañía, que comparten un techo, comida, afecto y hasta su cama con los dueños y los profesionales universitarios encargados de prevenir las zoonosis que pudieran transmitir esos animales son los Veterinarios.

En nuestro país se crían más de 20.000.000 de animales, bovinos de carne, bovinos de leche, ovinos, equinos, suinos, aves, peces que han padecido o padecen enfermedades transmisibles al hombre y la primer barrera, el primer freno para evitar el contagio a la población humana, es el asesoramiento, la prevención y la vigilancia epidemiológica realizada por los Veterinarios.

Los Veterinarios de Uruguay, del Cono Sur, de América Latina, participamos en las campañas sanitarias con total solvencia y conocimiento de causa por que hablamos y ejecutamos acciones que son inherentes a nuestra profesión.

Sigue siendo una preocupación aún de nuestros Colegios y Asociaciones, la Fiebre Aftosa, que tanto los gobiernos, como los servicios oficiales, como los Veterinarios de Libre Ejercicio combatimos con fervor.

En todos nuestros países la Salud Animal es recordada con poca intensidad en los presupuestos nacionales, olvidada cuando no hay novedades, y precedentemente cuando quienes rigen los destinos de la misma, no escuchan, no consultan y no reciben a los que ejecutan las campañas sanitarias.

Siguen siendo flagelos para nuestros países las zoonosis, la Brucelosis, la rabia, tuberculosis, leishmaniosis, leptospirosis, carbunco, *E.coli*, listeriosis, salmonela, fiebre Q, toxoplasmosis, la echinococosis, la encefalomielitís equina y la hidatidosis.

A título de ejemplo, juzgamos las campañas sanitarias por los logros y por la disminución de la prevalencia de la misma. En el caso de la hidatidosis, solo hace falta ver cuantos fueron los decomisos en frigoríficos (datos publicados por la autoridad oficial sanitaria del MGAP en los informes a la OIE) para bovinos y ovinos y veremos que en los últimos 10 años los valores de decomisos están estancados y en algunos casos aumentados, producto de una equivocada política de gestión, infinidad de veces mencionada.

Por esto nuestra Sociedad de Medicina Veterinaria, la Sociedad Uruguaya de Veterinarios especialistas en pequeños animales y el Centro Veterinario de Maldonado organizan conjuntamente el Simposio Iberoamericano de Zoonosis el 24 de noviembre de 2011.

Los técnicos oficiales de campo de nuestro MGAP son en la actualidad 65. En total hay sobre el suelo uruguayo cerca de 20.000.000 de animales, lo que implicaría que cada Veterinario oficial tendría que controlar 307.692 animales o controlar a los Veterinarios de libre ejercicio que trabajan con ellos. No alcanzan.

Los veterinarios oficiales de campo, de nuestro MGAP, reciben salarios malos, están obligados a realizar tareas administrativas quedando sin tiempo para realizar su función de policía sanitaria. El rol de policía sanitaria debe cumplirse en ex-

clusividad, con dedicación total, en estrecho contacto con la profesión liberal, y no solamente en horario acotado de 8 a 15:30. Los Veterinarios que actúan como policía sanitaria deben actuar como Policía sanitaria las 24 horas del día y los 365 días del año con un salario acorde a su función.

La Brucelosis sigue siendo una campaña seguida con mucha intensidad por la profesión Veterinaria tanto oficial como liberal y muchas veces no llegamos a consensos, no en cuanto al plan de lucha contra la misma si no a la falta de lo que la ley permite: la función de Policía sanitaria.

Seguimos esperando conocer los porcentajes de cobertura tanto de la vacunación como la revacunación contra la brucelosis bovina; no tenemos un dato real de cuantos animales de la cuenca lechera se tuberculinizan, ni cuantos animales se vacunan anualmente contra carbunco, a pesar de los certificados donde se detallan los mismos, los tiene la autoridad sanitaria.

Existen otras enfermedades que diagnosticadas ampliamente por el laboratorio oficial ampliamente, son de distribución nacional, que afectan al ganado bovino con pérdidas importantes y que no están bajo campaña sanitaria como la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, la Diarrea Viral Bovina y la Leptospirosis. Esta última, zoonosis con 154 casos en humanos.

Una atención especial merece la Leucosis Bovina Enzootica, enfermedad viral de alcance nacional en los rodeos lecheros, ampliamente conocida por los Veterinarios oficiales y privados. Tenemos en el año 2010, 46.5000 vacas lecheras, y nacen por año 141.000 terneras. El sistema lechero uruguayo necesita cerca de 100.000 animales para reposición de aquellas vacas que se venden por viejas o por problemas podales, de mastitis, etc. De esos 40.000 animales que quedan una porción importante se va para la exportación, y el resto que queda, pero son los positivos que no se pudieron exportar. Estamos tratando de mirar para el costado con esta epizootia. No preocuparnos mientras casi todo el continente europeo esta libre de LBE. ¿Cuáles son las propuestas nacionales?

Nuestra profesión en Uruguay, tiene 3.887 Veterinarios al 30 de marzo de 2011, de los cuales 2.405 son activos, declaran no ejercicio 1.162 y están jubilados 320.

Nos sentimos preocupados por el estado de la Investigación Veterinaria en el Uruguay. No tenemos investigadores en Salud Animal dedicados exclusivamente a investigar las principales epizootias. Tenemos un incipiente embrión de organización como el Planisa) Plan Nacional de Investigación en Salud Animal) el cual integramos conjuntamente con la Facultad de Veterinaria, y otras instituciones. Esperamos que el principal instituto de investigaciones veterinarias del Uruguay, asuma un rol que hasta ahora, le compete pero no ha asumido.

Hoy en Uruguay nacen 2.300.000 terneros y terneras de razas carniceras de un total de 3.800.000 vacas de razas carniceras. No alcanza, se puede exportar mucho más y a muy buenos precios, no hay ganado y hay frigoríficos que han mandado a sus empleados a seguro de paro.

¿Fruto de la competencia con la agricultura? Puede ser o falta de un plan maestro nacional de transferencia de tecnología, un plan nacional de extensión en producción producción y reproducción en el cual los Veterinarios y los Ingenieros Agronomos luchemos por un futuro productivo mejor.

Hablamos de un plan nacional de extensión productivo-reproductivo que utilice mejor los recursos nacionales. Cada Intendencia tiene un departamento agropecuario con técnicos a su servicio, el Plan Agropecuario también, el Instituto Nacional de Colonización, el Banco República, los servicios de extensión de las cooperativas en todo el país. ¿No sería necesario que se agrupen todos esos excelentes profesionales tras un gran objetivo común liderado por el MGAP?

Es un largo anhelo de la Profesión Veterinaria el lograr la gran meta de una ley de Colegiación de nuestra Profesión, redacción que fue lograda con la participación de muchísimos colegas, con la activa participación de nuestro anterior Presidente

el Académico Dr. Recaredo Ugarte. Somos juntos con Paraguay los dos países que no tienen colegio Veterinario. Estamos en desigualdad ante el trato en el Mercosur con nuestros dos grandes países hermanos Brasil y Argentina. Hemos recibido el apoyo explícito de la OIE, de la Comité de Salud Animal del Comité Veterinario Permanente del Mercosur, de los Colegios Veterinarios del Argentina y Brasil y el decidido apoyo de nuestro Ministro de Ganadería Agricultura y Pesca y su Director General de los Servicios Ganaderos.

No queremos terminar esta exposición sin seguir reafirmando dos conceptos guía de nuestra profesión el primero es que no existe en el mundo ningún proceso de producción animal exitoso si no hay concomitantemente un plan en salud animal y no hay salud animal sin investigación nacional. La investigación nacional nos va a permitir ser mas libres, más independientes y mas soberanos. La segunda idea es la madre de todas y es que la Salud Animal es Patrimonio Nacional.

Muchas Gracias

Primer diagnóstico molecular y caracterización parcial del gen de la nucleoproteína del Virus Distemper Canino en Uruguay

Sarute, N.; Pérez, R.; Francia, L.; Hernández, M.; Bedó, G.; Bonilla, B.; Guasco, S.; Cardeillac, A.; Panzera, Y.

RESUMEN

El virus Distemper Canino (CDV) es el agente etiológico de una severa enfermedad infecciosa, denominada Distemper o Carré, que afecta a cánidos y diversas familias de carnívoros. La enfermedad se caracteriza por presentar síntomas clínicos asociados a lesiones en el aparato respiratorio, digestivo y/o el sistema nervioso central. Su diversidad sintomatológica dificulta establecer un diagnóstico clínico *ante-mortem* preciso. En este trabajo implementamos por primera vez en Uruguay, una metodología diagnóstica *ante-mortem* mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa precedida por retrotranscripción) amplificando un fragmento conservado de 287 pb del gen de la nucleocápside a partir de muestras provenientes de canes con sintomatología clínica de Distemper. Se obtuvieron amplicones en 44 de las 51 muestras analizadas. El análisis de las secuencias nucleotídicas de tres muestras de campo reveló un 100% de identidad. La comparación de estas secuencias con la cepa vacunal (Onderstepoort) reveló numerosas variaciones nucleotídicas. Estas diferencias nos permitieron diseñar un método de RFLP (Polimorfismo en el Largo de los Fragmentos de Restricción) para discriminar entre la cepa vacunal y virus de campo.

Palabras clave: CDV, gen de la nucleocápside, diagnóstico molecular, RFLP

SUMMARY

Canine Distemper Virus (CDV) is the etiologic agent of a severe infectious disease, known as Distemper or Carré, which affects dogs and various families of carnivores. The disease is characterized by clinical symptoms associated with lesions in the respiratory, digestive and/or central nervous system. The diversity of the symptoms makes it difficult to establish a clinical *ante-mortem* diagnosis. In this work we implemented for the first time in Uruguay, an *ante-mortem* diagnostic method using RT-PCR (reverse transcription - polymerase chain reaction) to amplify a conserved fragment of 287 bp of the nucleocapsid gene from samples belonging to dogs with symptoms of Distemper. Amplicons were obtained in 44 out of the 51 samples tested. The analysis of nucleotide sequences of three field samples revealed that they were 100% identical. The comparison of these sequences with the vaccine strain (Onderstepoort) revealed numerous nucleotide variations. These differences allowed us to design a method of RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) to discriminate between the vaccine strain to field cases.

Key words: CDV, nucleocapsid gene, molecular diagnosis, RFLP

INTRODUCCIÓN

El virus Distemper Canino (CDV) es un virus envuelto perteneciente al género *Morbillivirus* de la familia *Paramyxoviridae*. Se trata del agente etiológico de una de las principales patologías infecciosas de canes jóvenes y adultos, conocida como Distemper, Enfermedad de Carré o Joven Edad (1). La enfermedad no se restringe exclusivamente a cánidos, ya que se han registrado casos en poblaciones silvestres de diversas familias de carnívoros como vivérridos, mustélidos, felinos y prociónidos (8-9, 12, 17-18).

Distemper se caracteriza por presentar una amplia variedad de síntomas clínicos asociados con lesiones en el aparato respiratorio, digestivo y/o sistema nervioso central (SNC) que pueden causar la muerte del animal (1). La diversidad en la sintomatología, asociada al ciclo impredecible y variable del virus en el huésped, dificulta establecer un diagnóstico clínico *ante-mortem* preciso en la mayoría de los animales afectados (7). Los síntomas clínicos de Distemper son similares a los de otras patologías, como los de parainfluenza canina, adenovirus canino tipo 2 o coronavirus respiratorio canino, provocando frecuentemente confusión en el diagnóstico clínico (4).

Se han desarrollado diversas metodologías de diagnóstico complementario entre las que se incluyen ensayos de inmunohistoquímica y ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Sin embargo, dichas técnicas no satisfacen los requerimientos de un ensayo de detección sensible, rápido y específico (7). El

desarrollo de metodologías moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) precedida por retrotranscripción (RT) del RNA genómico, permite un diagnóstico *ante-mortem* rápido, con un alto grado de sensibilidad y especificidad (7, 10, 14, 20). La técnica RT-PCR permite detectar genoma viral por amplificación de regiones específicas, y brindar información para análisis posteriores de su composición nucleotídica y aminoacídica.

Se ha detectado al genoma viral mediante RT-PCR en muestras de suero, sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) y orina, independientemente de los signos clínicos del animal, títulos de anticuerpos neutralizantes y distribución de antígenos virales (7, 10). Mediante infección experi-

desarrollo de metodologías moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) precedida por retrotranscripción (RT) del RNA genómico, permite un diagnóstico *ante-mortem* rápido, con un alto grado de sensibilidad y especificidad (7, 10, 14, 20). La técnica RT-PCR permite detectar genoma viral por amplificación de regiones específicas, y brindar información para análisis posteriores de su composición nucleotídica y aminoacídica.

¹Sección Genética Evolutiva. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Correo electrónico: ypanzera@fcien.edu.uy
Recibido: 18/10/10 Aprobado: 21/3/11

mental de canes se demostró que en la secreción ocular el genoma viral es detectado tempranamente y por períodos más prolongados respecto a la orina, sangre y LCR (14).

CDV presenta un genoma de RNA de cadena simple, polaridad negativa, y aproximadamente 15.6 kb (15). Su genoma codifica para seis componentes estructurales del virión: dos proteínas de membrana, la hemaglutinina (H) y la proteína de fusión (F), la proteína de matriz (M), la proteína de nucleocápside (N), y dos proteínas que integran el complejo RNA polimerasa RNA dependiente: la proteína larga (L) y la fosfoproteína (P) (23). Particularmente la secuencia nucleotídica de la región central del gen N se halla muy conservada entre diversas cepas de CDV, siendo generalmente utilizada para realizar el diagnóstico etiológico (7, 10, 20).

La enfermedad de Distemper se ha controlado por décadas con el uso de vacunas con virus vivos atenuados desarrolladas en los años 50 (5). Sin embargo, en los últimos años se ha registrado un incremento en el número de casos de Distemper en poblaciones caninas en diversas regiones geográficas, e incluso una expansión en el rango de huésped (3, 11, 18). Resulta preocupante que dicho incremento se observe también en poblaciones de canes correctamente vacunados (2, 6, 11, 13, 16). Aunque la explicación específica del aumento de casos de Distemper aún se desconoce, existen varias hipótesis, como la insuficiente atenuación del virus vacunal (13), o la circulación de nuevas cepas con la capacidad de evadir la respuesta inmune generada por las vacunas administradas (19).

En Argentina, se ha reportado recientemente un incremento en el número de casos de Distemper (2). Si bien no se cuenta con estudios epidemiológicos de la enfermedad en nuestro país, en los últimos años se han registrado numerosos casos de Distemper.

Los objetivos del presente trabajo fueron implementar por primera vez en el país un método de diagnóstico molecular y desarrollar un ensayo capaz de discriminar entre variantes de campo y la cepa comúnmente utilizada en la fabricación de vacunas (cepa Onderstepoort).

Como diseño experimental hemos amplificado por RT-PCR un fragmento conser-

vado de 287 pb del gen N, que nos permitió detectar el genoma viral en muestras provenientes de canes con síntomas clínicos presuntivos de la enfermedad. Los amplicones obtenidos fueron posteriormente analizados mediante secuenciación y un sistema de RFLP (Polimorfismo en el Largo de los Fragmentos de Restricción), desarrollado para la rápida caracterización de las cepas circulantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras Analizadas

Todas las muestras de campo recibidas en el laboratorio para análisis de Distemper, fueron alicuotadas y almacenadas a -20 °C a la espera de ser procesadas.

Se emplearon muestras de orina y secreción óculo-nasal que ya han sido previamente reportadas como adecuadas para la detección del genoma viral (10, 14, 20); además, presentan la ventaja de que son de fácil recolección y no invasivas para el animal.

Las muestras de secreciones óculo-nasales fueron colectadas entre 1-14 días luego de la aparición de síntomas clínicos, mientras que las de orina se colectaron entre 7-30 luego de la observación de síntomas.

Se analizaron 39 muestras de orina y 14 de secreciones óculo-nasales provenientes de 51 perros con síntomas clínicos presuntivos de infección por CDV y 2 perros sin sintomatología clínica (Cuadro 1). Estos dos últimos (CDV29 y CDV99) se utilizaron como control negativo. Como control positivo se utilizó una muestra liofilizada de una vacuna conteniendo la cepa Onderstepoort, con la cual se estandarizó la extracción del RNA genómico y la reacción de RT-PCR.

Obtención del genoma viral

La extracción de RNA a partir de muestras de orina y liofilizado de vacuna (un vial fue resuspendido en 800 µl de 1X PBS) se realizó con el kit «PureLink Viral DNA/RNA MiniKit» (Invitrogen, California, USA) partiendo de 500 µl de volumen inicial.

Para las muestras de secreciones óculo-nasales, el RNA viral fue extraído mediante el reactivo TRIzol (Invitrogen, California, USA), homogeneizando la secreción con 1 ml de este reactivo. En am-

bos casos se siguió el protocolo sugerido por el fabricante. Todas las extracciones se realizaron en paralelo con las muestras de perros sanos (CDV29 y CDV99).

Ensayo de RT-PCR

La reacción de retrotranscripción (RT) fue realizada con la enzima «RevertAid M-MiLV Reverse Transcriptase» (Fermentas, Vilna, Lituania) utilizando el cebador directo p1 y siguiendo las especificaciones del fabricante.

En la reacción de PCR se utilizaron los cebadores p1 y p2 (7) capaces de amplificar un fragmento de 287 pb correspondiente a la región conservada del gen de la nucleocápside (Cuadro 2). En todas las reacciones se ensayaron distintos volúmenes de DNA complementario (cDNA) y se incluyeron a las muestras de perros sanos (CDV29 y CDV99).

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 10 µl conteniendo 1-3 µl de cDNA, 0.3 µl de cada cebador, 0.2 mM de dNTPs, 2.0 mM de MgCl₂, 1U de Taq polimerasa (Fermentas, Vilna, Lituania) en un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, California, USA) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min, 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94 °C durante 30 s, apareamiento a 49 °C por 45 s, extensión a 72 °C por 1 min) y un ciclo de extensión final a 72 °C por 15 minutos.

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% y revelados por tinción con nitrato de plata.

Clonación de amplicones positivos

Se clonaron cuatro amplicones con el kit «GeneJet PCR Product Cloning kit» (Fermentas, Vilna, Lituania) utilizando células competentes de *E. Coli XL-1 Blue*.

El primer amplicón clonado fue el correspondiente a la cepa vacunal Onderstepoort. CDV11 fue el primer amplicón obtenido de una muestra de campo, siendo clonado y enviado a secuenciar para confirmar su identidad con la base de datos del NCBI. CDV20 y CDV75 fueron seleccionados debido a que pertenecían a un animal no vacunado y uno recientemente vacunado respectivamente.

Cuadro 1. Muestras empleadas en el estudio. Se detalla la denominación, edad, localidad, vacunación y sintomatología de los animales. NV: no vacunado; V: vacunado; SN: sintomatología neurológica; GI: sintomatología gastrointestinal; SR: sintomatología respiratoria; Conj: conjuntivitis; ND: no determinado.

| Muestra | Edad (meses) | Procedencia | Vacunación | Sintomatología Clínica | | | | |
|---------|--------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------|----|----|------|-----------------|
| | | | | SN | GI | SR | Conj | Otros |
| CDV2 | 8 | Canelones (Solymar) | V | + | - | + | - | |
| CDV3 | ND | Montevideo | ND | + | - | - | - | |
| CDV8 | 24 | ND | ND | - | + | - | - | |
| CDV10 | 8 | Montevideo | V | + | - | + | - | |
| CDV11 | 144 | Montevideo | V (ND) | + | - | - | - | |
| CDV13 | 6 | Montevideo | V | + | + | - | - | |
| CDV14 | 108 | Montevideo | V | + | - | + | - | |
| CDV17 | 7 | Lavalleja | V | - | + | - | + | Pirexia |
| CDV20 | ND | Montevideo | NV | + | - | + | + | |
| CDV24 | 60 | Montevideo | NV | + | - | - | - | |
| CDV29 | 24 | Montevideo | V | - | - | - | - | Animal Sano |
| CDV30 | ND | Montevideo | V | - | + | - | - | Depresión |
| CDV33 | 30 | Canelones (Santa Lucía) V | | - | + | + | + | Depresión |
| CDV35 | 14 | Canelones (Solymar) | V | + | - | - | - | |
| CDV36 | 72 | Montevideo | V | - | + | - | - | |
| CDV40 | 2 | Montevideo | NV | - | + | - | - | |
| CDV44 | 22 | Paysandú | NV | - | + | - | + | |
| CDV63 | 12 | ND | V | - | + | - | - | Hiperqueratosis |
| CDV67 | 48 | San José | NV | + | - | - | - | |
| CDV73 | 2 | Rivera | V | + | - | - | - | |
| CDV74 | 60 | Canelones (El Pinar) | V | + | - | - | - | |
| CDV75 | 5 | Canelones (Santa Lucía) | V (dos dosis C4 02 y 03/2007) | + | - | + | + | Leuco-penia |
| CDV81 | 96 | Canelones (Solymar) | NV | + | - | - | - | |
| CDV88 | 4 | ND | NV | + | - | - | - | |
| CDV99 | ND | Montevideo | ND | - | - | - | - | Animal Sano |
| CDV102 | 36 | Montevideo | V | - | + | + | - | |
| CDV104 | 6 | Montevideo | V | - | + | - | - | |
| CDV107 | 10 | ND | V | - | - | + | - | Pirexia |
| CDV109 | 4 | Canelones | NV | ND | ND | ND | ND | |
| CDV110 | 10 | Canelones | V | + | - | - | - | |
| CDV111 | ND | ND | V | - | + | + | - | |
| CDV112 | ND | Canelones (Toledo) | NV | ND | ND | ND | ND | |
| CDV113 | ND | Canelones (Toledo) | NV | ND | ND | ND | ND | |
| CDV114 | 4 | Canelones (Solymar) | V | + | - | - | - | |
| CDV115 | 12 | Canelones (Rincón de la Bolsa) | V | + | - | - | + | |
| CDV116 | 8 | Montevideo | V | + | - | + | - | |
| CDV117 | 36 | Montevideo | V | - | + | - | + | |
| CDV118 | 15 | Montevideo | V | + | + | - | + | |
| CDV119 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | |
| CDV120 | 15 | Colonia | V | - | + | - | - | |
| CDV121 | 13 | Canelones (El Pinar) | V | - | + | - | + | |
| CDV122 | ND | ND | ND | + | - | - | - | |
| CDV123 | 11 | Montevideo | V | + | - | - | + | Pirexia |
| CDV124 | 3 | Montevideo | V | - | - | - | + | |
| CDV126 | 48 | Canelones (Santa Rosa) | NV | + | - | + | - | Pirexia |
| CDV127 | 24 | Canelones (Santa Rosa) | V | - | - | + | + | |
| CDV128 | 6 | Canelones (Santa Rosa) | NV | - | - | + | + | |
| CDV129 | 60 | Montevideo | NV | + | - | - | - | |
| CDV130 | 84 | Montevideo | V | - | + | - | + | Pirexia |
| CDV131 | ND | Canelones (Santa Lucía) NV | | + | + | - | - | Depresión |
| CDV132 | ND | ND | V | - | + | - | + | Depresión |
| CDV139 | 12 | Canelones (Santa Lucía) | V | - | - | + | + | Pirexia |
| CDV141 | 2 | ND | V | + | - | + | + | |

Cuadro 2. Cebadores utilizados para amplificar por RT-PCR un fragmento de 287 pb del gen N. Se indica la secuencia nucleotídica de cada cebador y su posición en el genoma. nt: nucleótido.

| Cebador | Secuencia 5'-3' | Posición en el genoma (nt) |
|---------|-----------------------|----------------------------|
| p1 | ACAGGATTGCTGAGGACCTAT | 769-789 |
| p2 | CAAGATAACCATGTACGGTGC | 1055-1035 |

La extracción del DNA plasmídico de las colonias con el inserto, se realizó mediante la técnica de mini-preparaciones descrita por Sambrook y col. (21).

Secuenciación y análisis

Los insertos de 287 pb fueron secuenciados automáticamente utilizando el equipo ABI3130 (Applied Biosystems, California, USA). Las secuencias nucleotídicas se analizaron y compararon con secuencias provenientes de la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) a través del método ClustalX, usando el programa MEGA versión 4.1 (22).

Análisis de restricción y RFLP

La secuencia nucleotídica de tres aislamientos de campo y de la muestra vacunal fueron sometidas a un análisis de restricción con el programa WatCut (<http://watcut.uwaterloo.ca>).

Los productos de PCR de cinco aislamientos de campo y el producto de la muestra vacunal fueron digeridos con EcoRV (Fermentas, Vilna, Lituania) durante 3 horas a 37 °C y posteriormente visualizados en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio.

RESULTADOS

Diagnóstico

Se amplificó el fragmento de 287 pb del gen N en 34 de las 37 (92%) muestras de orina, y en 10 de las 14 (71%) muestras de secreciones óculo-nasales analizadas.

En ningún caso se registraron amplicones específicos en las muestras de orina CDV29 y CDV99 utilizadas como control negativo.

Análisis de secuencias nucleotídicas

El análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de los clones reveló que las muestras de campo (Uy-06) presentaban 100% de identi-

dad entre si y 96,2% respecto a la cepa vacunal. Las cepas de campo presentaron 11 variaciones a nivel nucleotídico respecto a la cepa vacunal, todas correspondientes a transiciones (Figura 1). También se realizaron comparaciones con secuencias de la base de datos del GenBank procedentes de diferentes países. La comparación mostró que las secuencias presentan una conservación relativamente elevada en la secuencia de bases. Los cambios nucleotídicos observados fueron mayormente sinónimos, por lo que la secuencia aminoacídica es prácticamente invariable para el fragmento amplificado.

Ensayo de RFLP

El análisis de las secuencias nucleotídicas de las muestras de campo CDV11, CDV20 y CDV75 y su comparación con la cepa vacunal permitió detectar un sitio de restricción diferencial para la enzima EcoRV e implementar un ensayo de RFLP. Las muestras de campo presentan la diana específica (GAT|ATC) mientras que la muestra vacunal registra en dicha posición una transición T→C (GACATC), lo cual determina la pérdida del sitio específico para la enzima (Figura 1).

El ensayo desarrollado fue realizado en las muestras CDV11, CDV20, CDV75, CDV139 y CDV141 y en la cepa vacunal Onderstepoort, corroborándose el patrón de restricción esperado. En la electroforesis de la figura 2 se observa la digestión de las muestras de campo, dando como resultado una banda correspondiente a 233 pb y otra a 54 pb.

El análisis *in silico* del RFLP reveló que todos los aislamientos de campo sudamericanos publicados hasta el momento presentan este mismo patrón de restricción, excepto un aislamiento argentino (n° acceso en GenBank: FJ009229) (Figura 1).

DISCUSIÓN

Distemper es una de las enfermedades virales de mayor incidencia en cánidos

domésticos y salvajes (1). Esto es debido al constante surgimiento de brotes infecciosos en diversas regiones del mundo (11, 13, 16-17) y a la expansión en el rango de huéspedes del virus (12, 18).

Muchos de los nuevos brotes de la enfermedad se observan en poblaciones de canes correctamente inmunizados, lo cual ha puesto en duda la eficacia de las vacunas administradas en dichos casos (2, 6, 16). Este hecho sumado a la dificultad para realizar un diagnóstico clínico preciso, hacen imprescindible la implementación de metodologías que permitan realizar un diagnóstico *ante-mortem* rápido y específico. En la actualidad, la técnica basada en RT-PCR es una de las metodologías más utilizadas para realizar el diagnóstico de Distemper (7).

En el presente trabajo se presenta la implementación, por primera vez en Uruguay, de una metodología de diagnóstico molecular basada en la amplificación de un fragmento de 287 pb del gen N. Nuestro estudio constató la presencia del fragmento en el 86% de las muestras remitidas al laboratorio como casos sospechosos de Distemper. El sistema de detección mediante la amplificación de dicho fragmento ha sido empleado por otros autores como un método de detección del genoma viral altamente sensible y específico en muestras de distinto origen (7, 10, 20). En nuestro estudio, se detectó el genoma de CDV en el 71% de las muestras de secreciones óculo-nasales y en el 92% de las muestras de orina analizadas. Si bien ambos porcentajes no son comparables debido a que las muestras provienen de distintos casos clínicos, nuestros resultados indican que estos fluidos son adecuados para estudios diagnósticos, como ha sido reportado previamente (10, 14, 20).

En el 14% de los casos clínicos donde no se detectó el genoma viral, puede haber ocurrido que las muestras no correspondieran a Distemper o bien que éstas presentaran una carga viral indetectable.

El análisis de las secuencias nucleotídicas correspondiente a la región del gen N de las muestras de campo uruguayas reveló 100% de identidad, sugiriendo que estos aislamientos corresponderían a un CDV predominante en Uruguay. La comparación de esta secuencia con las de cepas de otras regiones mostró una elevada

| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
|----------------------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Uy_06 | | | | | | | | | |
| Cepa vacunal Onderstepoort | TCCTTGAGCGGGTTCATGGTAGCACTCATCTTG ATATC AAACGATCCCAGGGAACAAGCCTAGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATA | | | | | | | | |
| FJ009225_Ar_08 | .T.....A.....G.....C..... | | | | | | | | |
| FJ009226_Ar_08 | .T.....G.....T..... | | | | | | | | |
| FJ009227_Ar_08 | .T.....G.....T..... | | | | | | | | |
| FJ009228_Ar_08 | .T.....G.....T..... | | | | | | | | |
| FJ009229_Ar_08 | .T.....C.....T..... | | | | | | | | |
| AY738653_Br_04 | .T..... | | | | | | | | |
| DQ005126_Br_05 | .T..... | | | | | | | | |
| DQ005127_Br_05 | .T..... | | | | | | | | |
| DQ005129_Br_05 | .T.....T..... | | | | | | | | |
| DQ005130_Br_05 | .T..... | | | | | | | | |
| DQ005131_Br_05 | .T..... | | | | | | | | |
| DQ005132_Br_05 | .T.....G..... | | | | | | | | |
| DQ005133_Br_05 | .T..... | | | | | | | | |
| DQ005134_Br_05 | .T..... | | | | | | | | |
| EF193648_Br_07 | .T.....C..... | | | | | | | | |
| EF197736_Br_09 | .T..... | | | | | | | | |
| DQ887333_Mx_08 | .T.....A.....G.....G..... | | | | | | | | |
| EU489475_Ch_08 | .T.....A.....G..... | | | | | | | | |

| | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
|----------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Uy_06 | | | | | | | | | |
| Cepa vacunal Onderstepoort | GATAACTACATGTGGGAAGCTGGATTAGCTAGTTCATCTTAACATA'CAAATTTGGCAATTGAAACTATGTATCCGGCTCTTGGGTGTCAT | | | | | | | | |
| FJ009225_Ar_08 | .C.....G.....C.....G.....G..... | | | | | | | | |
| FJ009226_Ar_08 | .C.....T.....G.....G..... | | | | | | | | |
| FJ009227_Ar_08 | .C.....T.....G.....A.....A..... | | | | | | | | |
| FJ009228_Ar_08 | .C.....T.....G.....T..... | | | | | | | | |
| FJ009229_Ar_08 | .C..... | | | | | | | | |
| AY738653_Br_04 | .C..... | | | | | | | | |
| DQ005126_Br_05 | .C..... | | | | | | | | |
| DQ005127_Br_05 | .C..... | | | | | | | | |
| DQ005129_Br_05 | .C.....G..... | | | | | | | | |
| DQ005130_Br_05 | .C..... | | | | | | | | |
| DQ005131_Br_05 | .C..... | | | | | | | | |
| DQ005132_Br_05 | .C..... | | | | | | | | |
| DQ005133_Br_05 | .C..... | | | | | | | | |
| DQ005134_Br_05 | .C..... | | | | | | | | |
| EF193648_Br_07 | .C..... | | | | | | | | |
| EF197736_Br_09 | .C.....C..... | | | | | | | | |
| DQ887333_Mx_08 | .C.....A.....C.....C..... | | | | | | | | |
| EU489475_Ch_08 | .C.....A.....C.....C..... | | | | | | | | |

| | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
|----------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| Uy_06 | | | | | | |
| Cepa vacunal Onderstepoort | GAGTTTCTGGAGAGTAAACAACATATGAAATCCCTTATGATGCTATATCAGCAGATGGGTGAACA | | | | | |
| FJ009225_Ar_08 | .C.....A.....C.....A.....A..... | | | | | |
| FJ009226_Ar_08 | .C.....A.....A.....A..... | | | | | |
| FJ009227_Ar_08 | .C.....A.....A.....A..... | | | | | |
| FJ009228_Ar_08 | .C.....A.....A.....A..... | | | | | |
| FJ009229_Ar_08 | .C..... | | | | | |
| AY738653_Br_04 | .C..... | | | | | |
| DQ005126_Br_05 | .C..... | | | | | |
| DQ005127_Br_05 | .C..... | | | | | |
| DQ005129_Br_05 | .C..... | | | | | |
| DQ005130_Br_05 | .C..... | | | | | |
| DQ005131_Br_05 | .C..... | | | | | |
| DQ005132_Br_05 | .C..... | | | | | |
| DQ005133_Br_05 | .C.....A.....A..... | | | | | |
| DQ005134_Br_05 | .C.....A.....A..... | | | | | |
| EF193648_Br_07 | .C.....A.....A..... | | | | | |
| EF197736_Br_09 | .C.....A.....A..... | | | | | |
| DQ887333_Mx_08 | .C.....G.....C.....G.....A.....A.....G..... | | | | | |
| EU489475_Ch_08 | .C.....C.....A.....A..... | | | | | |

HQ285996) y CDV75 (n° de acceso HQ285994) agrupadas en Uy 06, de la cepa vacunal Onderstepoort y secuencias de varios países. Los puntos simbolizan identidad nucleotídica, cuando existe una sustitución se señala con la letra correspondiente (C citosina, G guanina, A adenina, T timina). Ar: Argentina; Br: Brasil; Ch: China; Mx: México; Uy: Uruguay. Se destaca en recuadro la diana de la enzima EcoRV.

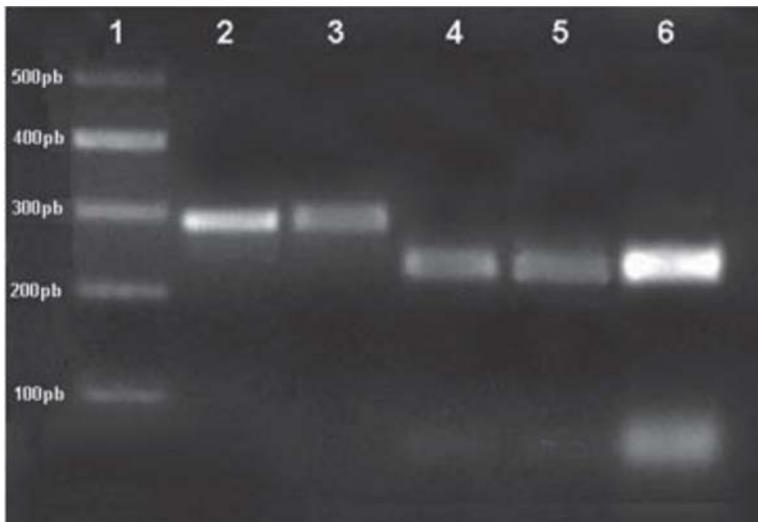


Figura 2. Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP) de los productos de PCR con la enzima EcoRV. Carriles: 1) Marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas), 2) Amplicón de muestra de campo sin digerir (287 pb), 3) Amplicón vacunal sometido a digestión, 4) a 6) Muestras de campo digeridas (233 pb y 54 pb).

conservación a nivel nucleotídico y aminoácido. La mayoría de los cambios registrados corresponden a transiciones que no determinan sustituciones aminoácidas (Figura 1).

Los valores de identidad nucleotídica observados entre los aislamientos uruguayos y los provenientes de otras regiones sustentan que la región conservada del gen N es idónea para la detección del genoma viral en muestras de campo.

Esto motivó al desarrollo de un ensayo de RFLP cuya discriminación fuera de utilidad para aportar información epidemiológica; su desarrollo se basó en el análisis de la secuencia nucleotídica de los aislamientos uruguayos y la cepa vacunal (Figura 1). Dicho ensayo permite diferenciar cepas de campo con respecto a la cepa vacunal Onderstepoort de manera rápida y eficaz en virtud de diferencias nucleotídicas. El RFLP se aplicó en tres

muestras de orina de animales con historia de vacunación (CDV11, CDV75 y CDV139), una muestra de orina de un animal sin historia de vacunación (CDV20) y en una muestra de secreción óculo-nasal de un can vacunado (CDV141). Los resultados obtenidos confirman que la infección de los canes fue causada por un virus de campo.

CONCLUSIONES

La implementación de técnicas moleculares para el diagnóstico (RT-PCR) y caracterización (RFLP) nos permitió detectar y diferenciar virus de campo de virus vacunal de manera rápida y eficaz. De cualquier forma, no se puede descartar la ocurrencia de mutaciones en el genoma que alteren la diana de restricción. En aquellos casos que se sospeche de una infección por cepas de campo y el análisis de restricción sugiera una cepa vacunal, se debe recurrir a la secuenciación del fragmento para confirmar su procedencia.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por el laboratorio Merial (Uruguay), el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) y ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) de Uruguay. Durante la investigación se utilizó equipamiento adquirido por el proyecto INIA FPTA 264 y por el proyecto «APOYO AL DESARROLLO DE LAS BIOTECNOLOGÍAS EN EL MERCOSUR-BIOTECH», N° ALA/2005/017/350 (Cadena de Producción de Carne Aviar).

Referencias Bibliográficas

- (1) Appel, M.J.; Summers, B.A. (1999). Canine Distemper: Current Status. Recent Advances in Canine Infectious Diseases. Carmichael, L.E. Ed. International Veterinary Information Service.
- (2) Calderon, M.G.; Remorini, P.; Periolo, O.; Iglesias, M.; Mattion, N.; La Torre, J. (2007). Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Vet. Microbiol.* 125, 341-349.
- (3) Decaro, N.; Camero, M.; Greco, G.; Zizzo, N.; Tinelli, A.; Campolo, M.; Pratelli, A.; Buonavoglia, C. (2004). Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *New Microbiol.* 27, 177-181.
- (4) Demeter, Z.; Lakatos, B.; Palade, E.A.; Kozma, T.; Forgách, P.; Rusvai, M. (2007). Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains. *Vet. Microbiol.* 122, 258-269.
- (5) Demeter, Z.; Palade, E.A.; Hornyák, A.; Rusvai, M. (2009). Controversial results of the genetic analysis of a canine distemper vaccine strain. *Vet. Microbiol.* 142, 420-426.
- (6) Ek-Kommonen, C.; Sihvonen, L.; Pekkanen, K.; Rikula, U.; Nuotio, L. (1997). Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Vet Rec.* 141, 380-383.
- (7) Frisk, A.L.; König, M.; Moritz, A.; Baumgartner, W. (1999). Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluids from Dogs with Distemper. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3634-3643.
- (8) Ferreyra, H.; Calderón, M.G.; Marticorena, D.; Marull, C.; Leonardo, B.C. (2009). Canine distemper infection in crab-eating fox (Cerdocyon thous) from Argentina. *J. Wild Dis.* 45, 1158-62.

- (9) **Frolich, K., Czupalla, O., Haas, L., Hentschke, J., Dedek, J., Fickel, J.** (2000). Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores from Germany. *Vet. Microbiol.* 74, 283-292.
- (10) **Gebara, C.M.S.; Wosiacki, S.R.; Negrao, F.J.; de Oliveira, D.B.; Beloni, S.N.E.; Alfieri, A.A.; Alfieri, A.F.** (2004). Detection of canine distemper virus nucleoprotein gene by RT-PCR in urine of dogs with distemper clinical signs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56, 480-487.
- (11) **Gemma, T.; Watari, T.; Akiyama, K.; Miyashita, N.; Shin, Y.S.; Iwatsuki, K.; Kai, C.; Mikami, T.** (1996). Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. *J. Vet. Med. Sci.* 58, 547-550.
- (12) **Harder T.C.; Kenter M.; Vos H, Siebelink K.; Huisman W.; van Amerongen G.; Orvell C.; Barrett T.; Appel M.J.; Osterhaus A.D.** (1996). Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. *J. Gen. Virol.* 77, 397-405.
- (13) **Keawcharoen, J.; Theamboonlers, A.; Jantaradsamee, R.; Rungsipipat, A.; Poovorawan, Y.; Oraveerakul, K.** (2005). Nucleotide Sequence analysis of nucleocapsid protein gene of canine distemper virus isolates in Thailand. *Vet. Microbiol.* 105, 137-142.
- (14) **Kim, Y.; Cho, K.; Youn, H.; Yoo, H.; Han, H.** (2001). Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *J. Vet. Sci.* 2, 59-63.
- (15) **Lamb, R.A.; Parks, G.D.** (2007). Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication en *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, 5° Ed.
- (16) **Lan N.T.; Yamaguchi R.; Inomata A.; Furuya Y.; Uchida K.; Sugano S.; Tateyama S.** (2006). Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Vet. Microbiol.* 115, 32-42.
- (17) **Lednicky, J.A.; Dubach, J.; Kinsel, M.J.; Meehan, T.P.; Bocchetta, M.; Hungerford, L.L.; Sarich, N.A.; Witecki, K.E.; Braid, M.D.; Pedrak, C.; Houde, C.M.** (2004). Genetically distant American Canine distemper virus lineages have recently caused epizootics with somewhat different characteristics in raccoons living around a large suburban zoo in the USA. *Viol. J.* 2, 1:2.
- (18) **Nava, A.F.; Cullen, L. Jr; Sana, D.A.; Nardi, M.S.; Filho, J.D.; Lima, T.F.; Abreu, K.C.; Ferreira, F.** (2008). First evidence of canine distemper in Brazilian free-ranging felids. *Ecohealth* 5, 513-518.
- (19) **Pardo, I.; Johnson, G.C.; Kleiboeker, S.B.** (2005). Phylogenetic Characterization of Canine Distemper Viruses Detected in Naturally Infected Dogs in North America. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5009-5017.
- (20) **Saito, T.B.; Alfieri, A.A.; Wosiacki, S.R.; Negrao, F.J.; Morais, H.S.A.; Alfieri, A.F.** (2006). Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Res. Vet. Sci.* 80, 116-119.
- (21) **Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2° ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- (22) **Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S.** (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 24, 1596-1599.
- (23) **Van Regenmortel, M.H.V.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.** (2000). Virus Taxonomy: The classification and nomenclature of viruses. Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 7, 1167.



La época del año y el plano nutricional y su influencia sobre la morfología espermática en carneros Corriedale en pastoreo*

López, A.¹; Regueiro, M.¹; Castrillejo, A.²; Pérez-Clariget, R.¹

RESUMEN

Se evaluó el efecto del mes de colección y el plano nutricional sobre la morfología espermática en 20 carneros Corriedale de 18 meses de edad, la mitad pastoreando sobre campo nativo y la otra mitad sobre campo mejorado. Los planos nutricionales determinaron diferencias en peso y circunferencia escrotal, pero la evolución de ambas variables fue similar en ambos grupos. El plano nutricional solo afectó el porcentaje de espermatozoides con implantación abaxial de cola; el mes de colección influyó el porcentaje de espermatozoides con acrosomas dañados, contorno y tamaño anormal, pieza media anormal y abaxial, torsión simple y doble de cola y con gota citoplasmática distal. El porcentaje de espermatozoides con cabeza piriforme, estrechos en la base, cabezas sueltas normales y anormales, cola enrollada y con gota citoplasmática proximal no fue influido por el mes de colección. Las anomalías espermáticas aumentaron en primavera y alcanzaron los máximos valores en verano. Las anomalías observadas con mayor frecuencia fueron las de cola, gota citoplasmática distal y de cabeza representando juntas el 75% del total de las anomalías. Las anomalías específicas más frecuentes fueron la gota citoplasmática distal y la torsión simple de cola, sumando ambas casi 50% del total de anomalías observadas.

Palabras clave: Carnero, Morfología espermática

SUMMARY

The effect of month of semen collection and nutritional level on spermatic morphology of 20 Corriedale rams 18 months old, half of them grazing on native, and the other half grazing on improved pasture were studied. Nutritional levels determined differences in ram weight and scrotal circumference, but evolution of both variables was similar among the two groups. Nutritional levels affected only percentage of spermatozoa with abaxial mid-piece, whereas month of collection affected percentages of spermatozoa with acrosome damage, abnormal contour and variable size, abnormal and abaxial mid-piece, simple and double bent tails and distal droplet. Percentages of pear-shaped, narrow at the base, normal and abnormal free heads, terminally coiled tail and proximal droplet spermatozoa were not affected by month of collection. Spermatic abnormalities increased during spring and reached higher levels in summer. Most frequently abnormalities observed were tail-related, distal droplet and head abnormalities, which together represented 75% of total abnormal spermatozoa found. Most frequent specific anomalies were distal droplet and simple bent tail; together these made up almost 50% of total observed anomalies.

Key words: Ram, Sperm morphology.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la morfología espermática valora la incidencia de las diferentes formas que se apartan de la morfología normal de los espermatozoides. El conocimiento del impacto negativo que tienen elevados porcentajes de anomalías espermáticas, fundamentalmente las de cabeza, sobre la fertilidad de los carneros (Hulet y col., 1965), así como, la disponibilidad de técnicas accesibles para evaluarla, justifican su incorporación cuando se evalúa semen. La morfología de los espermatozoides refleja la salud de los túbulos seminíferos y en parte la de los epidídimos (Barth y Oko, 1989), aún más, la alteración de la morfología espermática se considera el primer signo de cambios degenerativos en el epitelio seminal (Lagerlöf, 1938). Los espermatozoides

que se observan en un eyaculado inician su proceso de formación en el epitelio seminífero aproximadamente dos meses antes, ya que en el carnero la espermatogénesis dura entre 47 y 49 días (Ortavant, 1958) y el pasaje por el epidídimo 13 días (Setchell, 1977), por lo cual se debe tener en cuenta que las alteraciones de la morfología espermática se producirían con varias semanas de anterioridad al momento en que son observadas.

También se deben tener en cuenta los factores que influyen la morfología espermática del carnero. La época del año (Colas, 1980; Mickelsen y col., 1981; Nonato-Girao y Mies-Filho, 1985; Pérez-Clariget y col., 1997) y la temperatura (Williamson, 1974; Carminate y Gamcik, 1982; Manco y col., 2000) influyen el porcentaje de anomalías espermáticas.

Los efectos de la nutrición parecen no ser tan importantes en esta especie (Bielli y col., 1997; Fourie y col., 2004) como en el macho cabrío (Almeida y col., 2007). En condiciones pastoriles, los carneros están sometidos a cambios en la disponibilidad y calidad del forraje así como al fotoperiodo y la temperatura, entre otros factores, y a las interacciones entre ellos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del mes de colección del semen y dos planos nutricionales sobre las alteraciones específicas de la morfología espermática en carneros Corriedale en pastoreo a lo largo de un año, así como, determinar las anomalías espermáticas más frecuentes que se presentan en carneros en condiciones pastoriles a latitudes intermedias.

*Parte de la información de este trabajo fue presentada como poster en el III Congreso de la Asociación Uruguaya de Producción Animal-Montevidео, noviembre 2010.

¹Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Garzón 780, Montevidео, Uruguay.

²Establecimiento El Recreo, Durazno, Uruguay.

Recibido: 15/11/10 Aprobado: 5/4/11

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

El trabajo se realizó en un establecimiento comercial ubicado en el centro del Uruguay (32° Latitud Sur) bajo condiciones de pastoreo extensivo característico de la región. A esta latitud, las horas luz varían entre 14 h 30' en diciembre a 9 h 40' en junio. Las temperaturas promedio durante el trabajo variaron entre 9 °C en junio a 25.5 °C en enero. La precipitación pluvial se distribuyó a lo largo del año aunque no uniformemente: la mínima precipitación mensual se registró en julio (53mm) y la máxima en enero (202 mm). Los suelos predominantes son basálticos y su vegetación dominada en verano por gramíneas perennes (*Paspalum*, *Axonopus*, *Bothriochloa*) y en invierno por gramíneas (*Stipa*, *Poa*), leguminosas (*Adesmia bicolor*, *Trifolium polymorphum*) y no gramíneas (*Oxalis*, *Cyperaceae*, *Eryngium*) y presenta una variación estacional de la disponibilidad de materia seca por Ha, siendo máxima en primavera y en otoño (Formoso y Castrillejo, 1989).

Animales y diseño experimental

Se utilizaron 20 carneros Corriedale nacidos en primavera que al momento del inicio del trabajo tenían 17-18 meses de edad y que fueron monitoreados durante 12 meses (marzo a febrero del siguiente año). Desde el destete (90 -120 días de edad), la mitad de los animales pastorearon sobre campo mejorado con rye grass perenne, *Lotus corniculatus* y trébol blanco (*Trifolium repens*) (Campo Mejorado, CM, n=10) y los restantes pastorearon sobre campo nativo (Campo Nativo, CN, n=10). Todos permanecieron sobre el mismo tipo de pasturas hasta el final del trabajo. Los carneros fueron esquilados en marzo y en setiembre y fueron manejados bajo el mismo esquema que el resto de los animales de su categoría. No fueron utilizados para dar servicio pero no se les impidió el contacto visual ni olfativo con hembras. Mensualmente a todos los animales se les registró el peso, se inspeccionaron los testículos y se les midió la circunferencia escrotal (CE) en el diámetro testicular máximo. El peso corporal fue corregido por el peso de vellón de acuerdo al procedimiento descrito por Gastel y col. (1995) para obtener el peso vivo (PV). El mismo día se colectó

una muestra de semen utilizando un electroeyaculador diseñado para ovinos. La colección de semen con electroeyaculador no altera los resultados de morfología espermática comparados con los que se obtienen cuando el semen es obtenido con vagina artificial (Marco-Jiménez y col., 2005). Inmediatamente después de obtenido el eyaculado, una alícuota de semen era diluida en una solución salina formolada y mantenida refrigerada hasta el momento de su evaluación. Las anomalías de acrosoma, pieza media y cola fueron registradas examinando una gota de esta preparación utilizando un microscopio de contraste de fases con aumento de 1000x y clasificadas de acuerdo a Sullivan (1977). Para examinar con mayor detalle las anomalías de cabeza, se realizó un frotis de cada muestra que se tiñó con fucsina básica-eosina de acuerdo al método descrito por Williams (1920) y modificado por Lagerlöf (1934) y clasificadas de acuerdo a éste último. En cada preparado se contaron 200 espermatozoides (total: 400 espermatozoides por eyaculado). Las anomalías consideradas fueron: anomalías de cabeza: acrosoma dañado, contorno anormal, tamaño diferente, piriformes, cabezas sueltas anormales y estrechas en la base; anomalías de pieza media: pieza media anormal y abaxiales; anomalías de cola: torsiones simples o dobles y colas enrolladas; se registraron también los espermatozoides con gota citoplasmática proximal y distal y las cabezas sueltas normales.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados en un diseño completamente al azar utilizando el programa estadístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). Los datos de PV y CE fueron analizados por medidas repetidas en el tiempo utilizando el procedimiento MIXED con el mes de colección como efecto repetido. El modelo incluyó el efecto del mes de colección y el plano nutricional y la interacción entre ambos como efectos fijos. Los datos de morfología espermática fueron analizados bajo modelos lineales generalizados utilizando el procedimiento GENMOD con transformación logit. El modelo incluyó los efectos mes de colección y del plano nutricional y su interacción como efectos fijos. Los datos de anomalías esper-

máticas fueron también analizados agrupados en anomalías de cabeza, pieza media y cola y como anomalías totales. Se realizaron correlaciones de Spearman entre variables. Las medias fueron consideradas diferentes cuando el $P \leq 0.05$. Los resultados se expresan en media ajustada \pm eem.

RESULTADOS

Peso vivo y circunferencia escrotal

Los diferentes planos nutricionales se reflejaron en diferencias en el PV de los carneros ($P < 0.001$). Los carneros del Grupo-CM fueron en promedio 28% más pesados durante todo el trabajo que los del Grupo-CN (Grupo-CM: 60.4 ± 0.7 kg vs Grupo-CN: 47.3 ± 0.6 kg, promedio general). Sin embargo, la evolución del PV a lo largo del año fue similar en ambos grupos: se mantuvo constante durante el otoño e invierno (marzo a agosto), se incrementó en primavera (setiembre a noviembre; $P < 0.05$) y volvió a mantenerse constante en el verano (diciembre a febrero; $P > 0.1$; Fig. 1A). En ambos grupos el PV final fue mayor al inicial ($P < 0.05$) indicando que los animales continuaban creciendo. El mes y los tratamientos afectaron ($P < 0.0001$) la CE y se encontró una interacción ($P < 0.0001$) entre ambos factores. Si bien, la media de la CE no era diferente entre grupos al inicio de los registros, los carneros del grupo CM tuvieron CE mayores ($P < 0.05$) a los del grupo CN en varias ocasiones a lo largo del trabajo (Figura 1B). La CE en ambos grupos decreció en otoño (marzo a mayo, $P < 0.05$), alcanzó su nadir en junio ($P < 0.05$), permaneció constante el resto del invierno (julio-agosto) y aumentó en primavera y verano alcanzando su máximo valor en febrero ($P < 0.05$; Figura 1B).

Anomalías espermáticas

El plano nutricional solo afectó ($P < 0.01$) el porcentaje de espermatozoides abaxiales (1.2 ± 0.5 y $0.5 \pm 0.2\%$ para los carneros de los grupos CM y CN, respectivamente); no se encontró interacción entre el plano nutricional y el mes de colección en ninguna de las variables analizadas. El mes de colección afectó el porcentaje de anomalías de cabeza, pieza media y cola, y por ende, el porcentaje de anomalías totales ($P < 0.001$). En ambos grupos los mayores porcentajes ($P < 0.05$) de anomalías de cabeza se

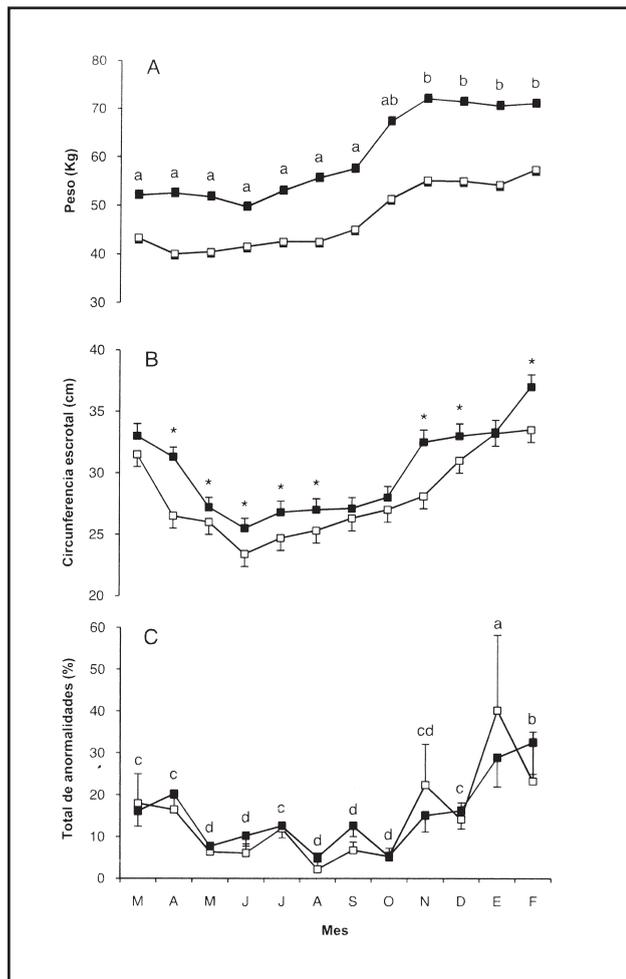


Figura 1. Peso Vivo (kg, A), circunferencia escrotal (cm, B) y porcentaje de anomalías totales ($x \pm eem$, C) en carneros Corriedale pastoreando sobre pasturas mejoradas (■, n=10) y campo nativo (□, n=10) a lo largo de un año. El asterisco indica diferencias entre grupos ($P < 0.01$), letras diferentes indican diferencias entre meses ($P < 0.05$). En la Fig. A la diferencia entre tratamientos es significativa ($P < 0.05$) en todos los meses.

registraron en verano (Fig. 2A); el máximo porcentaje de anomalías de pieza media se registró en el mes de febrero (Fig. 2B), mientras que el de cola y total se observaron en enero (Fig. 2C y 1C). Cuando se analizaron las anomalías específicas independientemente del plano nutricional, se encontró que todas eran influidas por el mes de colección ($P < 0.001$) excepto los porcentajes de espermatozoides con cabezas piriformes y estrechas en la base, cabezas sueltas normales y anormales, gotas citoplasmáticas proximales y colas enrolladas (Cuadros 1, 2 y

3). El porcentaje de espermatozoides con acrosoma dañado fue máximo ($P < 0.05$) al inicio del verano (diciembre: $5.1 \pm 1.9\%$), mientras que los porcentajes de espermatozoides con cabezas con contorno anormal y tamaño diferente fueron máximos ($P < 0.05$) a mitad del mismo (febrero: $1.1 \pm 0.2\%$ y $1.6 \pm 0.2\%$, respectivamente, Cuadro 1). Las anomalías de cabeza representaron el 21% del total de anomalías observadas en todo el trabajo, siendo los defectos de acrosoma y las cabezas de diferente tamaño las anomalías de cabeza más frecuentes (36

y 18% del total de anomalías de cabeza, respectivamente).

Las anomalías de pieza media fueron máximas ($P < 0.05$) a mediados de verano en ambos grupos de carneros (febrero: $2.9 \pm 0.4\%$ y $2.1 \pm 0.5\%$ en los grupos CM y CN, respectivamente; Figura 2B). Independientemente del plano nutricional, el porcentaje de espermatozoides con pieza media anormal fue máximo ($P < 0.05$) en verano (febrero: $2.3 \pm 0.6\%$), mientras que, el porcentaje de abaxiales alcanzó los valores más elevados en invierno (julio: $1.3 \pm 0.1\%$) y pri-

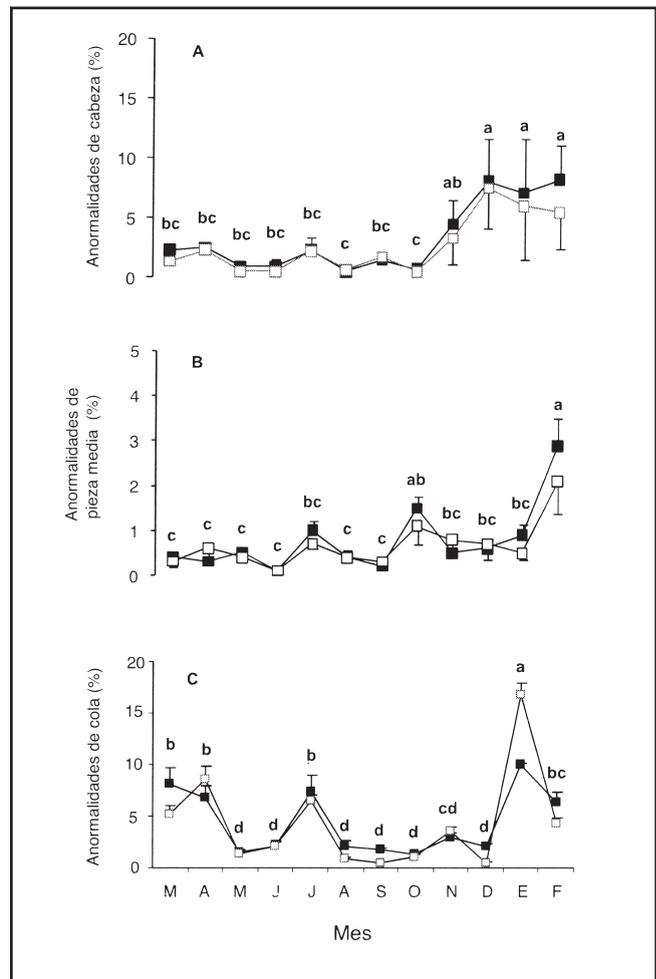


Figura 2. Porcentaje ($x \pm eem$) de anomalías de cabeza (A), pieza media (B) y cola (C) en carneros pastoreando sobre pasturas mejoradas (■, n=10) o campo nativo (□, n=10). Letras diferentes indican diferencias entre meses ($P < 0.05$).

Cuadro 1. Porcentaje de anomalías de cabeza en semen de carneros a lo largo de un año (media ± eem).

| Mes | Acrosoma dañado | Contorno anormal | Diferente tamaño | Piriforme | Cabeza suelta anormal | Estrecho en la base |
|------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|------------|-----------------------|---------------------|
| Marzo | 0.5 ± 0.11 ^{cd} | 0.3 ± 0.07 ^{bc} | 0.4 ± 0.09 ^{bc} | 0.1 ± 0.02 | 0.4 ± 0.02 | 0.3 ± 0.04 |
| Abril | 0.9 ± 0.11 ^{bcd} | 0.5 ± 0.09 ^{bc} | 0.4 ± 0.07 ^{bc} | 0.2 ± 0.02 | 0.4 ± 0.02 | 0.3 ± 0.02 |
| Mayo | 0.1 ± 0.02 ^d | 0.3 ± 0.02 ^{bc} | 0.3 ± 0.09 ^{bc} | 0.1 ± 0.01 | 0 | 0.1 ± 0.02 |
| Junio | 0.4 ± 0.09 ^d | 0 ^c | 0 ^c | 0 | 0 | 0.7 ± 0.09 |
| Julio | 0.6 ± 0.09 ^{cd} | 0.7 ± 0.16 ^{ab} | 0.5 ± 0.07 ^{bc} | 0.4 ± 0.04 | 0 | 0.4 ± 0.04 |
| Agosto | 0.1 ± 0.02 ^d | 0 ^c | 0.4 ± 0.02 ^{bc} | 0 | 0 | 0.1 ± 0.02 |
| Septiembre | 0.9 ± 0.11 ^{bcd} | 0.3 ± 0.04 ^{bc} | 0.4 ± 0.11 ^{bc} | 0.1 ± 0.01 | 0 | 0.2 ± 0.02 |
| Octubre | 0.4 ± 0.04 ^d | 0.2 ± 0.04 ^{bc} | 0 ^c | 0 | 0 | 0.2 ± 0.02 |
| Noviembre | 0.9 ± 0.20 ^{bcd} | 0.7 ± 0.11 ^{ab} | 0.4 ± 0.09 ^{bc} | 0.5 ± 0.04 | 1.3 ± 0.43 | 1.0 ± 0.11 |
| Diciembre | 5.1 ± 1.86 ^a | 1.0 ± 0.16 ^{ab} | 0.6 ± 0.13 ^b | 0.4 ± 0.02 | 0.8 ± 0.38 | 0.2 ± 0.02 |
| Enero | 2.5 ± 0.54 ^b | 0.8 ± 0.16 ^{ab} | 1.1 ± 0.18 ^{ab} | 1.1 ± 0.20 | 1.4 ± 0.56 | 0.5 ± 0.07 |
| Febrero | 2.3 ± 0.56 ^b | 1.1 ± 0.22 ^a | 1.6 ± 0.22 ^a | 1.5 ± 0.25 | 0.5 ± 0.16 | 0.6 ± 0.14 |

Literales diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Cuadro 2. Porcentaje de piezas medias y colas anormales en semen de carneros a lo largo de un año (media ± eem).

| Mes | Pieza Media anormal | Abaxial | Torsión simple | Torsión doble | Cola enrollada |
|------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------|
| Marzo | 0.6 ± 0.09 ^b | 0.1 ± 0.02 ^{bc} | 5.9 ± 0.55 ^{bc} | 0.8 ± 0.04 ^{bc} | 0.6 ± 0.04 |
| Abril | 0.5 ± 0.16 ^b | 0.4 ± 0.04 ^{bc} | 7.3 ± 0.56 ^b | 0.7 ± 0.22 ^{bc} | 0.3 ± 0.04 |
| Mayo | 0.2 ± 0.02 ^b | 0.5 ± 0.04 ^b | 0.9 ± 0.90 ^e | 0.3 ± 0.22 ^{bc} | 0.6 ± 0.22 |
| Junio | 0.1 ± 0.02 ^b | 0 ^c | 1.8 ± 0.23 ^{de} | 0 ^c | 0.2 ± 0.02 |
| Julio | 0.4 ± 0.09 ^b | 1.3 ± 0.11 ^a | 5.7 ± 0.51 ^{bc} | 1.1 ± 0.09 ^{ab} | 1.0 ± 0.09 |
| Agosto | 0.6 ± 0.09 ^b | 0 ^c | 1.3 ± 0.15 ^{de} | 0 ^c | 0.3 ± 0.04 |
| Septiembre | 0.5 ± 0.22 ^b | 0 ^c | 0.6 ± 0.11 ^e | 0.7 ± 0.22 ^{bc} | 0.3 ± 0.02 |
| Octubre | 1.6 ± 0.11 ^b | 1.0 ± 0.22 ^a | 1.0 ± 0.11 ^e | 0 ^c | 0.3 ± 0.04 |
| Noviembre | 0.5 ± 0.22 ^b | 0.5 ± 0.04 ^b | 1.8 ± 0.18 ^{de} | 1.9 ± 0.20 ^a | 1.3 ± 0.16 |
| Diciembre | 0.8 ± 0.09 ^b | 0.2 ± 0.02 ^{bc} | 0.6 ± 0.05 ^e | 0.6 ± 0.09 ^{bc} | 0.5 ± 0.04 |
| Enero | 1.0 ± 0.16 ^b | 0.3 ± 0.04 ^{bc} | 12.7 ± 0.49 ^a | 0.8 ± 0.22 ^{bc} | 0.7 ± 0.11 |
| Febrero | 2.3 ± 0.58 ^a | 0.5 ± 0.04 ^b | 3.8 ± 0.27 ^{cd} | 2.0 ± 0.22 ^a | 1.7 ± 0.18 |

Literales diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

mavera (octubre: $1.0 \pm 0.2\%$; Cuadro 2). Las anomalías de pieza media representaron el 7% del total de anomalías observadas en todo el trabajo, siendo las piezas medias anormales la alteración específica más frecuentemente encontrada (66% del total de anomalías de pieza media).

Los mayores porcentajes ($P < 0.05$) de colas anormales fueron observados en enero en ambos grupos (10 ± 0.1 y $16.8 \pm 1.2\%$ en los grupos CM y CN, respectivamente, Figura 2C). Cuando se analizaron las anomalías específicas de cola independientemente del plano nutricional (Cuadro 2), el máximo porcentaje de espermatozoides con torsiones simples fue observado en enero ($12.7 \pm 0.5\%$) cuando aumentó en forma marcada con

respecto al mes anterior (diciembre: $0.6 \pm 0.05\%$) para luego bajar al siguiente mes (febrero: 3.8 ± 0.3). Por su parte, el porcentaje de espermatozoides con torsiones dobles fue máximo en febrero ($2.0 \pm 0.2\%$). Las anomalías de cola fueron las alteraciones más frecuentemente observadas en todo el trabajo (31%), siendo las torsiones simples la anomalía específica más común (73% del total de anomalías de cola). El porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática distal sufrió fluctuaciones a lo largo del año observándose en ambos grupos valores altos ($P < 0.05$) desde septiembre a febrero exceptuando el mes de octubre (Cuadro 3). Esta alteración fue la segunda más frecuente (23% del total de anomalías).

Las anomalías que no fueron influenciadas por ninguno de los factores estudiados se presentan en el Cuadro 1 (porcentaje de cabezas piriformes, cabezas sueltas anormales y estrechos en la base), Cuadro 2 (porcentaje de colas enrolladas), y Cuadro 3 (espermatozoides con gota citoplasmática proximal y cabezas sueltas normales). Los porcentajes de espermatozoides con gota citoplasmática proximal y las cabezas sueltas normales representaron respectivamente 7 y 11% del total de anomalías observadas a lo largo del trabajo. Las correlaciones entre porcentaje de anomalías de cabeza y horas luz del mes correspondiente a la colección de semen, del mes anterior y de dos meses antes, fueron 0.80 ($P < 0.001$), 0.73 ($P < 0.001$) y 0.66

Cuadro 3. Porcentaje de espermatozoides con gota citoplasmática proximal y distal y cabezas sueltas normales por mes de colección.

| Mes | Gota citoplasmática proximal (%) | Gota citoplasmática distal (%) | Cabezas sueltas normales (%) |
|------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Marzo | 2,55 ± 0,79 | 2,00 ^{bc} ± 0,24 | 2,30 ± 0,32 |
| Abril | 2,30 ± 0,40 | 2,85 ^{bc} ± 0,51 | 2,70 ± 0,40 |
| Mayo | 0,35 ± 0,05 | 2,75 ^{bc} ± 0,52 | 1,35 ± 0,30 |
| Junio | 0,30 ± 0,03 | 2,85 ^{bc} ± 0,46 | 1,50 ± 0,30 |
| Julio | 0,40 ± 0,10 | 0,35 ^c ± 0,10 | 1,45 ± 0,13 |
| Agosto | 0,23 ± 0,06 | 0,20 ^c ± 0,06 | 1,00 ± 0,14 |
| Septiembre | 0,65 ± 0,07 | 7,10 ^a ± 1,10 | 0,45 ± 0,08 |
| Octubre | 0,45 ± 0,14 | 0,60 ^c ± 0,09 | 0,70 ± 0,06 |
| Noviembre | 2,35 ± 0,49 | 7,60 ^a ± 0,92 | 1,05 ± 0,13 |
| Diciembre | 0,50 ± 0,09 | 4,20 ^{ab} ± 0,40 | 0,40 ± 0,05 |
| Enero | 1,80 ± 0,35 | 6,35 ^a ± 0,95 | 5,55 ± 1,60 |
| Febrero | 2,20 ± 0,38 | 7,35 ^a ± 1,34 | 3,30 ± 0,54 |

Literales diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05)

(P<0.019), respectivamente. El porcentaje de cabezas sueltas anormales y acrosomas dañados fueron las variables que presentaron mayor correlación con las horas luz del mes de colección ($r = 0.81$ y 0.70 , respectivamente; $P < 0.01$), del mes anterior ($r = 0.75$ y 0.64 , respectivamente; $P < 0.03$) y de dos meses antes de la colección ($r = 0.74$ y 0.58 , respectivamente, $P < 0.05$). También, se encontraron correlaciones significativas entre el porcentaje de anomalías de cabeza y temperatura máxima registradas en el mes de colección ($r = 0.64$; $P < 0.002$). El porcentaje de cabezas sueltas normales y la temperatura del mes de colección y del mes anterior también fueron altas y significativas ($r = 0.67$ y 0.60 ; $P < 0.07$) pero no se encontró correlación significativa ($P > 0.1$) entre estas variables y las horas luz.

DISCUSIÓN

El plano nutricional no afectó la morfología espermática, excepto el porcentaje de espermatozoides abaxiales que fue mayor en los carneros pastoreando pasturas mejoradas que campo nativo. La suplementación incrementa la producción espermática en carneros (Salamon, 1964; Kheradmand y col., 2006), pero los efectos sobre la calidad del semen no son evidentes. La suplementación no afectó el porcentaje de espermatozoides vivos/muertos (Fernández y col., 2004; Kheradmand y col., 2006), ni mejoró la motilidad o la morfología espermática (Salamon, 1964). Aún más, nuestro equipo (Bielli y col., 1997) no observó cambios

en los porcentajes de anomalías en carneros y condiciones similares. En el presente trabajo, si bien, las medias entre tratamientos difirieron estadísticamente, sólo en octubre el porcentaje de espermatozoides abaxiales observados superó el 1%.

Por el contrario, el mes de colección afectó la morfología espermática; sólo los porcentajes de espermatozoides con cabeza piriforme, con gota citoplasmática proximal y cabezas sueltas (normales y anormales) y estrechos en la base no fueron influidos por este factor. En términos generales, los porcentajes de alteraciones espermáticas aumentaron en primavera y lograron los máximos valores en verano. El aumento de las anomalías espermáticas coincidió con el incremento del PV y CE. El crecimiento de la CE y el PV en carneros en primavera había sido previamente reportado por nuestro grupo (Pérez-Clariget y col., 1997, 1998) y es reflejo de la mayor disponibilidad y calidad de pasturas, tanto nativas como mejoradas, que se da naturalmente en primavera en la región (Berreta y col., 1994). Es improbable que una mejora en el plano nutricional sea responsable del incremento en el porcentaje de anomalías espermáticas observadas, por lo que, otros factores como el fotoperiodo y la temperatura incluidos en el efecto mes, deben haber influido negativamente sobre la espermatogénesis y su efecto no pudo ser contrarrestado por una mejor alimentación. Sin embargo, si tenemos en cuenta el tiempo que transcurre en la for-

mación de un espermatozoide antes de ser eyaculado (Ortavant, 1958; Setchel, 1977), los espermatozoides colectados en parte de la primavera fueron formados en invierno, cuando la disponibilidad y calidad del forraje es menor (Formoso y Castrillejo, 1989; Berreta y col., 1994), pero, esta disminución no se vio reflejada en cambios en el PV.

El efecto del fotoperiodo sobre el porcentaje de espermatozoides anormales en el semen de carnero ha sido descrito por diferentes autores trabajando en latitudes altas del hemisferio norte y con razas con gran dependencia de las horas luz (Colas, 1980; Mickelsen y col., 1981), así como en carneros Corriedale en latitudes similares a las del presente trabajo (Nonato-Girao y Mies-Filho, 1985) y en Uruguay (Pérez-Clariget y col., 1997). También se ha descrito el efecto detrimental de las altas temperaturas sobre la espermatogénesis tanto en modelos experimentales (Williamson, 1974; Manco y col., 2000) como en trabajos de campo (Dutt y Simpson, 1957; Cupps y col., 1960). Sin embargo, existen variaciones entre razas en cuanto a la termo resistencia (Carmenate y Gamcik, 1982; Taha y col., 2000) o la fotodependencia (Martin y col., 2002). Las razas altamente fotodependientes y a latitudes alejadas del Ecuador presentan los mayores porcentajes de anomalías espermáticas fundamentalmente en primavera, reflejando la alteración de la espermatogénesis en respuesta al fotoperiodo adverso (Colas, 1980; Mickelsen y col., 1981). En nues-

tro trabajo, los mayores porcentajes de anomalías fueron observados en verano, en los meses de mayor calor (diciembre a febrero). Aún más, las anomalías de cabeza estuvieron asociadas a la media de temperatura máxima del mes correspondiente a la colección del eyaculado ($r: 0.71; P<0.009$) También es de notar que el mayor porcentaje de colas con torsión simple fue observado en enero. Temperaturas de 37.9°C (Manco y col., 2000) o 40°C (Williamson 1974) aplicadas directamente al escroto provocaron un aumento de las anomalías de cabeza, cabezas sueltas y de cola observado dos a tres semanas después de aplicado el shock térmico (Williamson, 1974; Manco y col., 2000). Las temperaturas del verano (temperatura máximas media: 29.1°C, 30.9°C, 29.4°C en diciembre, enero y febrero, respectivamente) muy probablemente contribuyeron al aumento de anomalías observadas en ese periodo, confirmando que la espermatogénesis en esta raza es susceptible a las altas temperaturas como había sido señalado por Carmenate y Gamcik (1982) quienes observaron que en Cuba las altas temperaturas influían el porcentaje de anomalías de cabeza y total en carneros Corriedale pero no en carneros Pelibuey. Sin embargo, se debe tener en cuenta

que los espermatozoides que se observan en el eyaculado son formados varias semanas antes, como ya se dijo, por lo que no se puede descartar el efecto detrimental del fotoperiodo, más teniendo en cuenta que las anomalías de cabeza estuvieron asociadas a las horas luz tanto del mes correspondiente como con las del mes anterior a la colección del eyaculado ($r: 0.66, P<0.019$, y $0.73, P<0.008$, para el mes correspondiente, y el mes anterior, respectivamente). Teniendo en cuenta que las anomalías de cabeza son producto de alteraciones de la espermatogénesis, es posible plantear que en los carneros Corriedale en condiciones pastoriles en latitudes intermedias, el fotoperiodo inhibitorio de primavera interfiere la espermatogénesis pero que esta influencia no es tan marcada como en otras razas más fotodependientes. Por último, existió una variación individual entre carneros en la mayoría de las anomalías estudiadas ($P<0.01$), evidenciando respuestas de diferente intensidad a los estímulos a los que los carneros estaban sometidos.

Independientemente del mes, las anomalías más frecuentemente observadas fueron las de cola, seguidas de espermatozoides con gota citoplasmática distal y

las anomalías de cabeza que representaron juntas 75% del total de las anomalías observadas. Las anomalías específicas más frecuentes fueron espermatozoides con gota citoplasmática distal y con torsión simple de cola sumando entre ellas casi 50% del total de anomalías observadas en todo el trabajo. Las anomalías de cola han sido reportadas como las más frecuentes también por otros autores (Colas, 1980; Mickelsen y col. 1981; Stefanov y col., 2009).

Los resultados del presente trabajo sugieren que los carneros en condiciones pastoriles y latitudes intermedias responden al incremento de la disponibilidad y calidad del forraje de primavera aumentando el tamaño testicular. Sin embargo, el fotoperiodo inhibitorio de esa estación altera la espermatogénesis, reflejado en un incremento de anomalías de cabeza, sin llegar a los niveles que presentan razas altamente fotodependientes a latitudes elevadas y son sensibles a las altas temperaturas del verano; es en esta estación cuando se registraron los máximos valores de anomalías espermáticas, sin que un mejor plano nutricional modificara el efecto de estos factores.

Referencias Bibliográficas

- Almeida, A.; Schwalbach, L.; Cardoso, I.; Greyling, J.** (2007). Scrotal, testicular and semen characteristics of young Boer bucks fed winter veld hay: The effect of nutritional supplementation. *Small Ruminant Research* 73 (1):216-220.
- Barth, A.D.; Oko, R. J.** (1989). Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames Iowa, Ed. Iowa State University Press, Ames Iowa, 291 p.
- Berreta, E.J.; San Julián, R.; Montossi, F.; Silva, J.A.** (1994). Natural pastures and sheep production in the basaltic regions in Uruguay. Proc. IV World Merino Congress, April, Montevideo, Uruguay, pp. 245-261.
- Bielli, A.; Gastel, T.; Pérez, R.; López, A.; Castrillejo, A.; Regueiro, M.; Forsberg, M.; Lundeheim, N.; Rodriguez-Martínez, H.** (1997). Influence of nutrition on seasonal variations in testicular morphology and function in Corriedale rams. *J. Reprod. Dev.* 43(2):171-180.
- Carmenate, P.C.; Gamcik, P.** (1982). Effect of some climatic factors on the physical and morphological properties of ram semen. *Folia Veter.* 26:65-75.
- Colas, G.** (1980). Variations saisonnières de la qualité du sperme chez la bélier Ile-de-France. I. Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 20(6):1789-1799.
- Cupps, P. T.; McGowan, B.; Rahlmann, D. F.; Reddon, A. R.; Weir, W. C.** (1960). Seasonal changes in the semen of rams. *J. Anim. Sci.* 19:208-213.
- Dutt, H.; Simpson, E.C.** (1957). Environmental temperature and fertility of Southdown rams early in the breeding season. *J. Anim. Sci.* 16:136-143.
- Fernández, F.; Giráldez, P.; Frutos, P.; Lavín, A.; Mantecón.** (2004). Effect of undegradable protein supply on testicular size, spermogram parameters and sexual behavior of mature Assaf rams. *Theriogenology* 62(12): 299-310.
- Fourie, P.J.; Schwalbach, L.M.; Nesor, F.W.C.; Van der Westhuizen, C.** (2004). Scrotal, testicular and semen characteristics of young Dorper rams managed under intensive and extensive conditions. *Small Ruminant Research* 54:53-59.
- Formoso, D.; Castrillejo, A.** (1989). Selectividad ovina en sistemas intensivos de pastoreo. *Producción Ovina* 2:1-9.

- Gastel M.T.; Bielli, A., Pérez, R.; López, A.; Castrillejo, A.; Tagle, R.; Franco, J.; Laborde, D.; Forsberg, M.; Rodríguez-Martínez, H.** (1995). Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corriedale rams. *Anim. Reprod. Sci.* 40(1): 59-75.
- Hulet, C.V.; Foote, W.C.; Blackwell, R.L.** (1965). Relationship of semen quality and fertility in the ram to fecundity in the ewe. *J.Reprod.Fertil.* 9:311-315.
- Kheradmand, A.; Babaei, H.; Batavani, R.A.** (2006). Effect of improved diet on semen quality and scrotal circumference in the ram. *Vet. Arhiv.* 76:333-341
- Lagerlöf N.** (1934). Researches concerning morphologic changes in the semen picture and in the testicles of sterile and subfertile bulls. *Acta Path. Microbiolog. Scand. Suppl.* 19: 254-267.
- Lagerlöf, N.** (1938). Infertility in male domestic animals. *Vet. Med.* 33:550-61.
- Manco M, Y; Leyva V, V; Camacho S, J; Cueva M, S.** (2000). Efecto de la temperatura escrotal sobre el comportamiento sexual y la calidad de semen de ovinos Pelibuey y Merino Precoz Alemán. *Rev. Inv. Vet. Perú* 1:153-162.
- Marco-Jiménez, F.; Puchades, S.; Gadea, J.; Vicente, J.S.; Viudes-de-Castro, M.P.** (2005). Effect of semen collection method on pre and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology* 64 (8): 1756-1765.
- Martin, G.B; Hötzel, M.J.; Bache, D.; Walkden-Brown, S.W.; Bñackberry, M.A.; Boukhliq, R.; Fisher, J.S.; Miller, D.W.** (2002). Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of responses to photoperiod by annual cycle in food supply. *Reproduction, Fertility and Developemet* 14(3):165-175.
- Mickelsen, W.D.; Paisley, L.G.; Dahmen, J.J.** (1981). The effect of season on the scrotal circumference and sperm motility and morphology in rams. *Theriogenology* 16(1):45-51.
- Nonato-Girao, R.; Mies-Filho, A.** (1985). Características do semen de carneiros Corriedale mantidos em fotoperíodo e temperatura controlados e naturais. *Pesq. Agropec. Brás. Brasília* 20:1395-1407.
- Ortavant, R.** (1958). Lê cycle spermatogénétique chez lé bélier. These Doct. Sci. Université de Paris, Paris, France.
- Pérez-Clariget, R.; López, A.; Castrillejo, A.; Bielli, A.; Laborde, D.; Gastel, T.; Tagle, R.; Queirolo, D.; Franco, J.; Forsberg, M.; Rodríguez-Martínez, H.** (1997). Reproductive seasonality of Corriedale rams under extensive rearing conditions. *Acta Vet. Scand.* 38(1):109-117.
- Pérez-Clariget R., Forsberg M., Rodríguez-Martínez H.** (1998). Seasonal variation in live weight, testes size, testosterone, LH secretion, melatonin and thyroxine in Merino and Corriedale rams in a subtropical climate. *Acta Vet. Scand.* 39(1): 35-47.
- Setchell, B. P.** (1977). Male reproductive organs and semen. En: Cole H.H., Cupps P. T, *Reproduction in Domestic Animals*, Third ed., New York, Academic Press pp 229-25.
- Salamon, S.** (1964). The effect of nutritional regimen on the potential semen production of rams. *Aust. J. Agric. Res.* 15(4):645 – 656.
- Stefanov, R.; Sabev, M; Nikolov, I.; Anev, G ; Ivanova-Kicheva, M.; Miteva, K.; Lazov, K.** (2009). Influence of some natural-climatic factors on the sperm production of northeast Bulgarian fine-fleece breed. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25:695-701.
- Sullivan, J.J.** 1977. Morphology and motility of spermatozoa. En: Salisbury, G. W.; Van Denmark, N.L. and Lodge, J.R. (Eds), *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*, Second Edition, W.H. Freeman and Company, San Francisco, pp 286-328.
- Taha T. A.; Abdel-Gawad, E. I.; Ayoub, M. A.** (2000). Monthly variations in some reproductive parameters of Barki and Awassi rams throughout 1 year under subtropical conditions I. Semen characteristics and hormonal levels. *Anim. Sci.* 71:317-324.
- Williams, W.W.** (1920). Technique of collecting semen for laboratory examination with a review of several diseased bulls. *Cornell Vet.* 10: 87-94.
- Williamson, P.** (1974). The fine structure of ejaculated ram spermatozoa following scrotal heating. *J.Reprod. Fert.* 40:191-195.



Comparación de tres métodos de sincronización de celos y ovulaciones con y sin inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) en vaquillonas para carne

Rusiñol, C.¹; Cavestany, D.^{2,3}

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la eficiencia de la sincronización de celos y ovulaciones en vaquillonas para carne ciclando, se realizó un ensayo con tres tratamientos en tres predios y en dos años consecutivos. Los tratamientos fueron: Ovsynch Modificado (OSYM) (n=1426), Heatsynch Modificado (HSYM) (n=1229) y Doble Prostaglandina (DPG) (n=1451) administradas con 14 días de intervalo. En los protocolos con inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) -OSYM y HSYM- se realizó detección de celos dos veces al día e inseminación artificial (IA) entre los días 5 y 7 de cada tratamiento y la IATF se realizó en los animales que no mostraron celo durante este periodo. En el tratamiento DPG, a las 36 horas de la segunda prostaglandina (PG) se inició la detección de celos e IA que continuó durante cinco días consecutivos. El Porcentaje de Preñez (PP) en los tratamientos fue del 68,9% (OSYM) del 70,0% (HSYM), y 49,4% (DPG), no existiendo diferencia significativa entre los protocolos IATF pero si la hubo entre éstos y el protocolo DPG (P<0,0001). El PP fue significativamente diferente entre años 67,6% y 56,6% para años 1 y 2 respectivamente; P<0,0001) y predios (predio A= 71,4; B= 62,3% y C= 56,8%; P<0,0001). No hubieron diferencias entre los predios B y C (62,3% y 56,8%; P>0,05) pero si la hubo entre éstos y el predio A (71,4%, P<0,0001). Los tres protocolos fueron eficientes pero los protocolos con IATF resultaron ser más eficaces al lograr un mayor porcentaje de preñez.

Palabras clave: Inseminación a tiempo fijo, Prostaglandinas, Ovsynch, Heatsynch

SUMMARY

To evaluate the efficiency of protocols for synchronization of estrus and ovulations in cycling beef heifers, an experiment was conducted including three treatments in three farms during two consecutive years. The treatments were: Modified-Ovsynch (OSYM) (n=1426), Modified-Heatsynch (HSYM) (n=1229) and Double Prostaglandin (DPG) given at a 14-day interval (n=1451). In the fixed-time artificial insemination (FTAI) protocols -OSYM and HSYM-, heat detection was done twice a day from Day 5 PM to Day 7 PM, and the animals in heat were inseminated using the AM/PM rule; the FTAI was done on the OSYM and HSYM protocols to the animals that did not show heat during the three days mentioned before. In the DPG treatment, heat detection and artificial insemination started 36 hours after the second prostaglandin (PG), and was done for five consecutive days. The Pregnancy Rate (PR) showed significant differences between years (67.6% and 56.6% to the years 1 y 2 respectively; P<0.0001) and farms (farm A= 71.4; B= 62.3% and C= 56.8%; P<0.0001). There were no statistical differences between the farms B and C (62.3% and 56.8%; P<0.05) but both were different to farm A (71.4%, P <0.0001). All three protocols were efficient, but those with IATF resulted in better pregnancy rates.

Key words: Fixed time insemination, Prostaglandins, Ovsynch, Heatsynch

INTRODUCCIÓN

Una de las dificultades para un mayor uso de la Inseminación Artificial (IA) es la detección de celos. En los últimos años se desarrollaron diferentes estrategias para eliminar este inconveniente y obtener la mayor cantidad de animales inseminados en el menor tiempo posible (Diskin y col., 2002; Geary y col., 2001; Pursley y col., 1995; Silcox y col., 1995; Thatcher y col., 2001). Desde la década del 70 hasta el año 1995 la sincronización de celos en los bovinos se realizó mediante la administración de prostaglandina F_{2α} (PG) (Inskeep, 1973; Lauderdale y col., 1974). Macmillan y

Thatcher (1991) y Thatcher y col. (1991) introdujeron un tratamiento de sincronización de celos en vacas administrando PG siete días después de la inyección GnRH. Al inicio de la década del 90 y a consecuencia del mayor conocimiento de la dinámica folicular (Savio y col., 1993), se desarrollaron diferentes métodos usando GnRH como generador de una nueva onda folicular y que, en combinación con otras hormonas, produce una sincronización de la ovulación permitiendo la inseminación a tiempo fijo, o sea sin detección de celos (Pursley y col., 1995; Pursley y col., 1997). En general estos métodos tienen

baja fertilidad, comparados con los que se basan en la inseminación luego de la detección de celos y no aseguran la sincronización de la ovulación en todos los animales ya que un porcentaje de éstos tienden a mostrar celos más tempranos respecto al momento de la IATF (Cavestany 2002; Dalton y col., 2005; DeJarnette y col., 2001; Kasimanickan y col., 2005; Martinez y col., 2004; Stevenson y col., 1999; Twagiramungu y col., 1992). La hipótesis fue que los protocolos de sincronización de celos y ovulaciones (IATF) permiten lograr un mayor porcentaje de preñez cuando se usan con detección de celos

¹DV, MSc, Ejercicio Liberal, Uruguay.

²DV, MSc, PhD, Departamento de Reproducción, Facultad de Veterinaria, Montevideo, Uruguay.

Correo electrónico: daniel.cavestany@gmail.com

Recibido: 14/1/11 Aprobado: 5/4/11

entre los días 5 PM y 7 PM a partir del comienzo de los mismos y son superiores a los obtenidos con DPG. El objetivo del trabajo fue comparar tres protocolos de inseminación, uno basado exclusivamente en la detección de celos e IA y dos combinando DC e IA con inseminación a tiempo fijo (IATF).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

El trabajo se llevó a cabo en tres predios (A, B y C), en dos años, 2005 (año 1) y 2006 (año 2) e involucró 4106 vaquillonas para carne de razas Hereford, Aberdeen Angus y sus cruza, de 18 a 24 meses de edad, 250 ± 15 kg peso corporal y 4.12 ± 0.05 de condición corporal de promedio en una escala de 1 a 8 (Vizcarra y col. (1986). Los tres establecimientos fueron seleccionados en diferentes departamentos; el Establecimiento «A» ubicado en el Departamento de Florida, el Establecimiento «B» en el Departamento de Cerro Largo y el Establecimiento «C» en el Departamento de Artigas. Estos establecimientos realizaban control de enfermedades reproductivas y manejos sanitarios adecuados al momento de comenzar el trabajo. Se realizó un examen ginecológico previo por palpación rectal para determinar presencia de cuerpo lúteo y/o folículos mayores a 10 mm, descartar los animales preñados y en anestro. Se utilizaron animales presuntamente ciclando. En todas las inseminaciones se utilizó semen importado con garantía sanitaria y de fertilidad. Las hormonas utilizadas fueron: GnRH: Acetato de Buserelina (Receptal®) 2 mL (8,4 µg) i/m, Universal Lab, Montevideo, Uruguay. PG: Cloprostenol sódico (Bioprost®) 2 mL (500 µg) i/m, Biotay, Montevideo, Uruguay.

BE: Estradiol-3-Benzoato en vehículo oleoso (Estradiol 10â) 1 mL (1 mg) i/m, Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina. La detección de celos se realizó dos veces por día, en la mañana temprano y por la tarde, por un lapso de no menos de 45 minutos en cada observación. Con el fin de uniformizar los intervalos entre el tratamiento y la IA, los animales se inseminaron en grupos (espaciados dentro del mismo día o en días consecutivos). Se sincronizó tantos animales como era posible inseminar en un período de 2 horas. Por esta razón, las inseminaciones se realizaron en grupos de aproximadamente 150 animales. Todas las inseminaciones fueron realizadas por el Dr. Rusiñol. En los tres establecimientos se uniformizó la alimentación, manejo e inseminación. La comida de las vaquillonas fue siempre sobre pasturas naturales mejoradas. La distribución de animales por tratamiento en cada predio y por año se resume en el Cuadro 1.

Tratamientos

Protocolo OSYM

Día 0 AM, aplicación de GnRH, día 6 AM aplicación de PG (Twagiramungu y col., 1992). En los días 5 PM, 6 AM/PM y 7 AM/PM se realizó DC e IA. El día 8 AM aplicación de la segunda dosis de GnRH. El día 8 PM se efectuó la IATF dentro de las 14 y 17 horas de administrada la segunda GnRH. A los 17 días de la primera inseminación se realizó el repaso con IA por 5 días.

Protocolo HSYM

Día 0 AM aplicación de GnRH; en los días 5 PM, 6 AM/PM y 7 AM/PM se realizó DC e IA; día 6 AM aplicación de PG. Los animales que mostraron celo antes, fueron inseminados y no siguieron

en el grupo. El día 7 AM aplicación de BE, día 8 PM, a las 36 horas de la aplicación del BE, se realizó la IATF. A los 17 días de la primera inseminación se realizó el repaso con IA por 5 días.

Protocolo DPG

Se aplicaron dos dosis de PG con un intervalo de 14 días entre ellas. A los 17 días de la primera inseminación se realizó el primer repaso con IA a celo visto por 5 días.

Definición de parámetros de eficiencia reproductiva

- El porcentaje de detección de celos (PDC) se definió como el porcentaje de animales detectados en celo sobre el total de ofrecidos.

En los protocolos IATF la detección de celos es igual a 100% ya que se insemina el 100% de los animales. Para el Protocolo DPG se tuvo en cuenta aquellos animales que manifestaron celo en los 5 días consecutivos a partir de las 36 horas de la segunda aplicación de PG.

- El Porcentaje de Concepción (PC), se definió como el porcentaje de animales preñados sobre el total de inseminados.
- El Porcentaje de preñez (PP) se definió como el porcentaje de animales preñados sobre el total de ofrecidos (o como el producto de PDC x PC).

Análisis estadístico

El análisis se hizo por regresión logística con el procedimiento PROC LOGISTIC de SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA; v. 9.1.3). El análisis de las frecuencias se realizó por PROC FREQ de SAS. Se tuvo en cuenta el efecto tratamiento, año y el efecto predio. Se estableció un nivel de significancia de 5%.

Cuadro 1. Distribución de animales por protocolo, por predio y por año.

| Protocolo | Año 1 | | | | Año 2 | | | Total | |
|-----------|--------|-----|----------|--------|-------|----------|-----|-------|------|
| | Predio | | Subtotal | Predio | | Subtotal | | | |
| | A | B | | A | B | | | | |
| OSYM | 256 | 270 | 314 | 840 | 168 | 183 | 235 | 586 | 1426 |
| HSYM | 140 | 241 | 195 | 576 | 155 | 274 | 224 | 653 | 1229 |
| DPG | 231 | 236 | 211 | 678 | 302 | 219 | 252 | 773 | 1451 |
| Total | 627 | 747 | 720 | 2094 | 625 | 676 | 711 | 2012 | 4106 |

Cuadro 2. Porcentaje de vaquillonas inseminadas a tiempo fijo (IATF) en los protocolos OSYM y HSYM

| Protocolo | n | IATF ³ | OR ⁴ | IC ⁵ |
|-------------------|------|-------------------|-----------------|-----------------|
| OSYM ¹ | 1102 | 77,3 ^a | 5,165 | 4,364-6,113 |
| HSYM ² | 488 | 39,7 ^b | 1,000 | Referente |

¹ Ovsynch modificado; ² Heatsynch modificado; ³ Inseminación Artificial a Tiempo Fijo; ⁴ Odds Ratio; ⁵ Intervalo de Confianza de 95%; ^{a, b} P<0,0001.

Cuadro 3. Porcentaje de celos prematuros detectados en los protocolos HSYM (entre los días 5 PM y 7 PM) y DPG, o 36 horas a partir de la segunda inyección de PG).

| Protocolo | n | PCED ³ | OR ⁴ | IC ⁵ |
|-------------------|-----|-------------------|-----------------|-----------------|
| HSYM ¹ | 741 | 60,3 ^a | 0,895 | 0,765-1,046 |
| DPG ² | 913 | 63,0 ^a | 1,000 | Referente |

¹ Heatsynch modificado; ² Doble Prostaglandina; ³ Porcentaje de Celos Detectados; ⁴ Odds Ratio; ⁵ Intervalo de confianza de 95%; ^a: P>0.1.

RESULTADOS

En el Cuadro 2 se presenta el porcentaje de animales inseminados a tiempo fijo en los protocolos OSYM y HSYM. En el protocolo OSYM hubo mayor cantidad de IATF que en el HSYM y solo un 22,7 % de los animales mostraron celo prematuramente y fueron inseminados antes del momento asignado para realizar la IATF. Este porcentaje, al igual que en el HSYM (60,3 %), se consideró entonces como inseminados luego de un celo detectado (IACD).

En el Cuadro 3 se compara el porcentaje de celos prematuros del protocolo HSYM (ocurridos antes de la IATF) y los celos detectados en el protocolo DPG. Los mismos fueron de 60,3% para el HSYM y de 63,0% para el DPG (P>0.1)

Los porcentajes de concepción de los tres protocolos evaluados (Cuadro IV) fueron de 68,9%, 70,0% y 78,4% respectivamente. El porcentaje de concepción fue diferente entre los protocolos IATF y el DPG donde además en este último protocolo se obtuvo un mayor PC que los protocolos con IATF. Los animales de los protocolos OSYM y HSYM tuvieron 1,663 y 1,519 veces menos probabilidad de concebir que los inseminados con el DPG. En el mismo Cuadro se observa que la concepción en el año 1 fue mayor que en el año 2, así como entre los tres predios utilizados (A, B y C) donde el predio A tuvo mayor PC que los predios B y C.

En el Cuadro 4 se presenta el Porcentaje de Preñez (PP) por protocolo, predio y año. Existieron diferencias significativas

Cuadro 4. Porcentaje de Concepción general en vaquillonas para carne en los tratamientos OSYM, HSYM y DPG por Año y Predio

| Protocolo | n | Porcentaje de concepción | | |
|---------------|-------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|
| | | PC ¹ | OR ² | IC ³ |
| OSYM | 1426 | 68,9 ^a | 1,663 | 1,367-2,020 |
| HSYM | 1229 | 70,0 ^a | 1,519 | 1,245-1,858 |
| DPG | 913 | 78,4 ^b | 1,0 | Referente |
| Año | | | | |
| 1 | 1907 | 74,4 ^c | 1,327 | 1,137-1,548 |
| 2 | 1661 | 68,6 ^d | 1,0 | Referente |
| Predio | | | | |
| A | 976 | 84,8 ^e | 1,208 | 1,001-1,457 |
| B | 1335 | 73,2 ^f | 1,088 | 0,909-1,303 |
| C | 1257 | 65,1 ^g | 1,0 | Referente |
| Total | 3568⁴ | | | |

¹ Porcentaje de Concepción; ² Odds Ratio; ³ Intervalo de Confianza de 95%; ⁴ 538 animales no se inseminaron por no presentar o no detectarse celo; ^{a, b} P<0,0001; ^{c, d, e, f, g} P<0,0001.

a favor de los dos protocolos con IATF (OSYM y HSYM) respecto al DPG. La diferencia se debe a que en los dos protocolos IATF se inseminaron el 100% de los animales y en el protocolo DPG el porcentaje de animales inseminados fue menor (63%) debido a que 538 vaquillonas no presentaron celo o éstos no fueron detectados. Los animales inseminados a tiempo fijo tuvieron entre 2,2 y 2,3 veces más probabilidad de quedar preñados que los que se inseminaron a celo detectado con DPG.

En el Cuadro VI se presenta el porcentaje de preñez obtenido en las inseminaciones a celo detectado (IACD) y a tiempo fijo (IATF) en los dos protocolos en los que se realizó IATF. Los animales inseminados luego de un celo detectado tuvieron 2,3 veces más probabilidad de quedar preñados que los inseminados a tiempo fijo.

DISCUSIÓN

En los dos tratamientos con IATF realizados la administración de PG para producir la luteólisis se realizó al sexto día de iniciado cada protocolo, lo que difiere con trabajos donde esta hormona se aplica en el día 7 del protocolo (Cavestany y col., 2000; Dalton y col., 2005; de la Sota y col., 2000; Geary y Whittier, 1998; Kasimanickan y col., 2005; Moreira y col., 2000; Pursley y col., 1995; Schmitt y col., 1996; Stevenson y col., 1999; Vasconcelos y col., 1999). No obstante, Twagiramungu y col. (1992) y Dahlen y col. (2002) encontraron que en vaquillonas de carne no había diferencias significativas respecto a la respuesta de la administración de PG el día 6 o 7 de iniciado los protocolos y por lo tanto para este trabajo se tomó esta variante con la finalidad de acortar un día los protocolos IATF utilizados, obteniéndose resultados similares a estos autores. Twagiramungu y col. (1992) detectaron celos por 10 días (desde la primera GnRH en adelante) mientras que Dahlen y col. (2002), no detectaron celos. En este trabajo, si bien la observación de celos se hizo solamente por 2 días (día 5 PM al 7 PM en los dos protocolos IATF), los porcentajes de celos detectados fueron mayores a los encontrados por Stevenson y col. (1999) y Twagiramungu y col. (1992). Estos celos (que se denominan prematuros pues ocurren antes del tiempo esperado) de otra

manera se habrían perdido y hubieran disminuido el porcentaje de preñez de la IATF, al inseminar animales que se encontraran en metaestro temprano (Dalton y col., 2005; Rivera y col., 2004; Thatcher y col., 2000; Yamada, 2005). El porcentaje de celos detectados en el protocolo DPG no fue diferente al del HSYM, pero la cantidad de animales inseminados fue menor, ya que en este último se inseminó el 100% de los animales y en el DPG se inseminaron sólo el 63%; Kasimanickam y col. (2005) describen resultados coincidentes. En el protocolo HSYM se detectaron más celos prematuros que en el OSYM y la razón fue la sustitución de la GnRH por BE al final del protocolo para inducir la ovulación, ya que el BE no inhibe las manifestaciones de celo, como sí lo hace la GnRH. Martínez y col. (2004) realizaron un trabajo con vaquillonas para carne usando BE para sincronizar la emergencia de las ondas foliculares y también encontraron que se producía un alto porcentaje de celos prematuros (28%) antes de la IATF, más bajo que los hallados en nuestro trabajo debido a que el protocolo usado fue algo diferente. Según estos autores, la aplicación de BE 24 horas luego de PG (administrada el día 6 de comenzada la sincronización de la emergencia de las ondas foliculares) da como resultado una expresión de celos muy baja (10,4%) que sumado al corto intervalo entre la PG y la aplicación del BE, produciría luteólisis prematura, hecho que aparentemente no se observó en nuestro trabajo corroborado por los resultados obtenidos. Estos investigadores no usaron GnRH sino BE para sincronizar la emergencia de las ondas foliculares (Día 0 del protocolo) y posiblemente ésta sea la diferencia entre sus resultados y los nuestros, donde se logró un alto porcentaje de celos en el HSYM.

La preñez fue mayor en los animales con IACD que en los con IATF. Estos resultados apoyarían la hipótesis que la fertilidad de la IACD es mayor que la de IATF, lo que coincide con varios reportes (Cavestany y col., 2005; Cavestany y col., 2007; Dalton y col., 2005; Lean y col., 2003; Stevenson y col., 2000). Sin embargo, Martínez y col. (2004) afirman que los celos inducidos por aplicación de PG y los espontáneos o naturales, tienen la misma fertilidad.

El porcentaje de concepción (PC), definido como animales preñados sobre inseminados, no fue diferente en los tres tratamientos, sin embargo, el porcentaje de preñez (PP) que combina el porcentaje de detección de celos y el porcentaje de concepción (PDC x PC) fue menor en el grupo DPG, lo que coincide con un menor porcentaje de detección de celos en este grupo. Esto implica que se preñaron más animales en un período menor de tiempo y está de acuerdo con Ferguson y Galligan (1993) que consideran que el mejor parámetro a utilizar en un programa de inseminación artificial es el porcentaje de preñez, que mide el total de preñeces logradas en 21 días (un ciclo estral).

En este trabajo se consideraron todos los animales preñados como respuesta a los protocolos (los IATF y los IACD) debido que consideramos que están involucradas dentro del total de cada protocolo. Martínez y col. (2004) eliminan del análisis de sus resultados las vaquillonas que muestran celos prematuros y resultan preñadas, lo cual resulta en porcentajes diferentes. La administración de PG el día 6 de cada uno de los protocolos IATF no afectó el PC ni el PP, en comparación con la administración de PG el día 7 según describen diferentes autores (Barros y col., 2000; Cavestany y col., 2002; Kasimanickam y col., 2005; Martínez y col., 2004; Pursley y col., 1995; Roy y Twagiramungu, 1999). A pesar de la diferente incidencia de celos prematuros en el OSYM y HSYM (22,7% y 60,3% respectivamente), el PC y el PP no fueron diferentes, a pesar de lo expresado por Busch y col. (2008), que afirman que los PP son más altos en aquellos animales inseminados que mostraron celo respecto a los otros que no lo hicieron y fueron inseminados con IATF. La presencia de ciclos estrales cortos en vaquillonas en los protocolos IATF reduce la preñez y la concepción (Schmitt y col., 1996), aunque esto no sucede en vacas adultas (Pursley y col. (1994a; Twagiramungu y col., 1995). El hecho que los intervalos cortos sólo ocurran en aquellas vaquillonas que recibieron la segunda dosis de GnRH en un protocolo Ovsynch (por lo tanto se inseminan a tiempo fijo), parece reafirmar lo expresado por Schmitt y col. (1996) que la primera parte de la sincronización de estos protoco-

los (desde la aplicación de la primera GnRH hasta la aplicación de PG), no causa directamente los ciclos interastrales cortos y esto apoya la opción del uso de BE en lugar de GnRH para inducir la liberación de LH y reducir la variabilidad en el tiempo de la liberación de esta hormona en concomitancia con la aparición del celo.

Cavestany y col. (2002) realizaron un trabajo en vaquillonas de razas para carne en el cual en uno de los grupos se utilizó Ovsynch con observación de celos desde el día 0 al día 25 y cuyos resultados de preñez (41,0%) difieren con los obtenidos en el OSYM de nuestro trabajo (69,0%); en otro grupo en el cual se utilizó el mismo protocolo pero sin detección de celos, los resultados de preñez (62,3%) fueron similares a los obtenidos en el OSYM. Nuestros resultados son similares a Twagiramungu y col. (1992 y 1995), pero debe notarse que en uno de los protocolos realizados por estos autores, se hizo detección de celos. En vaquillonas es mucho más efectivo utilizar este tipo de protocolos debido a la débil expresión de los celos y a su corta duración (Stevenson y col., 1996). Según Bó y col. (2000), un factor importante que puede influir negativamente en que el protocolo Ovsynch no sea del todo efectivo en vaquillonas es la menor duración de las ondas foliculares (con un recambio folicular más rápido y más ciclos de tres ondas), siendo menores que en las vacas en lactancia (con recambio folicular más lento y más ciclos de dos ondas).

La utilización de la detección de celos en los protocolos con IATF entre los días 5 PM y 7 PM, mejoró el porcentaje de preñez respecto a los resultados presentados para el Ovsynch y Heatsynch clásicos y aumentó en casi un 20% el PP respecto a lo obtenido con el uso del protocolo DPG.

A pesar que existió un «efecto año» en los resultados, éste fue similar para el PC y para el PP; esto fue posiblemente debido a que el régimen pluviométrico fue mayor en el año 1 que en el 2, lo que repercutió en una mayor oferta, disponibilidad y calidad de forraje en el primer año mientras en el segundo año se presentó una sequía importante en el momento de las inseminaciones. En sistemas pastoriles como el de Uruguay, el efecto de variables climáticas sobre la re-

producción es notorio y posiblemente difícil de evitar.

Se encontró también una variación importante entre predios a pesar que los tratamientos fueron realizados de manera exacta en cada uno de ellos y el inseminador fue el mismo en todos los casos. Los protocolos también se iniciaron en la misma estación del año en todos ellos, con escasos días de diferencia. Aunque se trató de que la distribución de animales entre ellos (y entre tratamientos dentro de ellos) fuera similar, el número de animales utilizados en el análisis estadístico (luego de

editados los datos y eliminados los animales con información incompleta) fue ligeramente diferente. El diseño experimental no fue planteado para evaluar el consumo de forraje ni la calidad del mismo en cada predio, a pesar que en todos los casos los animales se encontraban en campo natural. Lo que sí resulta importante destacar de este ensayo, es que resultados de protocolos similares no son extrapolables a diferentes predios o situaciones, sobre todo cuando se trabaja en predios comerciales donde es imposible controlar todas las variables involu-

cradas. Aunque son escasos los reportes de trabajos de sincronización en el país (no así la existencia de trabajos en sí), Cavestany y col. (2002) reportan resultados diferentes trabajando con vaquillonas en condiciones similares.

Se confirmó la hipótesis planteada que los protocolos de sincronización de celos y ovulaciones (IATF) permiten lograr un mayor porcentaje de preñez cuando se usan con detección de celos entre los días 5 PM y 7 PM a partir del comienzo de los mismos y son superiores a los obtenidos con DPG.

Referencias Bibliográficas

1. **Barros, C.M.; Moreira, M.B.P.; Figueredo, R.A.; Teixeira, A.B.; Trinca, L.A.** (2000). Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF2 α and Estradiol Benzoate. *Theriogenology*; 53:1121-1134.
2. **Bó, G.A.; Bergfelt, G.P.; Pierson, R.A.; Tribulo, H.E.; Caccia, M.; Mapletoft, R.J.** (2000). Local versus system effects of exogenous estradiol-17 α on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. *Anim. Reprod. Sci.*; 59:141-157.
3. **Busch, D.C.; Schafer, D.J.; Wilson, D.J.; Mallory, D.A.; Leitman, N.R.; Haden, J.K.; Ellersieck, M.R.; Smith, L.F.; Patterson D.J.** (2008). Timing of artificial insemination in postpartum beef cows following administration of the Co-Synch controlled internal drug-release protocol. *J. Anim. Sci.*; 86:1519-1525.
4. **Cavestany, D.; de Nava, G.; Galina, C.S.** (2000). Sincronización de celos con inseminación a tiempo fijo como alternativa para incrementar la eficiencia reproductiva en programas de inseminación artificial en vacas lecheras bajo condiciones de pastoreo. XXI World Buiatrics Congress. 10201 abs: p037.
5. **Cavestany, D.** (2002). Sincronización y/o inducción de celos con o sin inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos del Uruguay. Costos y variaciones en las respuestas. Primera parte: Fundamentos Teóricos. XXX Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay.
6. **Cavestany, D.; Negrin, N.; Negrin, R., Groth, J.F.** (2002). Response of beef heifers and non-suckling beef cows to different oestrus synchronization protocols. *Anim. Sci.*; 74:547-552.
7. **Cavestany, D.; Cibils, J.; Freire, A.; Sastre, A.; Stevenson, J.S.** (2003). Evaluation of two different oestrus-synchronization methods with timed artificial insemination and resynchronization of returns to oestrus in lactating Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.*; 77:141-155.
8. **Cavestany, D.; Bentancour, H., Blanc, J.E.; Lemaire, C.; Slavica, J.; Moreira, F.; Risco, C.** (2007). Reproductive efficiency in grazing lactating dairy cows under a programmed reproductive management system. *Aust. Vet. J.*; 85:141-147.
9. **Dahlen, C.R.; Lamb, G.C.; Zehnder, C.M.; Miller, L.R.; Di Constanzo, A.** (2002). Fixed-time insemination in prepuberal, lightweight replacement beef heifers after estrus synchronization with PGF2 α and GnRH. *Theriogenology*; 59:1827-1837.
10. **Dalton, J.C.; Manzo, R.; Ahmadzadeh, A., Shafii, B.; Price, W.J.; DeJarnette, J.M.** (2005). Short communication: Conception rates following detection of estrus and timed artificial insemination in dairy cows synchronized using GnRH and PGF2 α . *J. Dairy Sci.*; 88: 4313-4316.
11. **DeJarnette, J.M. ; Salverson, R.R., Marshall, C.E.** (2001). Incidence of premature estrus in lactating dairy cows and conception rates to standing estrus or fixed-time inseminations after synchronization using GnRH and PGF2 α . *Anim. Reprod. Sci.*; 67:27-35.
12. **de la Sota, R.L.; Crudeli, G.A.; Torres-Giménez, G.** (2000). Sincronización repetida de la ovulación e inseminación programada en vacas Brahman y Bradford comerciales. V Congreso Argentino de Reproducción Animal. CABIA, Buenos Aires, Argentina.
13. **Diskin, M.G.; Austin, E.J., Roche, J.F.** (2002). Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.*; 23:211-228.
14. **Ferguson SD, Galligan DT.** (1993). Reproductive programs in dairy herds. *Proc. Central Veterinary Conference*: pp161-178, Kansas City, MO.
15. **Geary, T.W.; Whittier, J.C.** (1997). Modifications of Ovsynch estrous synchronization protocol for use in beef cows. *J. Anim. Sci.*; 75:236 abstr.
16. **Geary, T.W.; Whittier, J.C.; Hallford, D.M.; MacNeil, M.D.** (2001). Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and CO-Synch protocols. *J. Anim. Sci.*; 79:1-4.
17. **Inskeep, E.K.** (1973). Potential uses of prostaglandins in control of reproductive cycles of domestic animals. *J. Anim. Sci.*; 36:1149-1157.
18. **Kasimanickam, R.; Cornwell, J.M.; Nebel, R.L.** (2005). Fertility following fixed-time AI or

- insemination at observed estrus in Ovsynch and Heatsynch programs in lactating dairy cows. *Theriogenology*; 63:2550-2559.
19. **Lauderdale, J.W., Seguin, B.E.; Sterflung, N.J.; Chenault, J.R.; Thatcher, W.W.; Vicent, K.J.; Loyancano, A.F.** (1974). Fertility of cattle following PGF 2α injection. *J. Anim. Sci.*; 38:964-967.
 20. **Lean, I.J., Porter, J.A., Rabiee, A.R.; Morgan, W.F.; Tranter, W.P.; Moss, N.; Rheinberg, R.J.** (2003). Comparison of effects of GnRH and prostaglandin on conception rates and time to conception in dairy cows. *Aust. Vet. J.*; 81:488-493.
 21. **Macmillan, K.L.; Thatcher, W.W.** (1991). Effect of an agonist of GnRH on ovarian follicles in cattle. *Biol. Reprod.*; 45:883-889.
 22. **Martinez, M.F.; Kastelic, J.P.; Mapletoft, R.J.** (2004). The use of Estradiol and/or GnRH in a two-dose PGF protocol for breeding management of beef heifers. *Theriogenology*; 62: 363-372.
 23. **Moreira, F.; de la Sota, R.L.; Díaz, T. Thatcher, W.W.** (2000). Effect of day of the estrus cycle at the initiation of timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *J. Anim. Sci.*; 78:1568-1576.
 24. **Pursley, J.R.; Kosorok, M.R.; Wiltbank, M.C.** (1994). Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J. Dairy Sci.*; 77: suppl.1.
 25. **Pursley, J.R.; Mee, M.O.; Wiltbank, M.C.** (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF 2α and GnRH. *Theriogenology*; 44: 915-923.
 26. **Pursley, J.R.; Wiltbank, M.C.; Stevenson, J.S.; Ottobre, J.S.; Garverick, H.A.; Anderson, L.L.** (1997). Pregnancy rates per AI for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J. Dairy Sci.*; 80:295-300.
 27. **Rivera, H.; Lopez, H.; Fricke, P.M.** (2004). Fertility of Holstein dairy heifers after synchronization of ovulation and timed artificial insemination or artificial after removed tail chalk. *J. Dairy Sci.*; 87:2051-2061.
 28. **Roy, G.L.; Twagiramungu, H.** (1999). Time interval between GnRH and prostaglandin injections influences the precision of estrus in synchronized cattle. *Proc. Ann. Conf. IETS. Theriogenology*; 51:413.
 29. **Savio, J.D.; Thatcher, W.W.; Morris, G.R.; Intwistle, K.; Drost, M.; Mattiacci, M.R.** (1993). Effect of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *J. Reprod. Fertil.*; 98:77-84.
 30. **Schmitt, E.J.P.; Díaz, T.; Drost, M.; Thatcher, W.W.** (1996). Use of gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *J. Anim. Sci.* 74:1084-1091.
 31. **Silcox, R.W.; Powell, K.L.; Pursley, J.L.; Wiltbank, M.C.** (1995). Use of GnRH to synchronize ovulation in Holstein cows and heifers with GnRH and prostaglandin. *Proc. Ann. Conf. IETS. Theriogenology*; 43: 325.
 32. **Stevenson, J.S.; Kobayashi, Y.; Shipka, M.P.; Rauchholz, K.C.** (1996). Altering conception of dairy cattle by Gonadotropin-Releasing Hormone preceding luteolysis induced by Prostaglandin α F 2 . *J. Dairy Sci.*; 79:402-410.
 33. **Stevenson, J.S., Kobayashi, Y.; Thompson, K.E.** (1999). Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding system including Ovsynch and combinations of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F 2α . *J. Dairy Sci.*; 82: 506-515.
 34. **Stevenson, J.S.; Thompson, K.E.; Forbes, W.L., Lamb, G.C.; Grieger, D.M.; Corah, L.R.** (2000). Synchronizing estrus and (or) ovulation in beef cows after combinations of GnRH, norgestomet and prostaglandin with or without timed inseminations. *J. Anim. Sci.*; 78:1747-1758.
 35. **Thatcher, W.W.; Driancourt, M.A.; Terqui, M.; Badinga, L.** (1991). Dynamics of ovarian follicular development in cattle following hysterectomy during early pregnancy. *Domest. Anim. Endocrinol.*; 8:223-234.
 36. **Thatcher, W.W.; Patterson, M.S.; Moreira, F.; Pancarci, M.; Jordan, E.R., Risco, C.A.** (2001). Current Concepts for Estrus Synchronization Timed Insemination. *AABP Proc. 34th Annual Convention.* pp 95 -105.
 37. **Thatcher, W.W.; Santos, J.E.P., Moreira, F.** (2000). Strategies to increase pregnancy rates in cattle. *Proc. 19th Ann. Conf. Amer. Embryo Transfer Association.* P.17-46.
 38. **Twagiramungu, H. ; Guilbault, L.A., Dufour, J.J.** (1995). Synchronization of ovarian follicular waves with a GnRH agonist to increase the precision of estrus in cattle. A review *J. Anim. Sci.*; 73:3141-3151.
 39. **Twagiramungu, H.; Guilbault, L.A.; Proulx, J.; Dufour, J.J.** (1992). Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of busarelin and prostaglandin. *Theriogenology*; 38:1131-1144.
 40. **Vasconcelos, J.L.M., Silcox, R.W., Rosa, G.J.; Pursley, J.R.; Wiltbank, M.C.** (1999). Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of estrus cycle. *Theriogenology*; 52:1067-1078.
 41. **Vizcarra, J.A.; Ibañez, W., Orcasberro R.** (1986). Repetibilidad y reproductibilidad de dos escalas para estimar la condición corporal de vacas Hereford. *Investigaciones Agronómicas*, 7:45-47.
 42. **Yamada, K.** (2005). Development of ovulation synchronization and Fixed Time Artificial Insemination in dairy cows. *J. Reprod. Dev.*; 51: 177-186.

Intoxicación por *Senecio* spp. (Asteraceae) en equinos en Uruguay

Rivero, R.¹; Matto, C.¹; Adrien, M.L.²; Alvarez, V.³

RESUMEN

Se describen dos focos de intoxicación por *Senecio* spp. en equinos ocurridos en el Departamento de Paysandú entre Noviembre 2009 y Enero 2010. En ambos focos los animales pastorearon durante el invierno, potreros con baja disponibilidad de forraje con abundante presencia de plantas de *Senecio* spp. Principalmente se afectaron equinos jóvenes. Los signos clínicos observados fueron: pérdida de peso, excitación o depresión, andar compulsivo o en círculos, presión de cabeza contra objetos, ataxia, tenesmo y muerte. En el primer foco la morbilidad registrada fue de 24% y la mortalidad de 20,6%. Mientras que en el segundo, la morbilidad fue de 20% y la mortalidad de 15,5% respectivamente. A la necropsia se destacó al corte un aumento de la consistencia del hígado, con oscurecimiento del parénquima y patrón de áreas rojizas combinadas con áreas más claras. También se observó edema de mesenterio, moderada ascitis y en algunos animales hidropericardio. Los hallazgos histopatológicos más destacados fueron en el hígado, megalocitosis de los hepatocitos, proliferación canalicular, fibroplasia y presencia de nódulos de regeneración, y en el sistema nervioso central, vacuolización de la sustancia blanca del encéfalo, presencia de astrocitos de Alzheimer tipo II y moderado edema perivascular y perineuronal.

Palabras clave: *Senecio*, Asteraceae, enfermedades de los equinos, patología

SUMMARY

Two outbreaks of *Senecio* spp. intoxication in horses, occurred in Paysandú County between November 2009 and January 2010 are described. In both situations animals grazed during last winter, paddocks with low forage availability and plenty of *Senecio* spp. plants. Mainly young animals were affected. Clinical signs were: loss of weight, excitability or depression, aimless walking, circling, head pressing, ataxia, tenesmus and death. In the first outbreak morbidity was 24% and mortality 20.6%, whereas in the second morbidity was 20% and mortality 15.5%. At necropsy liver was firmer, with darker parenchyma or enhancement of the lobular pattern. It was also found mesenteric edema, moderate ascites and in some animals hydropericardium. Main histopathological findings were in liver hepatomegalocytosis, biliary hyperplasia, fibrosis and presence of regeneration nodules; in central nervous system there were spongy degeneration of cerebral white matter, Alzheimer type II astrocytes, and mild perivascular and perineuronal edema.

Key words: *Senecio*, Asteraceae, diseases of horses, pathology

INTRODUCCIÓN

El género *Senecio* se encuentra dentro de la familia de las plantas compuestas (Compositae) y está integrado por más de 1200 especies distribuidas mundialmente (principalmente en zonas de clima templado y templado-cálido). En Uruguay se han identificado 25 especies diferentes de *Senecio*, siendo las principales *S. selloi*, *S. madagascariensis*, *S. brasiliensis* y *S. grisebachii* (Preliasco y Monroy, 2008). Este género provoca cuantiosas pérdidas en la producción pecuaria, debido a su toxicidad para bovinos, equinos, ovinos, caprinos, suinos, entre otras especies y también por su alta capacidad de invasión (Preliasco y Monroy, 2008). Uruguay registra una importante morbilidad y mortalidad de bovinos debido a plantas tóxicas, siendo *Senecio* spp. la

principal planta del Este del país y la segunda más importante en el Litoral-oeste (Rivero y col., 2009).

A nivel mundial se encuentran escasos reportes de intoxicación por *Senecio* spp. en equinos. En Canadá se registró un caso colectivo de intoxicación en animales a pastoreo por *Senecio jacobaea*, relacionado a un periodo de sequía previo en el área y presencia dominante de esta maleza (De Lanux-Van Gorder, 2000).

En América del Sur, también existen pocos registros de casos de intoxicación. En Brasil el primer caso fue reportado por Carvalho y Mauge (1946), citado por Riet-Correa y col. (1998) con *Senecio brasiliensis*. Los estados de Santa Catarina y Río Grande do Sul, han registrado focos de intoxicación por *Senecio brasiliensis* y *Senecio oxyphyllus* en equinos

en pastoreo o que recibían fardos de alfalfa contaminados, desconociéndose en uno de los focos la especie responsable (Gava y Barros, 1997; Karam y col, 2004; Lucena y col., 2010). En Chile, el Hospital Veterinario de la Universidad Austral ha reportado el diagnóstico de seneciosis en equinos por *Senecio erraticus* (Araya, 1990).

Pilati y Barros (2007), en Brasil realizaron la reproducción experimental de la intoxicación por *Senecio brasiliensis* en equinos, resultando tóxico y mortal tanto en dosis únicas a 8,75 g/kg y 15 g/kg, como en dosis repetidas que variaron entre el 1,74% al 9.66% del peso vivo.

En Uruguay la ocurrencia de casos de intoxicación por *Senecio* spp. en equinos es rara. Solo hay un foco registrado por el Laboratorio Regional Este de la

¹«DILAVE «Miguel C. Rubino», Laboratorio Regional Noroeste C.C. N°57037, Paysandú-Uruguay, CP 60.000. Correo electrónico: rrivero@mgap.gub.uy

²Facultad de Veterinaria, Dpto de Salud en los Sistemas Pecuarios. Estación Experimental «Dr. Mario A. Cassinoni», Paysandú. Ruta 3, Km 363.

³Ejercicio Liberal. Avenida España 1431, Paysandú, Uruguay.

Recibido: 30/9/10 Aprobado: 14/10/10

DILAVE «Miguel C. Rubino», en el Departamento de Treinta y Tres en el año 2007, donde de una población de 10 equinos enfermaron 5 y murieron 3 (Dutra, F., Comunicación Personal, 2010).

La toxicidad de las diferentes especies de *Senecio*, se debe a la presencia de alcaloides pirrolizidínicos, que producen una inhibición de la síntesis de ADN y la mitosis de los hepatocitos, provocando hepatomegalocitosis, diferentes grados de fibrosis hepática y proliferación de los ductos biliares (Stalker y Hayes, 2007).

Los equinos intoxicados por *Senecio* presentan comúnmente signos de encefalopatía hepática como: presión de cabeza contra objetos, andar compulsivo o en círculos, somnolencia, ataxia, ceguera, dismetría, convulsiones y coma terminal. También se observan otros signos como anorexia, disfagia, masticación continua, pérdida de peso, diarrea o constipación, ictericia y fotosensibilización (Gava y Barros, 1997; Riet-Correa y col., 2009; Stalker y Hayes, 2007). El cuadro clínico tiene una evolución variable, reportándose en casos experimentales duración de 1 a 30 días (Pilati y Barros, 2007) y en casos espontáneos de 3 a 60 días (Gava y Barros, 1997).

El objetivo del presente trabajo es describir dos focos recientes de intoxicación por *Senecio spp.* en equinos en el área litoral-oeste del Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los focos se observaron en dos establecimientos rurales del Departamento de Paysandú 3° y 4° seccional policial respectivamente. Los datos epidemiológicos, clínicos y patológicos fueron colectados durante las visitas realizadas a los predios afectados.

En ambos establecimientos se tomaron muestras de plantas de *Senecio spp.* para su tipificación, por parte del Grupo Disciplinario de Pasturas (Departamento de Producción Animal y Pasturas), Estación Experimental «Mario A. Cassinoni» (EEMAC) de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República.

Las observaciones clínicas fueron complementadas con necropsias. En el primer foco se realizaron dos necropsias y en el segundo foco una. En ambos focos los animales necropsiados correspondían a categorías jóvenes, potrancos diente de

leche de aproximadamente 2 años. Las muestras obtenidas fueron procesadas por la sección histopatología del Laboratorio Regional Noroeste de la DILAVE «Miguel C. Rubino», donde fueron fijadas en formol bufferado al 10%, embebidas en parafina, cortadas en secciones de 5 micras de espesor y coloreadas con hematoxilina y eosina (HE).

RESULTADOS

Tipificación botánica

Las plantas obtenidas en ambos focos fueron identificadas como *Senecio grisebachii* (Ing. Agr. Ramiro Zanoniani, Dpto. de Producción Animal y Pasturas, EEMAC, Facultad de Agronomía, UdelaR).

Datos epidemiológicos, signos clínicos y hallazgos anatómopatológicos

Primer foco

En el mes de noviembre de 2009 se concurre a un establecimiento localizado en la 3ª seccional policial de Paysandú, por el motivo de la muerte de equinos en los últimos 20 días y desmejoramiento progresivo en otros animales del lote. El mismo estaba compuesto de 29 equinos de la raza Criolla, de varias categorías, que pastoreaban un potrero de campo natural con buena disponibilidad de forraje. Durante el invierno de 2009, este lote había permanecido en otro establecimiento ubicado en la 6ª seccional policial de Paysandú, donde los animales pastorearon potreros con escasa disponibilidad de alimento y abundante presencia de plantas de *Senecio grisebachii* con evidencia de haber sido consumidas. El día de la visita había tres animales afectados, de los cuales uno sobrevivió y dos murieron. Estos eran animales jóvenes de aproximadamente 2 años de edad, siendo afectados ambos sexos. Los signos clínicos observados fueron adelgazamiento, excitación o depresión, andar compulsivo, incoordinación, ataxia, presión de la cabeza contra objetos, masticación continua y

muerte (Figura 1). En el lote enfermaron 7 animales (morbilidad: 24%) y murieron 6 (mortalidad: 20,6%), correspondiendo la mayoría a categorías jóvenes, menores de 3 años de edad.

A la necropsia de dos animales los mismos presentaban hígado con coloración más oscura de lo normal, aumento de consistencia y acentuación del patrón lobular. En el abdomen había moderada ascitis y en el mesenterio edema. A nivel de encefalo se observó congestión meníngea.

El examen histopatológico reveló hígado con moderada proliferación fibroblástica a predominio periportal, proliferación de los ductos biliares, hepatomegalocitosis (aumento de tamaño del núcleo y citoplasma) con moderada vacuolización de los hepatocitos, hemorragias y necrosis individual (Figura 2). El intestino delgado tenía severo edema en la capa submucosa y enteritis catarral con infiltración por eosinófilos. En el sistema nervioso central las meninges se encontraban congestivas. En la sustancia gris se observó edema perivascular y perineuronal, vacuolización de la sustancia blanca cortical (estatus esponjoso) con congestión.

Segundo foco

En el mes de enero de 2010, en un predio ubicado en la 4ª seccional policial de Paysandú, se concurre por un cuadro de mortalidad en equinos con sintomatolo-



Figura 1. Equino hembra, 2 años de edad. Adelgazamiento, depresión, incoordinación.

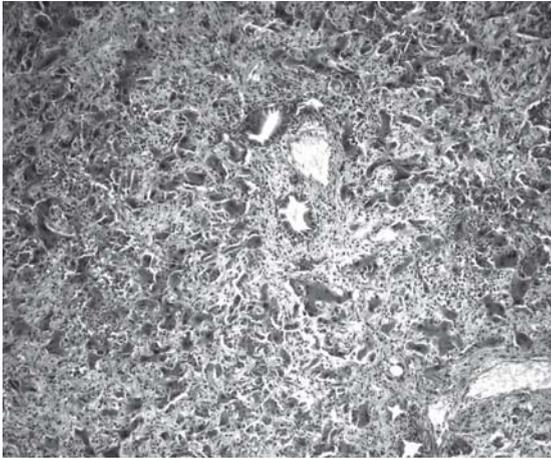


Figura 2. Hígado. Equino afectado en el primer foco. Fibroplasia, megalocitosis, proliferación de los canaliculos biliares, necrosis individual. H.E. 250X.

gía nerviosa. El lote de 45 animales permaneció durante el invierno del año 2009 en un potrero de campo natural de 30 ha con presencia de plantas de *Senecio grisebachii* y escaso forraje, donde el productor constató el consumo de la misma por los equinos. Los primeros signos clínicos en los animales afectados se observaron a partir de Noviembre de 2009. Presentaban pérdida de peso, ictericia, depresión, alejamiento del lote, andar en círculos e incoordinación y tenesmo. Fueron afectadas dos yeguas de 6 años, seis potrancas y una yegua de 15 años. La morbilidad fue de 20% y la mortalidad de 15,5%. En las necropsias practicadas se observó ictericia en subcutáneo, ascitis e hidropericardio. Hígado con parénquima con áreas rojizas y claras con aumento de consis-

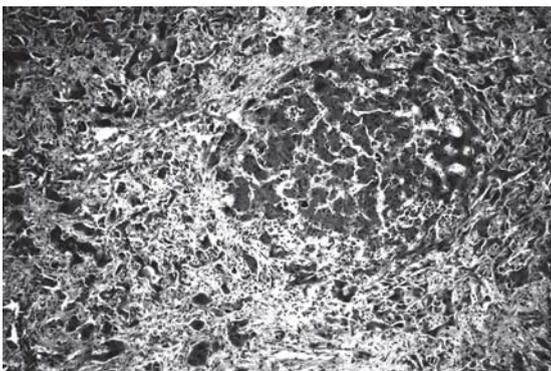


Figura 3. Hígado. Equino afectado en el segundo foco. Megalocitosis, fibroplasia, presencia de nódulo de regeneración. H.E. 250X.

tencia y presencia de nódulos blanquecinos de 2 a 3 mm de diámetro. El estómago presentaba numerosas úlceras en su mucosa; el mesenterio con moderado edema y escasa presencia de grasa. En la histopatología se destacaba en hígado proliferación del epitelio canalicular biliar principalmente a nivel de tríadas portales, fibroplasia difusa, megalocitosis y presencia de varios nódulos de regeneración (Figura 3). A nivel de sistema nervioso central, en la sustancia gris cortical moderada degeneración neuronal, observándose moderado edema perivascular y vacuolización (estatus esponjoso) en la sustancia blanca en corteza, ganglio basal, tálamo y cerebelo; presencia de astrocitos de Alzheimer tipo II.

DISCUSIÓN

En los dos focos descritos, los datos epidemiológicos, signos clínicos, lesiones macroscópicas y los hallazgos histopatológicos permiten realizar un diagnóstico de intoxicación por *Senecio spp.* en equinos, estando en concordancia con lo reportado por diferentes autores (Araya, 1990; De Lanux-Van Gorder, 2000; Gava y Barros, 1997; Pilati y Barros, 2007; Riet-Correa y col., 2007; Riet-Correa y col., 2009).

En Uruguay no existen trabajos que describan casos de intoxicación por *Senecio spp.* en equinos. En la región sur de Brasil, entretanto, la constatación de casos de intoxicación no es muy frecuente, en comparación al número de focos registrados en bovinos y en menor proporción, en ovinos (Karam y col., 2004; Lucena y col., 2010). Esto se relacionaría con una selectividad mayor de los equinos en sus hábitos alimenticios (Gava y Barros, 1997). También a un mayor cuidado de estos animales con respecto a otras especies, debido a que los equinos son utilizados para el trabajo o transporte y generalmente son destinados a potreros con buena disponibilidad de forraje e incluso

suplementados en situaciones de penuria alimenticia.

En ambos focos se tipificó la presencia de *Senecio grisebachii* en los potreros, especie que se encuentra en mayor proporción en el litoral de Uruguay (Preliasco y Monroy, 2008). En nuestro País, esta planta fue administrada experimentalmente a bovinos, resultando tóxica a dosis de 15, 24 y 45 g/kg de peso vivo (Preliasco y Monroy, 2008). En relación a esta especie, estudios recientes realizados en el USDA-ARS Poisonous Plant Research Laboratory (Utah, Estados Unidos) a partir de muestras remitidas por el Laboratorio Regional Noroeste de plantas de la región litoral-oeste, indican que *S. grisebachii* tiene una concentración de alcaloides pirrolizidínicos totales de entre 2944 a 3761 µg/g, por lo que sería de alta toxicidad para los animales (Rivero, 2010; datos sin publicar).

La casuística del Laboratorio Regional Noroeste en el período 1998-2010, registró un pico epidémico de presentación de focos de intoxicación por *Senecio spp.* en bovinos durante el segundo semestre del año 2009. Esto se encuentra claramente relacionado al período de sequía sufrido en la región litoral de Uruguay en el período setiembre 2008 a febrero 2009 (INIA GRAS, 2008, 2009) lo que produjo escasez de forraje y el consumo de la planta por bovinos y equinos. Se observa una asociación temporal entre el pico epidémico de presentación de intoxicación por *Senecio spp.* en bovinos en el área de influencia del Laboratorio, y la ocurrencia de los focos en equinos. Similares condiciones climáticas y de disponibilidad forrajera, se registraron en el foco descrito en Canadá (De Lanux-Van Gorder, 2000).

El hecho de que, en ambos casos fueran afectados mayoritariamente animales jóvenes, podría estar en relación a varios factores como: desconocimiento de la planta (Giles, 1983; citado por Araya, 1990); o una menor masa corporal que un animal adulto, por lo que requerirían una cantidad menor para ser intoxicados. Sin embargo, algunos autores reportan una variación individual con respecto a la susceptibilidad a los alcaloides pirrolizidínicos (Craig y col., 1991; citado por De Lanux-Van Gorder, 2000) que fue constatada en reproducciones experimentales en equinos en Brasil (Pilati y Barros, 2007).

El cuadro clínico observado junto con los hallazgos histopatológicos a nivel de hígado, indican que los animales presentaron un cuadro de curso crónico con desarrollo de fibrosis hepática. Esto podría estar dado por el consumo de dosis altas de plantas respecto al peso vivo durante un largo período de tiempo (Pilati y Barros, 2007). Por otro lado, en el momento que se presentan los signos clínicos las lesiones hepáticas son irreversibles (Mendel y col., 1988, citado por Araya, 1990). La sintomatología observada a predominio nervioso estaría en relación a la hiperamoniemia presente, como consecuencia de la pérdida de funcionalidad hepática. Otro signo de falla hepática como fotosensibilización, descrito en equinos por otros autores, no fue observado en estos

casos de campo (Gava y Barros, 1997; Pilati y Barros, 2007). Los hígados de los equinos afectados presentaban al estudio histopatológico principalmente hepatomegalocitosis y fibrosis periportal moderada, a diferencia de lo que se observa en los bovinos donde la proliferación de tejido fibroso es difusa, infiltrando a lo largo de los sinusoides, separando los lóbulos y aislando los hepatocitos (Stalker y Hayes, 2007).

La ausencia de lesiones histopatológicas inflamatorias y/o degenerativas específicas en el sistema nervioso central, asociadas a la epidemiología y signos clínicos observados, permiten descartar otras enfermedades que causan sintomatología nerviosa en equinos como: encefalomielitosis vírica (tipo occidental, oriental y ve-

nezolana), rabia, Fiebre del Nilo occidental, mieloencefalopatía por herpesvirus (HVE-1), intoxicación por *Centaurea solstitialis*, tétanos, leucoencefalomalacia (*Fusarium moniliforme*), intoxicación por plomo y botulismo (Radostits y col., 2002).

Si bien la intoxicación por *Senecio* spp. en equinos es de reciente descripción en Uruguay, es una enfermedad a tener en cuenta, ya que la planta se encuentra distribuida en todo el territorio, puede provocar pérdidas económicas por muerte de animales y sobre todo, es importante para el diagnóstico diferencial de enfermedades con sintomatología nerviosa que constituyen Zoonosis como Encefalomielitosis Equina Este, Oeste y Venezolana; Fiebre del Nilo y Rabia.

Referencias Bibliográficas

1. **Araya, O.** (1990). Seneciosis en caballos. Monografías de Medicina Veterinaria, Vol.12 (1), julio. Instituto Ciencias Clínicas Veterinarias. Facultad Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Versión electrónica.
2. **De Lanux-Van Gorder, V.** (2000). Tansy ragwort poisoning in a horse in southern Ontario. *Can Vet J* 2000; 41:409-410.
3. **Gava, A.; Barros, C.S.L.** (1997). *Senecio* spp. poisoning of horses in Southern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 17(1):36-40.
4. **INIA GRAS** (2009). Boletín Agroclimático. Año IV, N 2 Febrero 2009. Pp: 1-4.
5. **INIA GRAS** (2008). Estado de algunas variables agro-climáticas en septiembre de 2008 y perspectivas climáticas para el trimestre octubre, noviembre y diciembre de 2008. pp: 1-8.
6. **Karam F.S.C.; Soares M.P.; Haraguchi M.; Riet-Correa F.; Méndez M.C.; Jarenkow J.A.** (2004). Aspectos epidemiológicos da seneciose na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 24(4): 191-198.
7. **Lucena R.B.; Rissi D.R.; Maia L.A.; Dantas A.F.M.; Flores M.A.; Nobre V.M.T.; Riet-Correa, F.; Barros, C.S.L.** (2010). Intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos em ruminantes e eqüinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 30(5):447-452.
8. **Pilati, C. y Barros, C.S.L.** (2007). Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em eqüinos. *Pesq. Vet. Bras.* 27(7):287-296.
9. **Preliasco, M. y Monroy, N.** (2008). Investigación sobre la toxicidad de *Senecio grisebachii* en bovinos del Uruguay. Tesis de Grado, Facultad de Veterinaria, Montevideo. 66p.
10. **Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Blood, D.C.; Hinchcliff, K.W.** (2002). *Medicina Veterinaria*. 9a. ed., Madrid, Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana. 2215 p., 2 v.
11. **Riet-Correa, F.; Medeiros, R.; Pfister, J.; Schild, A.L.; Dantas, A.** (2009). Poisoning by plants, mycotoxins and related substances in Brazilian livestock. Patos, Ed. Sociedade Vicente Pallotti. 246 p.
12. **Riet-Correa, F.; Schild, A.L.; Lemos, R.A.; Borges, J.R.** (2007). Plantas que causam fibrose hepática, In: Riet-Correa, F.; Schild, A.L.; Lemos, R.A.; Borges, J.R., *Doenças de ruminantes e eqüídeos*, 3a. ed., Santa María, Ed. Palotti, pp. 106-114, Vol 2.
13. **Riet-Correa, F.; Pereira Soares, M.; Mendez, MC.** (1998). Intoxicações em eqüinos no Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, V. 28, N 4. pp. 715-722.
14. **Rivero, R.; Matto, C.; Dutra, F.; Riet-Correa, F.** (2009). Toxic plants affecting cattle and sheep in Uruguay. 8th International Symposium on poisonous plants. João Pessoa, Brazil. pp 1.
15. **Stalker, M.J y Hayes, M.A.** (2007). Liver and biliary system, In: Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C.; Palmer, N.C., *Pathology of domestic animals*, 5a. ed., Philadelphia, Ed. Elsevier, pp. 297-388, 3 vol.