



Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay

Año LXVII Vol. 42 N° 167 Julio - Septiembre de 2007

Cerro Largo 1895 - Montevideo - Uruguay - Tel-Fax (598-2) 408 6174 - 409 9458 - E-mail: smvu@smvu.com.uy
Página Web: www.smvu.com.uy

Contenido

Editorial

Trabajos Científicos

Mejora en la sanidad de la cría en colonias de abejas (*Apis mellifera* L.) seleccionadas por comportamiento higiénico. **Artículo Original**

Invernizzi, C.; Rodríguez, J.P. 9

Criopreservación de semen canino. **Revisión**

Savignone, C.A.; Tittarelli, C.M.; Stornelli, M.C.; Gimenez, F.; de la Sota, R.L.; Stornelli, M.A. 15

Trabajos de Difusión

Primera comprobación de *Sarcocystis* spp. en *Didelphis albiventris* ("comadreja mora") en Uruguay **Primer Diagnóstico**

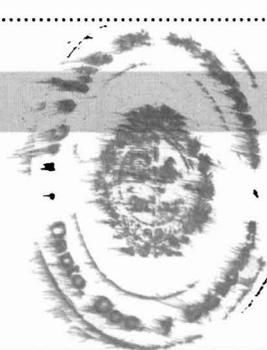
Noya, F.; Delucchi, L.; Castro Janer, E. 23

De Interés

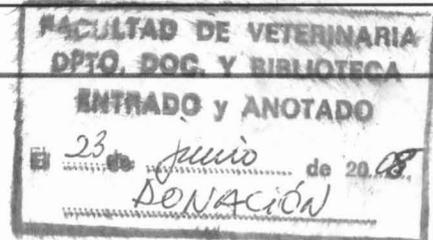
Suplementación proteica en ganado de carne

Soto Silva, C.; Reinoso Ortiz, V. 27

Instrucciones para los autores



Esta edición consta de 1500 ejemplares y se distribuye 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)

Integrante de World Veterinary Association (W.V.A.)
Integrante de PANVET (Asociación Panamericana de Veterinarios)
Integrante de AUDU (Agrupación Universitaria del Uruguay)
Cerro Largo 1895 Tel: 409 94 58 - 408 61 74
E-mail: smvu@smvu.com.uy - Web: www.smvu.com.uy
ISSN 0376 - 4362 - Indizada en: Vet-CD/BEASTCD

REDACTOR RESPONSABLE:

Dr. Carlos Morón

CONSEJO EDITOR "Profesor Walter García Vidal":

Dra. Alicia Baldovino
Dr. Uruguaysito Benavides
Dra. Rosario de los Santos
Dra. Jacqueline Maisonnave
Dr. Bernardo Otero
Dra. María Angélica Solari

Asesor Bibliotecológico:

Elba Domínguez

ARBITROS de los TRABAJOS CIENTÍFICOS (1997 - 2006)

Berthelot, X.	(DMV)	FRANCIA	Maisonnave, J.	(DMV)	URUGUAY
Camarotte, D.	(DMV)	URUGUAY	Martin, E.	(DMV)	URUGUAY
Cajarville, C.	(DMV)	URUGUAY	Meikle, A.	(DMV)	URUGUAY
Cardelino, R.	(Ing. Agr.)	URUGUAY	Merola, L.	(Dr.)	URUGUAY
Cardozo, E.	(DMV)	URUGUAY	Orcasberro, R.	(Ing. Agr.)	URUGUAY
Cardozo, H.	(DMV)	URUGUAY	Pérez Clariget, R.	(DMV)	URUGUAY
Castells, D.	(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
Eddi, C.	(DMV)	ARGENTINA	Theis, J.H.	(DVM)	USA
Feinstein, R.	(DMV)	SUECIA	Traldi, A.	(DMV)	BRASIL
Fernández, G.	(DMV)	URUGUAY	Trejo González, A.	(DC)	MÉXICO
Flores, E.	(DMV)	CHILE	Trica, G.	(DMV)	URUGUAY
Gil, A.	(DMV)	URUGUAY	Tortora, J.	(DMV)	MÉXICO
Lazaneo, E.	(DMV)	URUGUAY	Toscano, H.	(DMV)	URUGUAY
Leites, O.	(DMV)	URUGUAY	Uriarte, G.	(DMV)	URUGUAY
			Vargas, L.	(DMV)	BRASIL
			Weiblen, R.	(DMV)	BRASIL

CONSEJO DIRECTIVO (Período 2006 - 2008)

Presidente: Dr. Carlos Morón
Vicepresidente: Dr. Eugenio Perdomo
Secretario: Dr. Jorge Carluccio
Pro Secretario: Dr. Winston Rodríguez Soto
Tesorero: Dr. Carlos Esteves
Vocales: Dr. Ariel Sáez
Dr. Pablo Ocampo Carli

COMISIÓN FISCAL (Período 2006 - 2008)

Presidente: Dr. Pablo Zunino
Dr. Daniel Alza
Dr. Manuel Baruch

SECRETARÍA DE LA SMVU

Claudia Ros Arón
E-mail: secretaria@smvu.com.uy
(Horario: 9 a 15 horas)

CENTROS VETERINARIOS DE LA SMVU

ARTIGAS

Dr. Gonzalo França
Dr. Roberto Ordizola (Secretario)
Dr. Jesús Fraga (Tesorero)
Garzón 373 (Artigas)
drgfranca@adinet.com.uy
lebitecsa@hotmail.com

CANELONES

Dr. Hugo Romero
Batlle y Ordóñez 3382
centrovvet@adinet.com.uy

CERRO LARGO

Dr. Carlos Eduardo Vila
Dr. Herrera 475 (Melo)
cmvc.1@adinet.com.uy

COLONIA

Dra. Karen Bastié
Dr. Hugo Bentancour (Tesorero)
Calle José Artigas s/n (Miguelete)
kikabas@hotmail.com
betan@adinet.com.uy (tesorero)

CHUY

Dr. Peterson Sosa
Laguna de Rocha 521 (Chuy)
carlosar@adinet.com.uy

DURAZNO

Dr. Eduardo Zunino
Dr. Emilio Penza 1027-Durazno
casa Dr. Carlos Burgues (Tesorero)
zunied@adinet.com.uy

FLORES

Dra. Mónica Oholeguy
Carlos M° Ramírez 1012 (Trinidad)
mmog@adinet.com.uy

FLORIDA

Dr. Rodolfo Azaretto
Pedro Campbell 1026
azaretto@montevideo.com.uy

LA LÍNEA

Dr. Diego Rega
Bulevar Cardona s/n (Prolesa)
dicla@adinet.com.uy

LAVALLEJA

Dra. Susana Camaño
Ellaury 498 (Minas)
scagarcia@hotmail.com

MALDONADO

Dr. Gabriel Barrios
Dr. Adolfo Tasano (Tesorero)
Melchar Maurente 670 San Carlos
cevema@adinet.com.uy

PASO DE LOS TOROS

Dr. Carlos Casadei
Florencio Sánchez 1028
rucacasadei@hotmail.com

PAYSANDÚ

Dr. Lauro Antía
Uruguay 1189
cmvpdu@adinet.com.uy

RÍO BRANCO

Dr. Pedro Fleitas
Vet. El Ceibo Ruta 26 km 85.500
elceibovet@hotmail.com

RÍO NEGRO

Dr. Gustavo Fischer
Jose Martireneé 1967 (Young)
fischerl@montevideo.com.uy

RIVERA

Dr. Rafael Carriquiry
Nieto Clavera 671 (Rivera)
carri@montevideo.com.uy

ROCHA

Dr. Héctor Delgado
Zorrilla de San Martín 188 (Rocha)
agrorocha-srl@adinet.com.uy

ruta 7

Dr. Ruben Araujo
Av. Centenario s/n (Cerro Chato)
gateada113@adinet.com.uy

SALTO

Dr. Pedro Herrmann
Isabel Macchi (Secretaria)
Blanes 197/503 (Salto)
villalba@adinet.com.uy
vetdondo@adinet.com.uy

SAN JOSÉ

Dr. Juan Crescionini
Laboratorio Asoc. Rural s/n y Suiza
cvetsj@adinet.com.uy

SORIANO

Dra. Laura Vallejo
Ricardo Detomasi 678 (Mercedes)
lauravallejo678@hotmail.com

TACUAREMBÓ

Dr. José Galarraga
Miriam Rodríguez (Tesorera)
Catalina 159 (Tacuarembó)
elplatano@adinet.com.uy

TREINTA Y TRES

Dra. Alicia Cuadrado
Mónica Burgos (Tesorera)
Valentín Olivera 1821
alice.square@gmail.com
preira2@adinet.com.uy
mburgo33@adinet.com.uy

FILIALES ESPECIALISTAS, COMISIONES Y DELEGATURAS DE LA SMVU

AUVELA Asoc. Uruguaya de Veterinarios Laboratoristas
Presidente: Dra. Virginia Diana. E-mail: labarsj@adinet.com.uy

AUVE Asoc. Uruguaya de Vet. Equina
Presidente: Dr. Jorge Carluccio. E-mail: jcarluccio@netgat.com.uy
Secretaria: Carolina Trinidad auve@adinet.com.uy

SUVEPA Soc. Uruguaya de Vet. Especialistas en Pequeños Animales
Presidenta: Dra. Griselda De Gregorio. E-mail: gridegre@adinet.com.uy
Secretaria: Alicia Reqqua. E-mail: suvepa@adinet.com.uy

AMEVEA Asociación Med. Veterinarios especializados en Aves
Presidente: Dr. Daniel Umpiérrez. E-mail: mlorenzo@internet.com.uy

AVEPA: Asoc. de Veterinarios Esp. Protección Alimentos. E-mail: fortled@adinet.com.uy
Integrantes: Dr. José Luis Fort; Dr. Ignacio Pereira; Dr. Jorge Marra; Dr. Juan José Murguía;
Dra. Susana Mancebo; Dr. Hugo Martínez

AVEACA: E-mail: aveaca@ciudad.com.ar

SUVEAS: Dr. Eduardo Tavares. E-mail: etavares@adinet.com.uy

INTEGRACIÓN DE COMISIONES

SOCIEDAD URUGUAYA DE BUIATRÍA

E-mail: mangonzal@adinet.com.uy
Presidente Ad Honorem:
Ac. Dr. Recaredó Ugarte
Presidenta: Dra. Adriana Rodríguez

ASUNTOS UNIVERSITARIOS

Dr. Jorge Batthyany - batthyan@adinet.com.uy
Dr. Eugenio Perdomo - feapl@adinet.com.uy
Dr. Carlos Esteves - cesteves@adinet.com.uy
Dr. Eduardo Martín - marmen@adient.com.uy
Dra. Julia Saizar - aajulia@adinet.com.uy
Dra. Griselda de Gregorio - gridegre@adinet.com.uy
Dr. Winston Rodríguez - winstonrs@hotmail.com
Dr. Daniel Gilardoni - dgilardo@yahoo.com

TRIBUNAL ARBITRAL DE HONOR Y DISCIPLINA

Dr. Adolfo Bortagaray
Dr. Julio García Lagos
Dr. Juan José Mari
Dra. Cecilia Martín
Dra. Adriana Rodríguez

COMISIÓN DE REPRODUCCIÓN

Dr. Leandro Fernández landrof@adient.com.uy
Dr. Guillermo de Nava gtdens@adient.com.uy
Dr. Daniel Elhordoy delhordoy@mgap.gub.uy
Dr. Jorge Rivero campoxxi@montevideo.com.uy
Dr. Mauricio Rodríguez mrd@negocios.com.uy

COMISIÓN DE PODALES

Dr. Roberto Acuña (Coordinador)
Dr. Daniel Alza (Secretario)

COMISIÓN DE BIOTECNOLOGÍA

Dr. Carlos Azambuja
Dr. Eduardo Terranova
Dra. Lucia Kelly
Dra. Silvia Llambí
Dra. Analía Cobo Leturia

COMISIÓN DE RABIA DEL MSP

Dr. Fernando Echezarreta – fechaza@adinet.com.uy-

COMISIÓN COORDINADORA DEL ÁREA DE CIENCIAS AGRARIAS

Dr. Julio García Lagos
Dra. Analía Cobo Leturia
Dr. Sebastián Fernández

DELEGATURA DE CONHASA

Dr. Ramiro Díaz – hsm@netgate.com.uy –
Dr. Rodolfo Azaretto – azaretto@montevideo.com.uy –

DELEGATURA DE AUDU

Dra. Stella Quintana – walofa@adinet.com.uy –

DELEGATURA DE LA COMISIÓN NACIONAL HONORARIA DE LUCHA CONTRA ZONOSIS

Dr. Ariel Saez – arisaes@hotmail.com –
Dr. Jesús Falcón –
Dr. Francisco Capano – meta@adinet.com.uy

COMISIÓN DE LEUCOSIS

Dra. Helena Guarino – hguari@yahoo.com –
Dr. Romon Juambeltz – isap@montevideo.com.uy –
Dr. Carlos Morón – cmoron@hotmail.com –
Dr. Eugenio Perdomo – brsp@netgate.com.uy -
Dra. Isabel Pereyra – isap@montevideo.com.uy –
Dr. Ricardo Sienra – rsienra@mgap.gub.uy –

COMISIÓN DE BRUCELOSIS

Dr. Jorge Marra – jmarra108@yahoo.es –
Dr. Eugenio Perdomo – brsp@netgate.com.uy –
Dra. Celia Nin – nietonin@adinet.com.uy –
Dra. Virginia Diana – labarsj@adinet.com.uy –
Dr. Juan Crescionini – jcrescionini@hotmail.com –

COMISIÓN DE GARRAPATA

Dr. Jaime Sanchis – jaimesanchis@adinet.com.uy –
Dra. Deborah César – dcesar@adinet.com.uy –
Dr. Pedro Hermann – villalba@adinet.com.uy –

COMISIÓN EEB (BSE)

Dra. Deborah Cesar – dcesar@adinet.com.uy –
Dr. Ramiro Diaz – hsm@netgate.com.uy –
Dr. José Fort – fortled@adinet.com.uy
Dr. Eugenio Perdomo – feapl@adinet.com.uy
Dra. Helena Guarino – hguari@yahoo.com

COMISIÓN UNIDAD SALUD DE LA UBRE

Dra. Raquel Bianco – rbianco@conaprole.com.uy –
Dra. Elena de Torres – jomateo@yahoo.com –
Dr. Ruben E. Gianeechini – egianeechini@adinet.com.uy –

COMISIÓN PÁGINA WEB Y MULTIMEDIA

Dr. Humberto Tommasino
Dr. Oscar Caponi
Dr. Juan Dogliotti

COMISIÓN DE REVISTA CIENTÍFICA

revistavet@yahoo.com Tel: 408-6174 - 409-9458 Lunes de 17 a 19 hs.
Dra. Maria Angélica Solari –
Dra. Jacqueline Maisonave –
Dr. Uruguaysito Benavides -
Dr. Bernardo Otero -
Dra. Alicia Baldovino -
Dra. Rosario de los Santos -

COMISIÓN DE REVISTA SMVU

Dra. Raquel Bianco – rbianco@conaprole.com.uy –
Dr. Carlos Morón – cmoron@hotmail.com.-
Dr. Ignacio Pereyra – ipc@montevideo.com.uy –

COMISIÓN DE CAJA DE JUBILACIONES Y COLEGIACIÓN

Dr. Juan Mari – martabot@adinet.com.uy –
Dr. Baldovino – mcmvet@internet.com.uy –
Dr. Carlos Esteves – cesteves@adinet.com.uy –
Dr. Daniel Alza – dalza@prolesa.conaprole.com.uy –
Dra. Stella Quintana – walofa@adinet.com.uy –
Dr. Ariel Saez – arisaes@hotmail.com –

COMISIÓN DE REPRODUCCIÓN

Dr. Leandro Fernández – leandrof@adinet.com.uy –
Dr. Guillermo de Nava – gtdens@adinet.com.uy
Dr. Daniel Elhordoy – delhordoy@mgap.gub.uy –
Dr. Jorge Rivero – campoxxi@montevideo.com.uy –
Dr. Mauricio Rodríguez – mrd@negocios.com.uy –



100 AÑOS ¿QUÉ TENEMOS QUE FESTEJAR LOS VETERINARIOS?

Esa es la pregunta que se puede hacer una persona desprevenida que no sabe que es la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay.

¿Que Festejan con tanto alboroto ?

1.-La Existencia.

Festejamos la presencia de una Institución, de un Gremio que ha velado por los intereses de los Veterinarios en todos los ámbitos, sin claudicaciones, defendiendo los intereses de los colegas en relación de dependencia o sin ella . Así se ha demostrado en el correr de este año con las cartas a instituciones estatales o privadas que se olvidaron, cuando hicieron llamados, pidiendo universitarios que realizaran tareas que son propias de nuestra profesión, por formación y por convicción. Festejamos nuestros 100 años cuando no permitimos que se denosten los logros de nuestra profesión en el combate de las zoonosis.

2.-La Presencia.

La presencia de nuestros profesionales en todos los departamentos del país, representando a la profesión Veterinaria, en el ámbito del MGAP, en las Comisiones Departamentales de Salud Animal (CODESA), en la Comisión Nacional Honoraria de Salud Animal (CONAHSA), en la Comisión de Acreditación , en la Comisión de Leucosis, en la Comisión de Brucelosis, en la Comisión de Garrapata, Comisión del Censo Nacional de Veterinarios, en el ámbito del Ministerio de Salud Pública en la Comisión de Rabia, en la Comisión Nacional Honoraria de Lucha Contra las Zoonosis, en el Co-Gobierno Universitario, en el Claustro y en el Consejo de la Facultad y Central, en la Comisión asesora de la Caja de Jubilaciones y Pensiones Profesionales, en la Agrupación Universitaria del Uruguay.

3.-La Diversidad.

La presencia de la profesión Veterinaria en las filiales de especialistas con destacadísimas actividades :

SUB (Sociedad Uruguaya de Buiatría)

SUVEPA (Sociedad Uruguaya de Veterinarios Especialistas en Pequeños Animales)

AUVELA (Asociación Uruguaya de Veterinarios Especialistas en Laboratorios)

AUVE (Asociación Uruguaya de Veterinarios Especialistas en Equinos)

AMEVEA (Asociación Médicos Veterinarios Especialistas en Aves)

AVEPA (Asociación Veterinarios Especialistas en Protección de Alimentos)

Comisión de Reproducción

Comisión de Podales

Comisión de Biotecnología

Comisión de Brucelosis

USU -Unidad de Salud de Ubre

Comisión de Encefalopatía Espongiforme Bovina

Comisión de Zoosiquiatría y Comportamiento

4.-La Comunicación.

La SMVU tiene como obligación, por estatutos, la difusión del conocimiento técnico científico. Es así que organizó congresos Mundiales por designación de las instituciones madres, como ser el Congreso Mundial de Buiatría, el Congreso Mundial de Laboratorios Veterinarios, el Congreso Mundial de Podología. La SMVU y sus filiales de especialistas organizaron múltiples actividades y Congresos Nacionales de actualización técnica con presentación de trabajos científicos de colegas nacionales y extranjeros.

5.-La Información.

Las actividades de la SMVU son difundidas por dos revistas propias, enviadas por correo a cada uno de los socios, la Revista Científica Veterinaria (que se publica tres veces al año) y la Revista de Difusión Veterinarios que se publica cada dos meses.

La página WEB con información actualizada de todas las actividades, informaciones y pedidos de trabajo para nuestros profesionales.



Las Cartas Electrónicas o Newsletters con información destacada y urgente.

Los e- mail a los socios con detalles precisos e informaciones relevantes para el accionar profesional.

6.-En la Prensa Oral, Escrita y Televisiva.

La SMVU detectó la falta de presencia de nuestra Institución en los medios de difusión masiva, realizándose presentaciones durante el año 2007 en más de 100 reportajes a integrantes del Consejo Directivo.

7.-Con los Poderes Públicos.

Se mantienen contactos con los poderes públicos a los efectos de difundir cuales son nuestras preocupaciones y recomendar las posibles soluciones a las mismas, presentando nuestra opinión en la Comisión de Hacienda del senado de la República, en la Comisión de Ganadería de la Cámara de Representantes, con una carta al Sr. Presidente de la República, que fue delegada posteriormente a una entrevista con el Sr. Ministro de Educación y Cultura, en dos oportunidades con el Sr. Ministro de Ganadería Agricultura y Pesca, con el Ministerio de Salud Pública con la División Epidemiología, con la Dirección General de los Servicios Ganaderos.

8.-Los Homenajes.

Desde el año 2006, la SMVU, gracias a la invalorable colaboración de todos los integrantes de la Comisión de Festejos de los 100 Años, realizará los siguientes eventos:

- Homenaje de la Cámara de Diputados en Sesión Extraordinaria a los 100 Años de la Fundación de la SMVU, con presencia del Ministro de Turismo Dr. H. Lescano, de los Intendentes de Río Negro y Flores y de los Diputados Dres. Casas y Cardozo.
- Homenaje a los Veterinarios socios de la SMVU con mas de 40 años de afiliados en el Salón de Actos de Portones Shopping con presencia del Ministro de Ganadería Agricultura y Pesca.
- Mesa Redonda en la SMVU con presencia de dos Ministros por primera vez en la Historia, los Sres. Ministros de Turismo Dr. H. Lescano y de Ganadería Don José Mujica
- Gran Premio Nacional 100 años de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay en el Hipódromo de Maroñas.
- Festejo del Día del Veterinario, el 23 de Noviembre en la Sociedad Criolla Elias Regules.
- Acto Conmemorativo de los 100 Años de fundación de la SMVU en el Salón de los Pasos Perdidos del Palacio Legislativo con presencia de la Orquesta Sinfónica Juvenil, así como del Sr.Vice Presidente de la República Dr. Rodolfo Nin Novoa.
- Homenaje de la Academia Nacional de Veterinaria a la SMVU.
- Homenaje de la Facultad de Veterinaria a la SMVU.
- Homenaje de los estudiantes de la CGU a la SMVU.

Por todo esto los Veterinarios Uruguayos festejamos estos 100 Años

Mejora en la sanidad de la cría en colonias de abejas (*Apis mellifera* L.) seleccionadas por comportamiento higiénico

Invernizzi, C.¹; Rodríguez, J.P.¹

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas de la cría, especialmente la Loque Americana, causada por la bacteria *Paenibacillus larvae*, y el ácaro parásito *Varroa destructor*, provocan enormes pérdidas económicas en la producción apícola. El control de la sanidad de las colonias empleando antibióticos y acaricidas ya ha generado numerosos casos de resistencia en los diferentes patógenos. Con el objetivo de aumentar la resistencia de las abejas a las enfermedades de la cría y a la Varroasis se realizó una selección masal de colonias para mejorar el comportamiento higiénico de las abejas (desoperculado de las celdas y posterior remoción de las larvas enfermas o parasitadas). En seis generaciones se incrementó el comportamiento higiénico de las colonias de $77,7 \pm 20,9\%$ a $98,7 \pm 1,7\%$, y se redujo la proporción de colonias con enfermedades de la cría de 50% a 0. Las colonias enfermas presentaron un comportamiento higiénico significativamente menor que las colonias sanas. Respecto a la Varroasis, los resultados encontrados indicarían que el comportamiento higiénico no es un mecanismo de resistencia eficiente para controlar los ácaros. El mejoramiento genético de las abejas constituye una herramienta importante para reducir en el mediano plazo el impacto negativo de las enfermedades de la cría.

Palabras clave: Abejas melíferas, selección, enfermedades, resistencia, comportamiento higiénico

SUMMARY

Brood infectious diseases, specially American foulbrood, caused by the bacterium *Paenibacillus larvae*, and the parasitic mite *Varroa destructor*, are responsible for great economical losses in beekeeping industry. Control of sanity of colonies using antibiotics and acaricides, have given rise to numerous cases of pathogen resistance. With the aim of increasing bee resistance to brood diseases and varroa, we performed a mass selection of colonies, to improve bee hygienic behaviour (cells uncapping and ulterior removing of diseased or parasited larvae). After six generations, colony hygienic behaviour increased from $77.7 \pm 20.9\%$ to $98.7 \pm 1.7\%$, and proportion of colonies with brood diseases reduced from 50% to 0. Diseased colonies presented significantly less hygienic behaviour than the healthy ones. Regarding varroa infestation, our results indicate that hygienic behaviour is not an efficient resistance mechanism to control mites.

Honey bees genetic improvement is an important tool to reduce the negative impact of brood diseases in the short term.

Key words: Honey bees, selection, diseases, resistance, hygienic behavior.

INTRODUCCIÓN

Los problemas sanitarios de las abejas melíferas causan pérdidas económicas millonarias en la industria apícola en todo el mundo, principalmente en aquellos países con apiculturas desarrolladas como es el caso de Uruguay. Las enfermedades infecciosas de la cría son las más perjudiciales, destacándose la Loque Americana y la Loque Europea, causadas por las bacterias *Paenibacillus larvae* y *Melissococcus pluton*, respectivamente, la Ascospferiosis, debida al hongo *Ascosphaera apis* y la enfermedad vírica Cría Ensacada. Entre las plagas, el ácaro ectoparásito *Varroa destructor*, que se reproduce en las celdas con cría, causa daños letales en las colonias, tanto por su acción directa o como vector de

virus u otros microorganismos (2, 22, 29).

La estrategia generalizada seguida por los apicultores para controlar la sanidad de las colonias es el empleo, cada vez con mayor frecuencia, de diferentes antibióticos y acaricidas. Sin embargo, la utilización masiva de medicamentos trae aparejados dos riesgos importantes. Por un lado, aumenta la probabilidad de obtener variantes resistentes de patógenos, lo que demandaría un incremento de las dosis de medicamentos o su sustitución por formulaciones nuevas. En este sentido, se ha demostrado la resistencia de *P. larvae* a la oxitetraciclina (1, 19) y de *V. destructor* a fluvalinato, amitraz y cumafós (7, 8, 17, 35). Por otro lado, la presencia de residuos de medicamentos

en las mieles, fundamentalmente cuando se trata de sustancias prohibidas, dificulta la colocación de éstas en la mayoría de los mercados compradores.

Ante esta perspectiva, en muchos países se han desarrollado programas de mejoramiento genético de abejas con la finalidad de aumentar la resistencia a las enfermedades, de modo de reducir el empleo de tratamientos químicos, e incluso prescindir de ellos. Para ello, además de determinar la presencia de los síntomas de las enfermedades de la cría más comunes y el grado de infestación de *V. destructor*, se suele evaluar la expresión de algunos mecanismos de resistencia a patógenos y parásitos. El más estudiado es el "comportamiento higiénico" de las abejas, término que describe el proceso

¹Sección Etología, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, CP 11400, Montevideo, Uruguay. E-mail: ciro@fcien.edu.uy.

Recibido: 3/4/07 Aprobado: 8/10/07

por el cual las abejas desoperculan las celdas que contienen crías muertas y, posteriormente, remueven estas crías (27, 28). Se asume que las abejas que detectan rápidamente la muerte de larvas y pupas enfermas o parasitadas y las retiran de las celdas pueden eliminar del nido diferentes patógenos antes de que se propaguen, por ejemplo formando esporas como lo hace *P. larvae* y *A. apis*, o interrumpir la reproducción de *V. destructor*. Trabajos pioneros realizados hace varias décadas mostraron que las colonias higiénicas controlan en buena medida a la Loque Americana (20, 27, 28, 36, 37, 38). Estos resultados fueron confirmados posteriormente por Spivak y Reuter (33). Respecto a la Ascosporeosis, la mayoría de los resultados obtenidos han sido alentadores, encontrándose que las colonias higiénicas reducen o eliminan los síntomas de la enfermedad luego de contaminar la colonia con *A. apis* (9, 10, 12, 14, 15, 18, 31, 32). La posibilidad de controlar al ácaro *V. destructor* empleando colonias higiénicas es respaldada por las investigaciones de Boecking & Drescher (3) y Spivak (30). Estos investigadores encontraron que, luego de introducir artificialmente ácaros en las celdas con cría, las colonias higiénicas limpiaban las celdas interrumpiendo el ciclo de cría en mayor proporción que las poco higiénicas, impidiendo de este modo la reproducción del parásito. Marcangeli (16) estudiando la población de *V. destructor* en colonias naturalmente infestadas, también encontró que las colonias más higiénicas se hallaban menos infestadas. Sin embargo, la eficiencia del comportamiento higiénico de las abejas como mecanismo de resistencia a *V. destructor* está muy relativizada al identificarse otros mecanismos como la duración del período de operculado de las celdas, el *grooming* de las abejas, la supresión de la reproducción de los ácaros, la atractividad de la cría, el tamaño de las celdas y la edad de los panales con cría (5, 11, 21, 24, 25, 21). En el año 2001 se inició en Uruguay un programa de mejoramiento genético de abejas de pequeña escala con el objetivo de proveer a un grupo organizado de apicultores colonias que controlaran mejor las enfermedades de la cría, especialmente la Loque Americana. Esta enfermedad

venía causando enormes pérdidas de colonias desde su aparición en el país en el año 1998. Como objetivo secundario se buscó disminuir la presencia de *V. destructor* en las colonias. En este trabajo se presentan los resultados sanitarios obtenidos en seis años de selección.

MATERIALES Y MÉTODOS

El programa de mejoramiento genético se realizó con abejas europeas *Apis mellifera mellifera*, que son las que prevalecen en Uruguay, hibridadas en distinto grado con abejas africanas *A. mellifera scutellata* (4, 6).

El apiario de selección estaba ubicado en una zona de alta densidad de colmenas próximo a la ciudad de San José y no existían barreras físicas que limitaran el libre cruzamiento de las reinas con zánganos provenientes de otros apiarios. El trabajo comenzó en la primavera del año 2001 con 40 colonias sin selección previa. En los siguientes cinco años el apiario inició la invernada con 40-60 colonias. En cada año la evaluación de las colonias se realizó durante los meses de otoño, invierno y primavera, mientras que durante el verano se multiplicaron las reinas de las colonias seleccionadas para reemplazar a las de la generación anterior.

La detección de colonias con buena resistencia a las enfermedades de la cría se basó en la inspección sanitaria rutinaria de la cría y en la evaluación del comportamiento higiénico de las colonias. Para considerar que una colonia estaba enferma era suficiente con que presentara una sola larva con síntomas clínicos claros en al menos una inspección, sin tomar en cuenta que en las demás inspecciones la colonia no mostrase síntomas. El comportamiento higiénico de las colonias se evaluó en los meses de noviembre o diciembre, cuando normalmente la población de abejas adultas cubría toda la cámara de cría. Para ello se escogía un panal conteniendo cría recién operculada y se mataban aproximadamente 130 prepupas pinchándolas con un alfiler entomológico a través del opérculo. El panal se colocaba en el centro de la cámara de cría y 24 horas después se retiraba para contar el número de celdas desoperculadas por las abejas (13). La proporción de celdas experimentales desoperculadas

se expresó como Tasa de Desoperculado (TD%).

La infestación de *V. destructor*, medida como la proporción de ácaros foréticos en abejas adultas, se determinó en la primavera del año 2001 y en invierno y primavera de los años 2002, 2003 y 2004. En los años 2005 y 2006 las colonias fueron tratadas con acaricidas en otoño para evitar excesivas pérdidas invernales.

La evaluación de las colonias se complementó atendiendo parámetros poblacionales y productivos, así como la expresión de comportamientos indeseables como la agresividad y la tendencia a enjambrar.

Se aplicó un método de selección masal evaluando cada característica separadamente. Se eligieron como madres únicamente aquellas colonias que superaron los valores mínimos exigidos para cada característica (Independent Culling Selection) (26). Desde el punto de vista sanitario los criterios excluyentes fueron la presencia de alguna enfermedad, TD menores a 95% (90% solo en el año 2001) e infestaciones de varroas mayores al 10% en invierno y 3% al final de la primavera.

RESULTADOS

El número de colonias que llegaron a la primavera superando la invernada en las seis generaciones evaluadas, y que posteriormente no recambiaron su reina o enjambieron, fue de 28 (2001), 27 (2002), 29 (2003), 24 (2004), 42 (2005) y 47 (2006) y son las consideradas en la presentación de los resultados.

El comportamiento higiénico de las colonias presentó un aumento importante en la primera generación de colonias seleccionadas pasando de una TD de $77,7 \pm 20,9\%$ a $92,8 \pm 17,0\%$. En las siguientes cuatro generaciones este valor fue aumentando levemente y disminuyendo la variabilidad entre colonias. En la última generación evaluada prácticamente todas las colonias manifestaron un elevado comportamiento higiénico (TD = $98,7 \pm 1,7\%$) (figura 1).

La proporción de colonias con enfermedades en la cría disminuyó marcadamente entre la primera y la segunda generación evaluada (de 50 a 14,8 %), en las

tres siguientes se mantuvo por debajo del 10 % y en la última no se detectaron colonias enfermas en el apiario (figura 2).

Considerando la totalidad de colonias evaluadas en las seis generaciones se encontró que el comportamiento higiénico de las colonias que presentaron alguna enfermedad en la cría fue significativamente menor que el de las colonias sanas (test de Mann Whitney; $P < 0,001$) (figura 3).

Las diferentes enfermedades de la cría aparecieron con frecuencias diferentes en los seis años (Cuadro 1). Se destaca la Loque Europea que estuvo presente en los primeros cinco años, mientras que la Ascosteriosis solo apareció en los dos primeros y la Cría Ensacada en el cuarto y quinto año. En 8 colonias se encontraron síntomas claros de dos enfermedades simultáneamente: cinco con Loque Europea y Ascosteriosis y tres con Loque Europea y Cría Ensacada.

Respecto a la Varroasis es difícil analizar si la capacidad de limpieza de las colonias se relaciona con el grado de infestación porque, con la excepción del primer año, la enorme mayoría de las colonias presentaron poca variabilidad, con TD mayores a 90%. En estas colonias higiénicas la presencia de *V. destructor*, tanto en invierno como en primavera, presentó diferencias importantes. De todos modos, el nivel de infestación de las colonias de la primera generación en

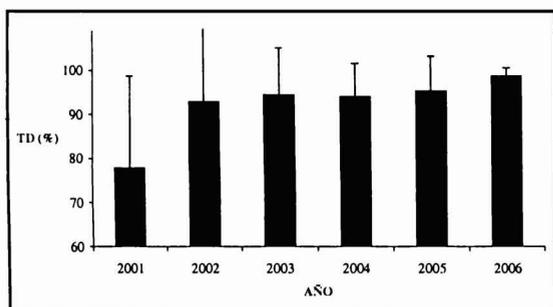


Figura 1. Comportamiento higiénico de las colonias del Apiario de Selección en las seis generaciones evaluadas.

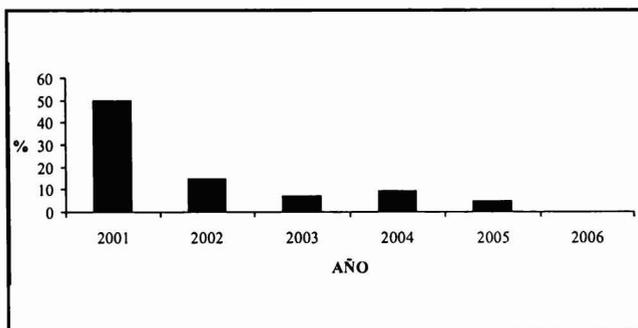


Figura 2. Proporción de colonias enfermas en el Apiario de Selección en las seis generaciones evaluadas.

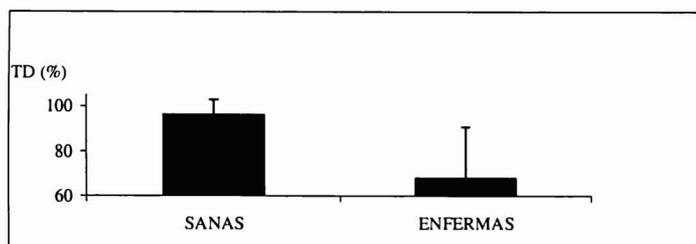


Figura 3. Comportamiento higiénico de colonias sanas y enfermas del Apiario de Selección.



Cuadro 1. Enfermedades de la cría presentes en las colonias del Apiario de Selección en las seis generaciones evaluadas.

Generación	ENFERMEDADES DE LA CRÍA				Total casos	Total colonias
	LA	LE	CE	CY		
2001	1	12	0	5	18	14
2002	0	3	0	2	5	4
2003	1	1	0	0	2	2
2004	0	2	3	0	5	3
2005	0	1	2	0	3	2
2006	0	0	0	0	0	0
Total	2	19	5	7	33	25

LA = Loque Americana; LE = Loque Europea; CE = Cría Ensacada; CY = Cría Yesificada

primavera (no se registró en invierno), donde las colonias expresaron una amplia gama de respuestas higiénicas, se presentó moderadamente asociado al comportamiento higiénico ($r = -0,31$; $n = 28$; $P < 0,05$).

DISCUSION

Los patógenos y parásitos que atacan a las abejas melíferas prácticamente no pueden ser erradicados de los países una vez que aparecen, determinando que actualmente éstos se encuentren ampliamente distribuidos en todas las regiones con actividad apícola desarrollada. Es así que la búsqueda de abejas con mayor grado de resistencia sanitaria es un objetivo prioritario en muchos países del mundo para paliar los perjuicios económicos causados por las enfermedades y parasitosis sin necesidad de recurrir al empleo excesivo de medicamentos.

Los resultados obtenidos en seis años de mejoramiento genético demuestran que se puede conseguir una reducción drástica de las enfermedades de la cría en poco tiempo aplicando solamente un programa de pequeña escala de selección masal en un sistema abierto. Las enfermedades de la cría que se presentaron en el apiario fueron la Loque Europea, Loque Americana, Cría Yesificada y Cría Ensacada, las que frecuentemente se encuentran en los apiarios de producción, siendo la Loque Europea la más persistente.

La mejora encontrada aparece muy asociada al incremento rápido del comportamiento higiénico de las colonias; este componente de resistencia resultó ser muy importante para controlar las cuatro enfermedades de la cría detectadas en el apiario. También en Argentina habían obtenido una mejora sustancial en la sanidad de la cría seleccionando abejas higiénicas. (23).

Sin embargo, respecto a la Varroasis los resultados no son tan claros. Aunque en la primavera del primer año de evaluación la infestación de las colonias aparece asociada al comportamiento higiénico, en los siguientes tres años que permanecieron sin curar las colonias presentaron cargas parasitarias muy diferentes pese a ser todas muy higiénicas. Spivak y Reuter (34) encontraron que las colonias higiénicas se defienden activamente de *V. destructor* si el nivel de infestación es bajo, pero si supera el 15% las colonias requieren tratamiento para evitar que colapsen. La expresión de otros mecanismos de resistencia podría explicar los diferentes grados de Varroasis registrados en las colonias del apiario de selección. En este sentido, se estudiaron diferentes mecanismos de resistencia a *V. destructor* hallando que un aspecto de la reproducción del ácaro (número de hembras adultas apareadas producidas por cada varroa madre) y la proporción de ácaros mutilados (consecuencia del comportamiento de *grooming*) eran los más

efectivos, explicando el 97% de la variación de varroas entre las colonias (21). Estos dos mecanismos de resistencia específicos deberían contemplarse si se busca mejorar la resistencia de las abejas a *V. destructor*.

El hecho de que se haya trabajado con las abejas híbridas locales, a partir de un apiario constituido por colonias sin selección previa (la mitad estaban enfermas), indica que las abejas en Uruguay cuentan con mecanismos de resistencia importantes, entre ellos el comportamiento higiénico, que pueden incrementarse por selección. De este modo, no sería necesario introducir otras razas o ecotipos de abejas para conseguir mejor tolerancia a las enfermedades, evitando así los riesgos de introducir al país nuevas enfermedades, susceptibilidades genéticas o comportamientos indeseables.

La multiplicación de esta experiencia de mejoramiento genético, fundamentalmente entre los criadores de reinas profesionales, puede constituir una forma sencilla y viable para la apicultura uruguaya de mitigar en el mediano plazo el impacto negativo de las enfermedades de la cría.

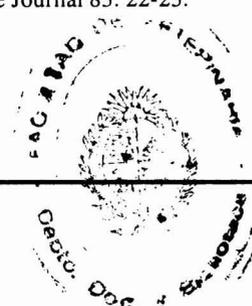
Agradecimientos

El proyecto fue parcialmente financiado por el Programa de Reconversión y Desarrollo de la Granja (PREDEG-MGAP).

Referencias bibliográficas

1. Alippi, A. M. (1996). Caracterización de aislamientos de *Paenibacillus larvae* mediante tipo biológico y resistencia a oxitetraciclina. *Revista Argentina de Microbiología* 28: 197-203.
2. Bailey, L.; Ball, B. V. (1991). *Honey bee pathology*. Academic Press, London, 193 pp.
3. Boecking, O.; Drescher, W. (1992). The removal response of *Apis mellifera* L. colonies to brood in wax and plastic cells after artificial and natural infestation with *Varroa jacobsoni* Oud. and to freeze killed brood. *Experimental and Applied Acarology* 16: 321-329.
4. Burgett, M.; Shorney, S.; Cordara, J.; Gardiol, G.; Sheppard, W. S. (1995). The present status of Africanized honey bees in Uruguay. *American Bee Journal* 135: 328-330.
5. Büchler, R. (1994). Varroa tolerance in honey bees – occurrence, characters and breeding. *Bee World* 75: 54-70.
6. Diniz, N. M.; Soares, A. E. G.; Sheppard, W. S.; Del Lama, M. A. (2003). Genetic structure of honeybee populations from southern Brazil and Uruguay. *Genetics and Molecular Research* 26: 47-52.
7. Elzen, P. J.; Baxter, J. R.; Spivak, M.; Wilson, W. T. (2000). Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using cumaphos. *Apidologie* 31: 437-441.
8. Faucon, J. P.; Drajnudel, P.; Fleche, C. (1995). Mise en évidence d'une diminution de l'efficacité de l'Apistan utilisé contre la Varroose de l'abeille (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 26: 291-296.
9. Gilliam, M.; Taber, S. III; Richardson, G. V. (1983). Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease. *Apidologie* 14: 29-39.
10. Gilliam, M.; Taber, S. III; Lorenz, B.; Prest, D. B. (1988). Factors affecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis*

- mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascosphaera apis*. Journal of Invertebrate Pathology 52: 314-325.
11. Harbo, J. R.; Harris, J. W. (1999). Heritability in honey bees (Hymenoptera: Apidae) of characteristics associated with resistance to *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). Journal of Economic Entomology 92: 261-265.
 12. Holm, S. N. (1986). Breeding honeybees for resistance to chalkbrood disease. Proceedings of the XXXth International Congress of Apiculture, Nagoya, Japón, pp. 100-102.
 13. Invernizzi, C. (2000). Importancia de las etapas de desoperculado y remoción dentro del comportamiento higiénico y su relación con la remoción de larvas vivas en las abejas *Apis mellifera*. Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay 12: 22-31.
 14. Invernizzi, C. (2001). Resistencia a la enfermedad de Cría Yesificada por colonias de *Apis mellifera* con eficiente comportamiento higiénico (Hymenoptera, Apidae). Iheringia, Série Zoologia 91: 109-114.
 15. Invernizzi, C. (2006). Resistencia comportamental y fisiológica de las abejas *Apis mellifera* a la Cría Yesificada. Tesis de Doctorado. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.
 16. Marcangeli, J. A. (1997). Relación entre el comportamiento higiénico de la abeja *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) y el tamaño poblacional del ácaro *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae). Natura Neotropicalis 28: 125-129.
 17. Milani, N. (1999). The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. Apidologie 30: 229-234.
 18. Milne, C. P. (1983) Honey bee (Hymenoptera: Apidae) hygienic behavior and resistance to chalkbrood. Annals of the Entomological Society of America 76: 384-387.
 19. Miyagi, T.; Peng, C. Y. S.; Chuang, R. Y.; Mussen, E. C.; Spivak, M. S.; Doi, R. H. (2000). Verification of oxytetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. Journal of Invertebrate Pathology 75: 95-96.
 20. Momot, J. P.; Rothenbuhler, W. C. (1971). Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. VI. Interactions of age and genotype of bees, and nectar flow. Journal of Apicultural Research 10: 11-21.
 21. Mondragón, L.; Spivak, M.; Vandame, R. (2005). A multifactorial study of the resistance of honeybees *Apis mellifera* to the mite *Varroa destructor* over one year in Mexico. Apidologie 36: 345-358.
 22. Morse, R. A.; Flottum, K. (1997). Honey bee pests, predators, & diseases. 3rd. ed. A. I. Root Company, Medina, Ohio, 718 pp.
 23. Palacio, M. A.; Figini, E. E.; Ruffinengo, S. R.; Rodríguez, E. M.; Del Hoyo, M. L. (2000). Changes in a population of *Apis mellifera* L. Selected for hygienic behaviour and its relation to brood disease tolerance. Apidologie 31: 471-478.
 24. Piccirillo, G. A.; De Jong, D. (2003). The influence of brood comb cell size in the reproductive behavior of the ectoparasite mite *Varroa destructor* in Africanized honey bee colonies. Genetics and Molecular Research 2: 36-42.
 25. Piccirillo, G. A.; De Jong, D. (2004). Old honey bee brood combs are more infested by the mite *Varroa destructor* than are new brood combs. Apidologie 35: 359-364.
 26. Rinderer, T. E. (1986) Selection. En: Rinderer, T. E. (ed). Bee Genetics and Breeding. Academic Press, Orlando, Florida, 426 pp.
 27. Rothenbuhler, W. C. (1964a). Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. I. Responses of four inbred lines to disease-killed brood. Animal Behaviour 12: 578-583.
 28. Rothenbuhler, W. C. (1964b). Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. IV. Responses of F1 and backcross generations to disease killed-brood. American Zoologist 4: 111-123.
 29. Shimanuki, H.; Knox, D. A.; Furgala, B.; Caron D. M.; Williams, J. L. (1992). Diseases and pest of honey bees. En: Graham, J. M. (ed). The hive and the honey bee. Dadant & Sons, Hamilton, Illinois, pp. 1083-1151.
 30. Spivak, M. (1996). Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. Apidologie 27: 245-260.
 31. Spivak, M.; Gilliam, M. (1993). Facultative expression of hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resistance. Journal of Apicultural Research 32: 147-157.
 32. Spivak, M.; Reuter, G. S. (1998). Performance of hygienic behavior in a commercial apiary. Apidologie 29: 291-232.
 33. Spivak, M.; Reuter, G. S. (2001). Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. Apidologie 32: 555-565.
 34. Spivak, M.; Reuter, G. S. (2001). *Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. Journal of Economic Entomology 94: 326-331.
 35. Spreafico, M.; Eördedgh, F. R.; Bernardinelli, I.; Colombo, M. (2001). First detection of strains of *Varroa destructor* resistant to coumaphos. Results of laboratory tests and field trials. Apidologie 32: 49-55.
 36. Thompson, V. C. (1964). Behavior genetics of nest cleaning in honey bees. III. Effect of age of bees of a resistant line on their response to disease killed brood. Journal of Apicultural Research 3: 25-30.
 37. Woodrow, A W; Holst, E. C. (1942). The mechanism of colony resistance to American foulbrood. Journal of Economic Entomology 35: 327-330.
 38. Woodrow, A. W.; States, H. J. Jr. (1943). Removal of disease brood in colonies infected with AFB. American Bee Journal 83: 22-23.



Criopreservación de semen canino. Aplicaciones y desarrollo

Savignone, C.A.^{1,2}; Tittarelli, C.M.²; Stornelli, M.C.²; Gimenez, F.²; de la Sota, R.L.²; Stornelli, M.A.²

RESUMEN

La criopreservación de semen y su posterior utilización mediante inseminación artificial en caninos es una biotecnología reproductiva que se encuentra en pleno desarrollo. Los procesos de criopreservación provocan alteraciones de las membranas y del metabolismo celular de los espermatozoides. El estudio de la acción de diferentes sustancias adicionadas a los diluyentes, su efecto sobre la criopreservación del eyaculado y el desarrollo de nuevos protocolos de congelación, con el fin de obtener mejores resultados en relación a la supervivencia espermática y fertilidad del semen al descongelado, posibilitará en el futuro la aplicación frecuente de esta biotecnología. En este trabajo se analiza y discute la acción de los diferentes componentes incluidos en los diluyentes utilizados para la criopreservación de semen canino.

Palabras clave: semen – canino - criopreservación

SUMMARY

Semen cryopreservation and their later use by artificial insemination in canine are a reproductive biotechnology in development. Cryopreservation process induces sperms membranes and cellular metabolism alterations. The study of action of different substances added to extenders, their effect on the cryopreservation processes and the development of new freezing protocols, with obtaining better results during the freeze-thaw process, it will facilitate in the future the frequent application of this biotechnology. The action of different extender components used for cryopreservation of canine semen is analyzed in this work.

Keywords: semen – canine - cryopreservation

INTRODUCCIÓN

El uso de distintas biotecnologías reproductivas en la especie canina se encuentra en pleno desarrollo y su uso es aún poco habitual. La preservación del semen, luego de su recolección, por medio de la adición al mismo de un diluyente adecuado y su inmersión en nitrógeno líquido (criopreservación), permite detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo en el tiempo potencialmente fértil (82) para su posterior utilización mediante técnicas de inseminación artificial (IA). El aumento de la importancia de la cría canina tanto desde el punto de vista económico, recreativo o para la obtención de perros de trabajo ha impulsado la implementación de bancos de semen criopreservado e IA con semen congelado.

La IA no es un método nuevo en caninos, ya en 1787 fue descrita por Lazaro Spalanzani quien usó semen fresco

(49). Sin embargo debieron pasar casi dos siglos hasta que, en 1956, Harrop obtuvo la primera preñez con semen refrigerado (30). Una década más tarde, en 1969, Seager comunica la primera IA con semen congelado (60).

En los países desarrollados la IA con semen congelado en caninos es aplicada cada vez más frecuentemente debido a las posibilidades que ofrece. A partir del año 1969, cuando se registra el primer nacimiento de una camada obtenida a partir de IA con semen congelado (60), ha aumentado el interés de los especialistas en reproducción y criadores de perros por esta biotecnología estimulando el estudio de este tema y facilitando su desarrollo (63). Como consecuencia de estos avances se han creado bancos de semen en universidades y entidades privadas en diferentes lugares del mundo (16, 45). Estos bancos de semen proveen un reservorio de material genético de suma importancia en la preservación

de caracteres fenotípicos de diversas razas, previniendo cualquier posibilidad de desaparición futura, tanto por motivos ecológicos, sanitarios o catástrofes naturales.

La IA con semen criopreservado permite trabajar con dos reproductores en localizaciones geográficas distantes sin necesidad de transportarlos, lo cual brinda grandes ventajas para los criadores. Así mismo, la congelación de semen en caninos hace posible la conservación del material genético del macho y el uso de reproductores mucho después de finalizado su período útil como semental, así como aumenta las posibilidades de preservación de cánidos silvestres en vías de extinción (18, 19, 21).

Si bien el proceso de congelación de semen canino requiere un moderado costo, equipamiento, infraestructura y entrenamiento del operador, permite la selección objetiva del material genético, posibilitando el mejoramiento de patrones

¹ Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP. Calle 60 y 118. B1900AVW La Plata. Buenos Aires. Argentina.

E-mail: csavign@fcv.unlp.edu.ar (Savignone, CA)

² Instituto de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP

Este trabajo está incluido en un plan de investigación subsidiado económicamente por UNLP; V11/134 a RLS

Recibido: 3/10/06 Aprobado: 20/1/07

fenotípicos caninos gracias a su utilización mediante IA en la práctica reproductiva diaria.

A pesar del desarrollo creciente de estas técnicas, las tasas de preñez obtenidas a partir de IA usando semen congelado en caninos son aún poco satisfactorias (20, 25, 37, 39).

Los resultados obtenidos utilizando diversas técnicas de IA (intravaginal, intrauterina transervical o intrauterina quirúrgica) (17, 43, 83, 84) son dispares, variando entre un 40% y un 70% (38, 46, 55, 61, 62, 64, 66). Estas variaciones pueden deberse a factores relacionados directamente con la calidad del semen utilizado, con el momento de la inseminación (momento de mayor fertilidad de la hembra), o con la técnica de IA empleada (30, 32, 37, 40). Debido a la corta sobrevida de los espermatozoides congelados en comparación con el semen fresco, el uso de IA intrauterina aumenta las posibilidades de preñez. La inseminación artificial intrauterina puede realizarse depositando el semen en el útero, a través de la cateterización del cervix o inoculándolo directamente en el cuerpo o cuernos uterinos en forma quirúrgica (40). Stornelli y col. (65, 66) evaluaron la fertilidad obtenida utilizando, mediante inseminación intrauterina con catéter noruego, semen canino congelado-descongelado con un diluyente TRIS base con y sin el agregado de 1,5% de Equex STM Paste. Los resultados mostraron que las perras inseminadas con un diluyente TRIS base con el agregado de 1,5% de Equex STM Paste, presentaron un porcentaje de preñez (71,4% vs. 42,8%) y un número de embriones gestados (2,14 vs. 1,14) numéricamente superiores a las perras inseminadas con el diluyente sin el agregado de Equex STM Paste.

Se ha demostrado que los procesos de criopreservación provocan alteraciones de las membranas y del metabolismo celular así como pérdida de la motilidad espermática, provocando disminución de la fertilidad al descongelado (29, 82). Este hecho se encuentra relacionado con la especial sensibilidad del semen canino a los procesos de criopreservación y a los pocos estudios realizados en esta especie si la comparamos con las especies de producción. Constantemente se

modifican los protocolos de congelación a fin de obtener mejores resultados en relación a la supervivencia espermática y fertilidad del semen al descongelado. Es así que son necesarias investigaciones dirigidas a mejorar la criopreservación de semen canino con el fin de obtener una alta sobrevida de espermatozoides al descongelado y una prolongada vida fértil del material depositado en el útero de la perra, obteniendo de esta manera tasas de preñez y tamaños de camada satisfactorios. Estos hechos se encuentran íntimamente relacionados con la conservación de la integridad estructural y fisiológica del espermatozoide al descongelado (32).

El continuo estudio de los factores que posibilitan una mejor criopreservación de semen relacionados con los procesos de congelado y descongelado, así como la aplicación de metodologías para la congelación de semen canino que permitan obtener porcentajes aceptables de espermatozoides viables al descongelado, posibilitarán en el futuro la aplicación frecuente de esta biotecnología, mejorar la práctica reproductiva diaria y aumentar las posibilidades de preservación de cánidos en peligro de extinción.

FACTORES QUE AFECTAN LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN

Para obtener una criopreservación satisfactoria, garantizando la conservación de la integridad estructural y fisiológica de los espermatozoides al descongelado y una mayor sobrevida de los mismos en el tracto genital femenino, se deben considerar una serie de factores, relacionados con la utilización de procedimientos apropiados de dilución, congelación y descongelación (31).

Los cambios ocurridos durante la congelación-descongelación en las membranas del espermatozoide son similares a los producidos durante los procesos de capacitación y reducen la longevidad espermática (45, 48). Las modificaciones térmicas que se producen durante los procesos de congelación-descongelación, provocan alteraciones físicas y químicas en las membranas de los espermatozoides (82). Los cambios más evidentes son

la pérdida de la motilidad espermática y la pérdida de la integridad acrosómica (51, 54, 77). Otros factores que modifican la integridad de las membranas de los espermatozoides son los relacionados con las características físico-químicas de los diluyentes utilizados, los cuales pueden provocar alteraciones ultraestructurales, bioquímicas y funcionales en la célula espermática (13, 14, 36). Entre los factores que pueden producir daño sobre los espermatozoides durante los procesos de criopreservación, se encuentran los cambios de volumen, asociados a cambios en la concentración de iones y electrolitos en las soluciones intra y extracelular, el estrés térmico, relacionado con los cambios de temperatura (shock de frío), los efectos tóxicos provocados por los diferentes crioprotectores y la formación de hielo en el medio extra e intra celular (23, 24, 78, 79, 81).

Estrés térmico: Shock de frío

El enfriamiento rápido del semen entre 30° C y 0° C induce un estrés letal en algunas células, proporcional a la tasa de enfriamiento, por lo que este proceso debe ser realizado cuidadosamente (80, 82). Un lento enfriamiento también induce estrés sobre la membrana del espermatozoide, relacionado con un cambio de fase lipídica y alteración del estado funcional de la membrana. El shock de frío es visto entonces como la consecuencia de un estrés continuo influenciado por la velocidad con que este fenómeno se inicia (33).

El hecho de que el shock de frío es causado por un cambio de fase de los lípidos de la membrana fue propuesto por Dobrins y col. en 1993 (12). Asimismo Holt y North (33) obtuvieron evidencias de que el cambio de fase podría ser el responsable de las manifestaciones de crioinjuria observadas durante el calentamiento celular luego de la descongelación.

El estrés de membrana puede continuar por debajo de 0° C sin que el cambio de fase sea completo, sin embargo es bien conocido que los cambios de fase ocurren, en su mayoría, entre los 5° C y 15° C (12). Usualmente se incluye yema de huevo en la preparación de los diluyentes. Savignone y col. (57) y Stornelli

ya col. (69, 70) lograron preservar semen canino a 4°C y 15°C, diluido en un medio comercial (MR-A®) con el agregado de yema de huevo, obteniendo buenos parámetros de contrastación seminal a los 2 y a los 3 días posteriores a la extracción (motilidad progresiva individual: 2d 77,2%, 3d 60,4%; Vigor: 2d 4,2, 3d 3,4; espermatozoides vivos: 2d 67,5%, 3d 52,8%; acrosomas intactos: 2d 71,3%, 3d 55,5%; HOS: 2d 69,6%, 3d 54,8%).

El agregado de preparaciones lipídicas purificadas a los espermatozoides reduce significativamente el shock de frío y el daño producido por la congelación-descongelación (6, 27, 47). La composición lipídica del medio donde se encuentra la membrana plasmática durante el enfriamiento, se relaciona con la prevención de los mecanismos de injuria celular (50, 80), debido a que los fosfolípidos (53) y las lipoproteínas de baja densidad (22) poseen un efecto protector contra el shock de frío, actuando sobre la superficie celular estabilizándola (78).

Crioprotectores y estrés celular

Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas y en consecuencia una menor concentración de electrolitos posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación. Sin embargo, estos compuestos, incorporados a los diluyentes producen un estrés transitorio pero importante sobre la membrana plasmática de los espermatozoides. La magnitud de este hecho está íntimamente relacionada con la capacidad penetrante de los crioprotectores (23). El crioprotector de elección es el glicerol, el cual produce estrés osmótico. Se ha observado que la hiperosmolaridad producida por este compuesto posee un efecto estimulador de la reacción acrosómica (4). Gao y col. (23) han demostrado que este estrés puede reducirse mediante la incorporación en etapas del glicerol durante el proceso de criopreservación. Este procedimiento permite aumentar considerablemente la proporción de espermatozoides sobrevivientes al descongelado. Otros compuestos con propiedades crioprotectoras serán analizados más adelante.

FORMACIÓN DE HIELO EN EL MEDIO EXTRA E INTRA CELULAR

El estrés inducido por la formación de cristales de hielo está asociado a los cambios en la presión osmótica de la fracción no congelada (81). Cuando una solución es enfriada por debajo del punto de congelación los cristales de hielo se nuclean y el agua pura cristaliza formando hielo. Los solutos permanecen disueltos en la fracción de agua líquida y por lo tanto la presión osmótica de la solución aumenta. La proporción de agua cristalizada como hielo y por lo tanto la presión osmótica de la solución restante depende de: la temperatura, la velocidad de descenso de la misma y el volumen de la fracción no congelada. En general se reconoce que la duración de la exposición a estos eventos debería minimizarse para lograr una óptima sobrevivencia, implicando entonces que el enfriamiento celular debería ser rápido. Sin embargo la tasa de enfriamiento debe ser suficientemente lenta como para permitir la salida de agua intracelular gracias a la presión osmótica extracelular, y prevenir la formación de cristales de hielo en el medio intracelular, lo cual es letal para la célula. Es importante considerar aquí que la población espermática, tanto en diferentes especies como en un individuo en particular es muy heterogénea. Un eyaculado posee una diversa población de células con diferentes estados de maduración. Las diferencias entre poblaciones espermáticas entre especies y en un eyaculado simple se relacionan con la composición y fluidez de la membrana celular, características que influyen su permeabilidad al agua y a solutos así como su susceptibilidad a la injuria por frío (28).

DILUYENTES UTILIZADOS PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN

Un diluyente que permita obtener altos porcentajes de espermatozoides vivos con motilidad progresiva e integridad acrosómica luego del proceso de congelación-descongelación, consiguiendo altas tasas de fertilidad *in vivo* precisa contener azúcares como fuente de ener-

gía, sustancias buffer que controlen los cambios de pH, antibióticos que eviten el crecimiento bacteriano y crioprotectores que reduzcan la posibilidad de daño de los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación (9).

En la última década, se han estudiado muchos diluyentes para la criopreservación de semen canino. Los más utilizados son los que contienen TRIS base, con el agregado de distintas sustancias como por ejemplo crioprotectores (glicerol, propanodiol, etilenglicol, dimetil formamida), macromoléculas protectoras de membranas (lipoproteínas de yema de huevo, proteínas de la leche, glicoproteínas), azúcares no permeables que crean un medio hipertónico (lactosa, sacarosa, trealosa, rafinosa), o azúcares energéticos permeables, capaces de atravesar la membrana plasmática (fructosa, glucosa).

Los crioprotectores utilizados como constituyentes de diferentes diluyentes para la criopreservación de semen pueden ser clasificados como permeables o intracelulares, constituidos por moléculas pequeñas que requieren una mayor concentración para proteger a las células de las crioinjurias, y no permeables o extracelulares (moléculas de mayor tamaño) que ejercen su acción en concentraciones menores (34, 42).

Los azúcares no permeables (trealosa, lactosa, sacarosa, rafinosa) brindan un medio hipertónico causando deshidratación celular antes de la congelación (1, 10, 11). Este efecto osmótico disminuye el agua intracelular congelable y en relación a esto la cuantía de daño celular relacionada con la formación intracelular de cristales de hielo (3). La trealosa posee además una acción protectora relacionada con su interacción específica con los fosfolípidos de membrana durante la desecación y congelación (5, 8, 10, 11) y puede ser capaz de prevenir la separación de fase y la fusión entre las bicapas durante la congelación. Este disacárido ha sido utilizado con éxito en el semen ovino (2, 44). Se han logrado buenos resultados con el agregado de 7,6% de trealosa al diluyente base, obteniéndose un 64% de motilidad progresiva al descongelado, superando al porcentaje obtenido utilizando el mismo diluyente base

sin el agregado del azúcar (54,3%) (2). El efecto de la adición de este azúcar a un diluyente TRIS base sobre el semen canino al descongelado ha sido poco estudiado (37, 85). Yildiz y col. (85) comunicaron que si bien la adición de trealosa a un diluyente TRIS base ejercía un efecto negativo sobre la motilidad, se observaba cierta acción protectora sobre la integridad acrosómica. Stornelli (65) evaluó el efecto crioprotector de la trealosa sobre el semen canino pero no ha encontrado efectos benéficos al incluir trealosa al diluyente para criopreservar semen canino, obteniendo índices de congelabilidad inferiores con el agregado de trealosa en comparación con el diluyente TRIS base sin el agregado de este azúcar (motilidad progresiva individual: 62,3% vs 73,3%, $P < 0.01$; espermatozoides vivos: 74,3% vs 76,9%, $P < 0.05$; acrosomas intactos: 71,1% vs 72,8%, $P < 0.05$; HOS: 72,9% vs 78,0, $P < 0.01$). Sin embargo, con el agregado de 2,5% de trealosa se obtuvieron mayores índices de motilidad progresiva individual (65,0% vs 61,4%), vigor (3,9 vs 3,7) y HOS (74,0% vs 72,5%) en relación a los obtenidos al adicionar mayores concentraciones de trealosa (5%, 7% y 9%) al diluyente TRIS base (72, 73), lo cual se correlacionaría con la concentración del azúcar en el diluyente y la hipertonía del medio. Esto podría explicarse por la sensibilidad del espermatozoide canino al estrés osmótico (15). La utilización de menores cantidades adicionadas al diluyente podría permitir que este azúcar estabilizara las membranas espermáticas evitando el estrés osmótico causado por concentraciones mayores (72). Savignone y col. (58, 59) estudiaron el efecto del agregado de trealosa en concentraciones que no modifican la osmolaridad del TRIS base sobre la viabilidad espermática al descongelado ($< 16,5$ mOsm). El semen diluido en TRIS base con la adición de trealosa presentó índices postdescongelación para motilidad (45,35 vs 31,7%, $P < 0.001$) e integridad de membrana (48,8% vs. 42,3%, $P < 0.05$) significativamente superiores al semen diluido con TRIS base sin el agregado del azúcar. Este hecho podría relacionarse con el efecto estabilizador de la membrana producido por este azúcar.

Las sustancias permeables (glicerol, propilenglicol, etilenglicol) tienen como función la remoción de gran parte del agua intracelular antes del proceso de congelación, evitando la formación de cristales de hielo y previniendo de esta manera la ruptura celular. El glicerol es el crioprotector más utilizado para preservar semen (63). Es una sustancia permeable que reduce los daños celulares durante el proceso de criopreservación, aunque es tóxico para los espermatozoides y altas concentraciones de este crioprotector pueden alterar la viabilidad espermática interfiriendo con la capacidad fecundante del semen criopreservado (7, 9, 41). El etilenglicol ha sido usado eficazmente en la criopreservación de embriones bovinos por su mayor permeabilidad (41, 76). Sin embargo, si lo comparamos con el glicerol, el etilenglicol posee mayores efectos tóxicos sobre la célula espermática. La toxicidad de estos compuestos puede ser considerada como uno de los factores responsables de los fracasos ocurridos en ciertas ocasiones con el uso de esta biotecnología (26). Recientes estudios muestran que la adición al diluyente de amidas (dimetil formamida) en diferentes concentraciones en reemplazo de parte del glicerol dan como resultado mejores parámetros de contrastación seminal *in vitro*, al presentar este compuesto menores efectos tóxicos sobre la célula espermática. Este efecto benéfico ha sido comprobado en equinos y aves (26). Savignone y col. (56) evaluaron la eficacia de la dimetilformamida utilizada en reemplazo de parte del glicerol como componente del diluyente TRIS base para la criopreservación de semen canino. Al analizar los resultados obtenidos utilizando dimetilformamida, se observaron efectos negativos sobre motilidad (30.1 ± 1.7 vs 40.4 ± 2.0 , $P < 0.001$), integridad de membrana (40.2 ± 1.0 vs 45.5 ± 3.2 , $P < 0.01$), e integridad acrosómica (34.3 ± 1.3 vs 42.2 ± 3.2 , $P < 0.001$) en relación al diluyente TRIS base sin esta amida. Al analizar la osmolaridad de los medios utilizados se observó que el diluyente TRIS base con el agregado de dimetilformamida presentó mayor osmolaridad que el diluyente TRIS base sin el agregado de amidas (1088 mOsm vs 906 mOsm). Estos resultados

reflejan la marcada sensibilidad del semen canino a la alta osmolaridad (15).

Los detergentes son capaces de solubilizar y alterar las membranas celulares y sus componentes. Los del grupo alquiliónico, al cual pertenece el dodecil sulfato de sodio (SDS), desnaturalizan la estructura nativa de las proteínas de membrana y las disocian en sus cadenas polipeptídicas. El SDS es un detergente aniónico soluble en agua que se utiliza para solubilizar proteínas. Sin embargo se ha observado que este detergente, si se agrega al diluyente en pequeñas cantidades, posee un efecto benéfico sobre la motilidad espermática y la integridad acrosómica en los procesos de congelación-descongelación (52), gracias a su acción sobre la fracción lipoproteica de baja densidad de la yema de huevo la cual, como ya mencionamos, ejerce su acción protectora sobre la superficie celular (78). Si se agregan cantidades mayores el detergente que no es utilizado sobre la yema de huevo altera las membranas espermáticas afectando la viabilidad de las células (52).

Se ha utilizado la incorporación de SDS en diluyentes para criopreservación de semen canino (49), observándose un efecto benéfico sobre la supervivencia al descongelado y la integridad acrosómica. Stornelli (65) incorporó Equex STM Paste (compuesto que contiene SDS) a un diluyente TRIS base para la criopreservación de semen canino, obteniendo buenos resultados con la adición de 1,5% de detergente en comparación con la incorporación de concentraciones menores (0,5%, 1%), (motilidad progresiva individual: 77,6% vs 68,5%, $P < 0.01$; espermatozoides vivos: 80,2% vs 76,8%, $P < 0.05$; acrosomas intactos: 77,4% vs 73,6%, $P < 0.05$; HOS: 84,1% vs. 78,5, $P < 0.05$). El agregado de Equex STM Paste en mayores cantidades (2%, 2,5%) no mejoró ni afectó en forma negativa los índices de congelabilidad (71), sin embargo se observó mayor cantidad de alteraciones ultraestructurales en el semen congelado con estas concentraciones. Jurado y col. (35) y Stornelli y col. (67, 68, 74, 75) observaron, mediante microscopía electrónica de transmisión, un porcentaje significativamente mayor de espermatozoides con alteraciones ultraes-

estructurales en el semen diluido con TRIS base solo en comparación con el semen diluido con TRIS base con el agregado de Equex STM Paste (69,5% vs 53,0%, $P < 0,01$). Entre las alteraciones encontradas en el estudio ultramicroscópico del semen descongelado se pueden mencionar hinchazón y formación de pliegues en la membrana plasmática, hinchazón de la membrana acrosomal, contenido acrosomal distribuido en forma no uniforme, formación de vesículas en la membrana acrosomal externa y plasmática. La microscopía electrónica de transmisión permitió observar la localización de los daños en los espermatozoides sometidos a procesos de criopreservación, y relacionarlos con la disminución que se observa en los parámetros de contracción seminal. Ejemplos de esta relación serían los menores índices de motilidad progresiva individual y porcentaje de acrosomas intactos observados en el semen diluido con TRIS base en comparación con el semen diluido con TRIS base con el agregado de Equex STM Paste, y la observación mediante microscopía electrónica de transmisión de alteraciones en las colas de los espermatozoides y mayores porcentajes de daño acrosomal respectivamente. En relación al porcentaje de Equex STM Paste adicionado al diluyente, las alteraciones ultraestructurales presentaron un porcentaje signifi-

cativamente mayor en el semen diluido con TRIS base y el agregado de 2,5% de Equex STM Paste en comparación con el semen diluido con TRIS base y 1,5 % de Equex STM Paste (79,2% vs 60,0%, $P < 0,02$). Por lo expuesto, si bien las observaciones obtenidas a partir de microscopía óptica indicarían que no existen diferencias con el agregado de distintas concentraciones de Equex STM Paste al diluyente, el estudio ultramicroscópico demuestra claramente que los daños aumentan al aumentar el porcentaje de detergente agregado. Esto podría relacionarse con la acción del detergente sobre los lípidos de la yema de huevo, acción que permite proteger al espermatozoide contra el shock de frío (52). Mayores concentraciones de SDS no mejorarán la protección ya que una vez que el detergente actuó sobre la totalidad de los lípidos de la yema presente en el diluyente el efecto protector no variará, pero si aumentarán los daños ultraestructurales. Es así que el efecto benéfico del detergente se observará hasta que la cantidad adicionada sea tal que comience a actuar sobre las membranas de la célula espermática (52).

CONCLUSIONES

La evaluación *in vitro* de la calidad del semen al descongelado, permite estimar

la eficacia de un diluyente para proteger a los espermatozoides de la agresiones a las que son sometidos durante los procesos de congelación. Sin embargo, sólo una prueba de fertilidad a campo permitirá evaluar si los cambios realizados en la constitución de un diluyente mejorarán la criopreservación del eyaculado, permitiendo conservar un alto porcentaje de espermatozoides con capacidad fecundante y lograr así altas tasas de preñez y buen tamaño de camada.

Durante los últimos 50 años los avances obtenidos en la criopreservación de semen han tenido un profundo impacto sobre la biotecnología reproductiva humana y animal. Sin embargo muchos tópicos sobre la criopreservación de semen permanecen oscuros. Futuras investigaciones sobre este tema permitirán obtener nuevos avances en el área. La adición de nuevas sustancias al diluyente podría proporcionar nuevas posibilidades de uso de semen congelado en la especie canina. La combinación de distintas sustancias, adicionadas al diluyente TRIS base, podrían demostrar que la acción protectora conjunta de estas sustancias, cada una de manera diferente y con diferente impacto sobre la célula, podría resultar benéfica para la protección de los espermatozoides caninos en el proceso de congelación-descongelación.

Referencias bibliográficas

1. Aisen, E.; Cisale, H.; Fernández, H. (1990). Criopreservación de semen ovino. Nueva técnica. Vet. Arg. 63:177-182.
2. Aisen, EG.; Alvarez, HL.; Venturino, A.; Garde, J. (2000). Effect of trehalose and edta on cryoprotective action of ram semen diluents. Theriogenology 53:1053-1061.
3. Aisen, EG.; Medina, VH.; Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility ram semen frozen in different trehalose concentration. Theriogenology 57:1801-1808.
4. Aitken, RJ.; Wang, YF.; Liu, J.; Best, F.; Richardson, DW. (1983). The influence of medium composition osmolarity and albumin on acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa development of an improved zona-free hamster egg penetration test. Int J Androl. 6:180-193.
5. Bakas, LS.; Disalvo, EA. (1991). Effect of Ca^{2+} on the cryoprotective action of trehalose. Cryobiology 28:347-353.
6. Butler, WJ.; Roberts, TK. (1975). Effects of some phosphatidyl compounds on board spermatozoa following cold shock or slow cooling. J Reprod Fertil. 43:183-187.
7. Cardoso, RCS.; Silva, AR; Uchoa, DC. (2003). Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. Theriogenology 59:743-751.
8. Chen, T.; Fowler, A.; Torner, M. (2000). Literature Review: Supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture. Cryobiology 40:277-282.
9. Concannon, PW.; Battista, M. (1989). Canine semen freezing and artificial insemination. In: Kirk RW editor. Current Veterinary Therapy X: Small Animal practice. Philadelphia PA: WB Saunders p. 1247-1259.

10. **Crowe, JH.; Carpenter, JF.; Crowe, LM.; Anchordoguy, TJ.** (1989). Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. Proceedings of the 26 th Ann. Mtg. Soc. Cryobiol. Symposium on cryosensitizing and cryoprotective agents. California, USA; p. 219-229.
11. **Crowe, JH.; Crowe, LM.; Oliver, AE.; Tsvetkova, N.; Wolkers, W.; Tablin, F.** (2001). The Trehalose Myth Revisited: Introduction to a Symposium on Stabilization of Cells in the Dry State. *Cryobiology* 43:89-105.
12. **Dobrins, EZ.; Crowe, LM.; Berger, T.; Anchordoguy, T.; Oversteet, JW.; Crowe, JH.** (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J. Exp Zool.* 265:432-437.
13. **Dobrinski, I.; Lulai, C.; Barth, AD.; Post, K.** (1993). Effects of four extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47:291-296.
14. **England, GCW.** (1993). Cryopreservation of dog semen: A review. *J. Reprod. Fertil.* 47:243-255.
15. **England, GCW., Plummer, JM.** (1993). Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 47:261-270.
16. **Farstad, W.; Andersen-Berg, K.** (1989). Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J. Reprod. Fertil.* 39:289-292.
17. **Farstad, W.; Fougner, JA.; Torre, CG.** (1992). The effect of sperm number on fertility in blue fox vixens (*Alopex lagopus*) artificially inseminated with frozen silver fox (*Vulpes vulpes*) semen. *Theriogenology* 37:699-711.
18. **Fastard, W.** (1984). Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *J. Small. Anim. Pract.* 25:561-565.
19. **Fontbonne, A.; Badinand, F.** (1993). Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of the results obtained with an intravaginal and an intrauterine deposition of semen. *J. Reprod. Fertil.* 47:323-327.
20. **Fontbonne, A.; Badinand, F.** (1996). Prelevement et examen de la semence chez le chien. In: Dumond, C.; Fontbonne, A. editores. Les indispensables de l'animal de compagnie. Paris: PMCAC p. 153-159.
21. **Fougner, JA.** (1989). Artificial insemination in fox breeding. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 39:317-323.
22. **Foulkes, JA.** (1977). The separation of lipoproteins from eggs yolk and their effect on motility and integrity of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 49:277-284.
23. **Gao, GY.; Ashworth, E.; Watson, PF.; Kleinhans, FW.; Mazur, P.; Critser, JK.** (1993). Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biol. Reprod.* 49:112-123.
24. **Gao, GY.; Liu, J.; Liu, C.; Mcgann, LE.; Watson, PF.; Kleinhans, FW. et al.** (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum. Reprod.* 10:1109-1122.
25. **Gill, HP.; Kaufman, CF.; Foote, RH.; Kirk, RW.** (1970). Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen. *Am. J. Vet. Res.* 31:1807-1813.
26. **Gomes, GM.; Jacob, JCF.; Medeiros, ASL.; Papa, FO.; Alvarenga, MA.** (2002). Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology* 58:277-279.
27. **Graham, JK.; Foote, RH.** (1987). Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull. *Cryobiol.* 24:42-52.
28. **Hammerstedt, RH.; Grahan, JK.; Nolan, JP.** (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 11:73-88.
29. **Hammerstedt, RH.; Parks, JE.** (1987). Changes in sperm surfaces associated with epididymal transit. *J. Reprod. Fert.* 34:133-149.
30. **Harrop, AE.** (1960). Mating natural service and artificial insemination. In: Bailliére, Tindall & Cox, editores. Reproduction in the dog. London, England. p. 87-99.
31. **Hay, MA.; King, WA.; Gartley, CJ.; Leibo, SP.; Goodrowe, KL.** (1997). Canine spermatozoa cryopreservation and evaluation of gamete interaction. *Theriogenology* 48:1329-1342.
32. **Held, JP.** (1997). Critical evaluation of the success and role of chilled and frozen semen in today's veterinary practice. Proceedings of the Canine Reproduction Symposium. Society for Theriogenology and American College of Theriogenologist; p. 49-59.
33. **Holt, WV.; North, RD.** (1991). Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 91:451-461.
34. **Jasko, DJ.** (1994). Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars. Vet.* 10 (2):156-165.
35. **Jurado, S.; Sarmiento, P.; Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Savignone, C.; Tittarelli, C.; de la Sota, RL.** (2005). Ultrastructural analysis of fresh and frozen-thawed dog spermatozoa. Proceedings of the 8th Inter American Congress of Electron Microscopy. Sep 25-30 La Habana- Cuba.
36. **Lardy, HA.; Philips, PH.** (1940). Preservation of spermatozoa. Proceedings of the 32nd. Ann. Meet. Am. Soc. Anim. Prod. p. 219-231.
37. **Linde-Forsberg, C.** (1991). Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 21:467-485.

38. **Linde-Forsberg, C.; Forsberg, M.** (1989). Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fertil.* 39:299-310.
39. **Linde-Forsberg, C.; Forsberg, M.** (1993). Results of 527 controlled artificial insemination in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 47:313-323.
40. **Linde-Forsberg, C.; Strom, B.; Govette, G.** (1999). Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology* 52:11-23.
41. **Martins-Bessa, A.; Rocha, A.; Mayenco-Aguirre, A.** (2006). Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. *Theriogenology* 66:2047-2055.
42. **Meryman, HT.** (1971). Crioprotective agents. *Cryobiology* 8:173-183.
43. **Meyers-Xallen, VN.** (1995). Semen Analysis, Artificial insemination and infertility in the male dog. In: Ettinger, SJ.; Feldman, ER. editores. *Textbook of Veterinary Internal Medicine.* Saunders Philadelphia. p. 1664-1672.
44. **Molinia, FC.; Evans, G.; Caseres, PI.; Maxwell, WMC.** (1994). Effect of monosaccharides and disaccharides in TRIS base diluents on motility, acrosome integrity, and fertility of pellets frozen ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 36:113-122.
45. **Norton, DB.; Bruce, SG.** (1989). Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 39:311-316.
46. **Nothling, JO.; Volkman, DH.** (1993). Effect of addition of autologous prostatic fluids on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination. *J. Reprod. Fertil* 47:325-327.
47. **Parks, JE.; Meacham, TN.; Saacke, RG.** (1981). Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. Effect of liposomes prepared from egg phosphatidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids and viability a 4°C and 37°C. *Biol Reprod.* 24:399-404.
48. **Paulens, H.** (1993). The structure and function of the sperm membrane in relation to cold shock. *Norw. J. Vet. Med.* 105:1135-1142.
49. **Peña Martínez, AI.** (1997). Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación. [tesis doctoral]. Universidad de Santiago de Compostela.
50. **Pettit, MJ.; Bhur, MM.** (1998). Extender components and surfactants after boar sperm function and membrane behavior during criopreservation. *J Androl.* 19:736-746.
51. **Pursel, VG.; Jonshon, LA.** (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology* 1:63-68.
52. **Pursel, VG.; Shulman, LL.; Jonshon, LA.** (1978). Effect of Orvus ES paste on acrosomal morphology, motility and fertilizing capacity of frozen thawed board sperm. *J. Anim. Sci.* 47:198-202.
53. **Quinn, PJ.; Chow, PYW.; White, IG.** (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at plasma membrane site. *J Reprod Fertil* 60:403-407.
54. **Rodriguez-Gil, JE.; Montserrat, A.; Rigau, T.** (1994). Effect of hypo-osmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology* 44:885-900.
55. **Santos, IW.** (2004). Albumina sérica bovina como fonte protéica do diluidor Tris (hidroximetilamino metano) para congelação do sêmen canino. [tesis doctoral] Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista. Brasil.
56. **Savignone, CA.; Gimenez, F.; Nuñez Favre, R.; Tittarelli, CM.; Stornelli, MC.; de la Sota, RL.; Stornelli, MA.** (2007). Comparison of different concentrations of dimethyl formamide on viability of frozen-thawed dog spermatozoa. Proceedings of the XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Curitiba, Brasil.
57. **Savignone, CA.; Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Arauz, MS.; de la Sota, RL.** (2001). «Estudio de la supervivencia de semen canino almacenado a 4°C y 15°C en MRA@-yema de huevo». Proceedings of the I Congreso Nacional de la Asociación de Veterinarios especializados en Animales de Compañía de Argentina (AVEACA). Jul 8-9. Buenos Aires, Argentina.
58. **Savignone, C.A.; Stornelli, M.C.; Tittarelli, C.M.; Giménez, F.; de la Sota, R.L.; Stornelli, M.A.** (2006). Efecto de la adición de concentraciones de trealosa que no modifiquen la osmolalidad del diluyente TRIS base sobre la supervivencia espermática posdescongelación en caninos. Proceedings of the X Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Ciencias Morfológicas; Marzo 15-17; Tandil, Argentina.
59. **Savignone, C.; Tittarelli, C.; Stornelli, MC.; Nuñez Favre, R.; de la Sota, RL.; Stornelli, MA.** (2006). Cryoprotectant effect of trehalose on canine semen. Proceedings of the III Congreso de FIAVAC (Federación Ibero Americana de Asociaciones Veterinarias de Animales de compañía) y XXVII Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA. May 31-Jun 3; Vitória, Brasil.
60. **Seager, SWJ.** (1969). Successful pregnancies utilizing frozen semen. *A.I. Digest.* 17:6-7.
61. **Silva, AR.; Cardoso, RCS.; Uchoa, DC., Silva, LDM.** (2003). Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology* 59:821-829.
62. **Silva, LDM.** (2001). Avanços da inseminação artificial na espécie canina. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 25:107-111.
63. **Silva, LDM.; Onclin, K.; Lejeune, B.; Vestergen, JP.** (1996). Comparison of intravaginal and

- intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen; *Vet. Rec.* 138:154-157.
64. **Smith, FO.** (1986). Update on freezing canine semen. In: Kirk RW editor. *Current Veterinary Therapy IX: Small Animal practice.* WB Saunders Philadelphia PA p 1243-1248.
 65. **Stornelli, MA.** (2004). Estudios de supervivencia y fertilidad de semen canino criopreservado. [tesis doctoral]. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.
 66. **Stornelli, MA.; Leone, FL.; Stornelli, MC.; Savignone, CA.; Tittarelli, CM.; de la Sota, RL.** (2005). Porcentajes de preñez obtenidos mediante inseminación artificial con semen congelado con un diluyente TRIS base con y sin el agregado de 1,5% de Equex STM paste. Proceedings of the 4^{tas} Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica; Ago 5-6; Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
 67. **Stornelli, MA.; Savignone, C.; Jurado, S.; Stornelli, MC.; Tittarelli, CM.; de la Sota, RL.** (2004). Estudio ultraestructural de semen canino fresco y descongelado. Proceedings of the IX Congreso Argentino de Ciencias Morfológicas. Abr 1-3. La Plata, Buenos Aires, Argentina.
 68. **Stornelli, MA.; Savignone, C.; Stornelli, MC.; Tittarelli, C.; Jurado, S.; Giménez, F.; de la Sota, RL.** (2006). Fertility and ultrastructural analysis of frozen-thawed dog spermatozoa with different concentrations of Equex STM Paste. *Theriogenology* 66:664-665.
 69. **Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Arauz, MS.; Savignone, CA.; García, M.; de la Sota, RL.** (2001). Study of the effect three extender on canine semen stored chilled at 4°C. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 25:468-470.
 70. **Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Arauz, MS.; Savignone, CA.; García, M.; de la Sota, RL.** (2002). Effects of two different temperatures and three different extenders on survival and longevity of chilled canine semen. *Theriogenology* 57:483.
 71. **Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Savignone, C.; Arauz, MS.; de la Sota, RF.** (2002) Comparison of different concentrations of Equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa. Proceedings of the Third EVVSAR European Congress on Reproduction in Companion, Exotic and Laboratory Animals. European Veterinary Society for Small Animal Reproduction. May. 10-12. Liege, Bélgica.
 72. **Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Savignone, C.; Arauz, MS.; Tittarelli, C.; de la Sota, RF.** (2003). Efecto de diferentes concentraciones de trealosa sobre la supervivencia espermática posdescongelación en caninos. Proceedings of the V Simposio Internacional de Reproducción Animal. IRAC. Jun 27-29; Huerta Grande, Córdoba, Argentina.
 73. **Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Savignone, C.; Arauz, MS.; Tittarelli, C.; de la Sota, RF.** (2003). Comparison of different concentrations of trehalose on viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 27: 359-361.
 74. **Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Savignone, C.; Tittarelli, CM.; Jurado, S.; Leone, FL.; de la Sota, RL.** (2005). Efecto del agregado de diferentes concentraciones de Equex STM paste al diluyente TRIS base sobre la viabilidad y ultraestructura del semen canino congelado-descongelado. Proceedings of the 4^{tas} Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. Ago. 5-6. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
 75. **Stornelli, MA.; Stornelli, MC.; Savignone, CA.; Tittarelli, CM.; Jurado, S.; de la Sota, RL.** (2004). Viability study and ultrastructural changes of frozen-thawed dog spermatozoa with different Equex STM paste concentrations. Proceedings of the 15th International Congress on Animal Reproduction; Ago 8-12; Porto Seguro, Brasil.
 76. **Voelkel, SA.; Hu, Y.** (1992). Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology* 37:687-697.
 77. **Wales, RG.; White, IG.** (1963). Viability of diluted dog spermatozoa in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 5:67-76.
 78. **Watson, PF.** (1976). The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5° C and deep-freezing. *J. Thermal Biol.* 1:137-141.
 79. **Watson, PF.** (1981). The effects of cold shock on sperm cell membrane. In: Morris GJ, Clarke A, editores. *Effects of low temperatures on biological membranes.* Orlando. Fla.: Academic Press; p. 189-417.
 80. **Watson, PF.** (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fert.* 62:483-492.
 81. **Watson, PF.** (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:781-791.
 82. **Watson, PF.; Duncan, G.** (1988). Effect of salt concentration and unfrozen water on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology* 25:131-142.
 83. **Wildt, DE.** (1986). Laparoscopy. In Burke TJ editor. *Small Animal Reproduction and infertility.* Philadelphia, PA. Lea & Febiger. p. 121-140.
 84. **Wilson, M.** (1993). Non surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J. Reprod. Fertil.* 47:307-311.
 85. **Yildiz, C.; Kaya, A.; Askoy, M.; Tekeli, T.** (2000). Influence of sugar supplementation of extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenolog.* 54:579-585.

Primera comprobación de *Sarcocystis* spp. en *Didelphis albiventris* (“comadreja mora”) en Uruguay. (*)

Noya, F.^{1A}; Delucchi, L.²; Castro Janer, E.¹

RESUMEN

La “comadreja mora” (*Didelphis albiventris*) es el huésped definitivo, para América del Sur, de *Sarcocystis neurona*, agente etiológico de la mieloencefalitis equina por protozoarios. Esta enfermedad ha sido diagnosticada en varios países de la región, sospechándose su presencia en el Uruguay, a raíz de la ocurrencia de varios cuadros neurológicos en equinos, desde el año 2002 a la fecha. El objetivo del presente trabajo es determinar la presencia de esporocistos de *Sarcocystis* spp. en la «comadreja mora», en la zona de influencia de los brotes. Se realizan necropsias parasitarias a 3 comadrijas recogidas muertas, en abril y junio de 2005. En el intestino delgado se realizan raspajes de mucosa, que luego se homogenizan en una licuadora con 100 ml de agua destilada. Se examina el homogeneizado en el microscopio óptico (400X). En 1 de las 3 comadrijas, se observan algunos ooquistes conteniendo 2 esporocistos y abundante cantidad de esporocistos libres que se miden con un micrómetro ocular. La media para el diámetro mayor es de $14,67\mu \pm 1,35\mu$ ($10,52-15,78\mu$) y para el diámetro menor de $9,88\mu \pm 0,97\mu$ ($7,89-12,62\mu$). Se concluye que estas estructuras corresponden a esporocistos de *Sarcocystis* spp., siendo ésta su primera comprobación en *Didelphis albiventris* en Uruguay. Para determinar la especie actuante, se sugiere su aislamiento e identificación, a través de técnicas moleculares.

Palabras clave: *Sarcocystis*, “comadreja mora” (*Didelphis albiventris*), mieloencefalitis equina por protozoarios.

SUMMARY

The «comadreja mora» (*Didelphis albiventris*) is the definitive host, for South America, of *Sarcocystis neurona*, causative agent of the equine protozoal myeloencephalitis. This disease has been diagnosed in several countries of the region, suspecting its presence in Uruguay, due to the occurrence of several neurological episodes in horses, from the 2002 to the date. The objective of the present study is to determine the presence of *Sarcocystis* spp. sporocysts in the «comadreja mora». A parasitary necropsy is practiced to 3 picked dead opossums, in April and June 2005. Mucose scrapings are practiced in the small intestine, which are, afterwards, homogenized in a blender with 100 ml of distilled water. The homogenate is examined under the optical microscope (400X). In one of the three opossum some oocysts are observed containing 2 sporocysts, and a large number of free sporocysts, which are measured with an ocular micrometer. The mean for the greater diameter is $14,67\mu \pm 1,35\mu$ ($10,52-15,78\mu$), and for the minor diameter is $9,88\mu \pm 0,97\mu$ ($7,89-12,62\mu$). It is concluded that these structures belong to *Sarcocystis* spp. sporocysts, being this, its first verification in *Didelphis albiventris* in Uruguay. To determine the acting specie, is suggested its isolation and identification, through molecular techniques.

Key words: *Sarcocystis*, “comadreja mora” (*Didelphis albiventris*), equine protozoal myeloencephalitis.

INTRODUCCIÓN

Las comadrijas, *Didelphis virginiana* para América del Norte y *Didelphis albiventris* (“comadreja mora”) para América del Sur, son huéspedes definitivos de más de una especie de *Sarcocystis*, incluyendo *Sarcocystis neurona* (2).

La “comadreja mora” ha sido identificada como huésped definitivo de *Sarco-*

cystis speeri (5) y de *Sarcocystis falcatula* (7). Ambas especies fueron aisladas, en ratones y en aves respectivamente, a partir de esporocistos provenientes de comadrijas en Argentina (5, 7). Posteriormente, también fue reconocida como huésped definitivo de *Sarcocystis neurona*, luego de su aislamiento en ratones, a partir de esporocistos obtenidos de comadrijas en Brasil (3). Cabe

destacar que *Didelphis albiventris* se distribuye por todo el territorio uruguayo, siendo considerada como una especie «no amenazada» (14) y que puede desplazarse de un país a otro, pudiendo diseminarse diferentes agentes parasitarios.

El ciclo biológico de *Sarcocystis neurona* es indirecto, siendo sus huéspedes intermediarios naturales diversos herbívoros, que se infectan al ingerir alimen-

¹Departamento de Parasitología, Facultad de Veterinaria, Alberto Lasplacas 1550, Montevideo, Uruguay, tel.: 598(2) 622.16.96, e-mail florencianoya@adinet.com.uy

^ABecaria de la CIDEAC

²Departamento de Pequeños Animales, Facultad de Veterinaria, UDELAR.

(*) Trabajo publicado en el libro de resúmenes del 12° Simposio Internacional de la Asociación Mundial de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario (WAVLD), 7° Seminario de la OIE en Biotecnología, VIII Congreso Nacional de Medicina Veterinaria «Dr. Luis Queirolo Monteverde», V Congreso Nacional de Veterinarios Especialistas en Pequeños Animales (SUVÉPA-filial SMVU) 5tas. Jornadas de la Asociación Uruguaya de Veterinaria Equina, 5° Taller Panamericano de Laboratorios Lácteos, eventos realizados del 16 al 19 de Noviembre de 2005, Radisson Victoria Plaza Hotel, Montevideo, Uruguay.

tos contaminados con esporocistos. Estos esporocistos son eliminados en la materia fecal de la comadreja (transmisión feco-oral). El ciclo se cierra cuando la comadreja ingiere a un huésped intermediario con sarcocistes. El equino participa como huésped aberrante, ya que sólo se encuentran en él esquizontes y merozoitos, no sarcocistes. Adquiere la enfermedad cuando, accidentalmente, ingiere alimento o agua contaminada con esporocistos (18).

La mieloencefalitis equina por protozoos (MEP), es una enfermedad neurológica importante que afecta a equinos de toda América cuyo agente etiológico es, entre otros, *Sarcocystis neurona* (16, 12). Tanto las células nerviosas como las células inflamatorias del sistema nervioso central (S.N.C.) pueden ser parasitadas (2). El pronóstico depende del grado de infestación y duración del compromiso del S.N.C. pero un diagnóstico temprano y un pronto tratamiento aumentan las chances de una resolución clínica favorable, si bien pueden ocurrir recaídas (15).

Existen relatos de casos de MEP en equinos de Estados Unidos, Panamá, Canadá, Venezuela, Argentina, México y Brasil (18, 19). En países de la región como Brasil y Argentina existe una alta prevalencia de anticuerpos contra *S. neurona* en los caballos, lo cual indica la exposición de los mismos al agente etiológico de MEP y que por lo tanto existe una alta contaminación con *S. neurona* en estos países. En Argentina fueron detectados anticuerpos contra *S. neurona* en un 35,5% de 76 caballos (9) y en Brasil en un 36% de 101 caballos (10). En el Uruguay se sospecha su presencia a raíz de la ocurrencia de tres casos clínicos con sintomatología nerviosa ocurridos durante el 2002 y 2003, en equinos mayores de 5 años, dos Pura Sangre de Carrera y uno cruzado, en los departamentos de San José (Rincón del Pino), Montevideo (Camino Cambay y Camino Carras-

co) y Canelones (proximidad de San Jacinto)*. A pesar de que no existían trabajos indicando su presencia en el país, la MEP fue incluida en el diagnóstico diferencial (a fines del 2004 y principios del 2005) en equinos con sintomatología nerviosa en la Facultad de Veterinaria (Montevideo). Estos equinos posteriormente murieron, no pudiéndose llegar al diagnóstico etiológico.

Si bien se sospecha la presencia de la enfermedad, aún no se han realizado estudios que confirmen su diagnóstico en los equinos del país, así como tampoco, estudios que determinen la presencia del parásito en el huésped definitivo, la "comadreja mora". Por dicha razón, el objetivo del presente trabajo es investigar la presencia de *Sarcocystis* spp. en *Didelphis albiventris* en la zona de influencia de los brotes.

MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia de investigación fue estudiar las comadrejas que se encontraran en la zona de influencia de los brotes antes mencionados. Se estudiaron 3 "comadrejas moras" recogidas muertas en abril y junio de 2005, en el límite norte entre los departamentos de Montevideo y Canelones. Cada comadreja fue remitida entera en una bolsa cerrada y refrigerada al Laboratorio de Parasitología de Facultad de Veterinaria (Montevideo), donde se identificaron y se mantuvieron a 4°C hasta la realización de la necropsia parasitaria. Como se describe en la técnica de Dubey *et al.* (4), los esporocistos resisten y son almacenados a esta

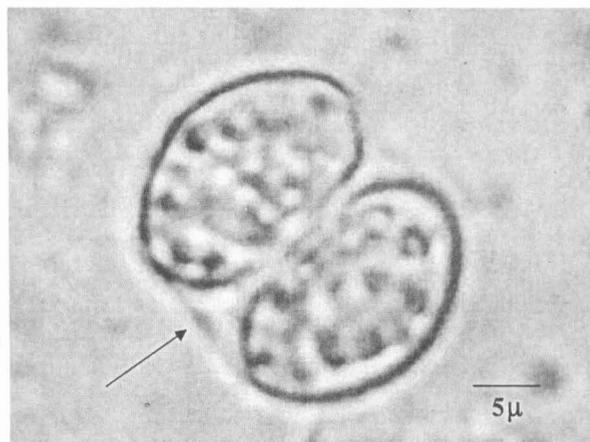
temperatura de 4°C, para posteriores estudios. Es una técnica sencilla, rápida y confiable, que no requiere materiales especiales.

Cada uno de los compartimentos digestivos fue ligado con doble ligadura, separado de los otros por incisión y extraído intacto. Luego se procedió a vaciar el contenido en recipientes individuales. En el intestino delgado, además, se realizó un raspaje de mucosa. Los raspajes intestinales fueron homogeneizados en una licuadora doméstica con 100 ml de agua destilada, durante 60 segundos, de acuerdo a la técnica de Dubey *et al.* (4). Posteriormente, se examinaron unas gotas del homogeneizado en el microscopio óptico (400X) para identificar esporocistos. Se utilizó un micrómetro ocular para la obtención de las medidas.

RESULTADOS

Sólo en el raspaje intestinal de 1 de las 3 comadrejas, se observaron algunos ooquistes de *Sarcocystis* spp. conteniendo 2 esporocistos (Figura 1) y abundante cantidad de esporocistos (Figura 2), algunos conteniendo 4 esporozoitos. Los esporocistos tenían en su interior un residuo de forma variable que, en algunos de ellos, se presentaba como gránulos dispersos y en otros como grandes glóbulos. La población de esporocistos estudiada (n=200) presentó una amplitud para el diámetro mayor de 10,52-15,78µ, con una media de 14,67µ y un desvío estándar de ± 1,35µ. Para el diámetro menor la amplitud fue de 7,89-12,62µ, la media de 9,88µ y el desvío estándar de ± 0,97µ.

Figura 1. Ooquiste de *Sarcocystis* spp. conteniendo 2 esporocistos. La flecha indica la pared del ooquiste.



* Perdomo E. (2004), comunicación personal.

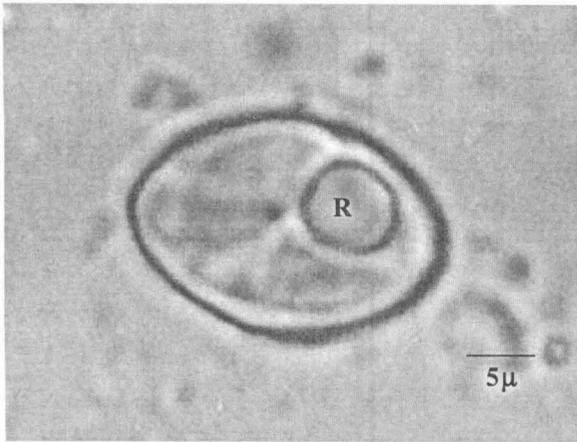


Figura 2. Esporocisto de *Sarcocystis* spp. conteniendo un residuo en forma de glóbulo grande y único (R) y esporozoitos.

DISCUSIÓN

El número de especies de *Sarcocystis* presentes en las comadrejas, es desconocido (6). Tanto las comadrejas de América del Norte (*Didelphis virginiana*), como las de América del Sur (*Didelphis albiventris*), actúan como huéspedes definitivos para tres especies identificadas de *Sarcocystis* (*S. neurona*, *S. falcatula* y *S. speeri*) y para otras especies todavía no identificadas (2).

Para la diferenciación entre especies de *Sarcocystis* se cuenta con bioensayos y técnicas moleculares. Dubey *et al.* (11) aislaron una especie de *Sarcocystis* distinta de *S. falcatula* y *S. neurona* en ratones inmunodeficientes, mediante la ingestión de esporocistos provenientes de comadrejas (*D. virginiana*). Posteriormente Dubey y Lindsay (8) nombraron a esta tercer especie de *Sarcocystis* como *S. speeri*. La base para la diferenciación de estas tres especies de *Sarcocystis* es su infectividad en aves y ratones inmunodeficientes, la tinción histoquímica con anticuerpos anti-*S. neurona* y la ultraestructura de los merozoitos (11). Por otro lado, Tanhauser *et al.* (20) desarrollaron marcadores moleculares para diferenciar *S. neurona* de *S. falcatula*. En dicho trabajo, de 9 inóculos de intestino, provenientes de comadrejas (*D. virginiana*), 5 se identificaron como *S. neurona*, 2 como *S. falcatula* y 2 resultaron ser organismos no identificados, distintos de *S. neurona* y *S. falcatula*.

Cheadle *et al.* (1), usando los análisis con enzimas de restricción desarrollados por Tanhauser *et al.* (20), determinaron las

especies de *Sarcocystis* presentes en comadrejas (*D. virginiana*) infectadas naturalmente. Con el objetivo de hacer un diagnóstico de las distintas especies de *Sarcocystis* por morfometría, midieron 20 esporocistos de cada aislamiento de las 3 especies caracterizadas (*S. neurona*, *S. falcatula* y *S. speeri*) y de 2 tipos de *Sarcocystis* no identificados, "tipo 1085" y "tipo 3344", (n=340). Para *S. neurona* la media fue de $10,7\mu(\pm 0,09) \times 7,0\mu(\pm 0,09)$ ($9,7-11,4\mu \times 6,2-8,4\mu$), para *S. falcatula* de $11,0\mu(\pm 0,13) \times 7,1\mu(\pm 0,10)$ ($8,8-11,9\mu \times 6,6-7,9\mu$), para *S. speeri* de $12,2\mu(\pm 0,14) \times 8,8\mu(\pm 0,09)$ ($11,0-13,2\mu \times 7,5-9,7\mu$), para el «tipo 1085» de $10,9\mu(\pm 0,07) \times 6,8\mu(\pm 0,07)$ ($9,7-11,9\mu \times 6,2-7,9\mu$) y para el "tipo 3344" de $19,4\mu(\pm 0,20) \times 10,5\mu(\pm 0,20)$ ($17,6-20,7\mu \times 9,2-11,9\mu$).

Lindsay *et al.* (17) realizaron un trabajo donde se describe por primera vez la estructura de los esporocistos de *S. neurona*, obtenidos de comadrejas (*D. virginiana*) infectadas experimentalmente. Para este ensayo fue utilizado el aislamiento SN-37R de esporocistos de *S. neurona*. Cuarenta esporocistos fueron medidos obteniendo una media de $11,3\mu(\pm 0,47) \times 8,2\mu(\pm 0,43)$ ($11-12\mu \times 7-9\mu$).

En un trabajo realizado por Fenger *et al.* (13) para determinar el huésped definitivo de *S. neurona* y para ver la relación entre *S. neurona* y *S. falcatula*, recuperaron esporocistos de *Sarcocystis* spp. a partir de comadrejas (*D. virginiana*) y midieron 50 de estos esporocistos. La media para el diámetro mayor fue de

$11,6\mu$ (amplitud de $10,0-12,0\mu$) y para el diámetro menor de $7,8\mu$ (amplitud de $7,0-8,0\mu$).

Las medidas de los esporocistos obtenidas en el presente trabajo no coinciden con ninguna de las medidas obtenidas por Cheadle *et al.* (1) para las diferentes especies de *Sarcocystis*, ni con las medidas obtenidas por Fenger *et al.* (13) para *Sarcocystis* spp., así como tampoco con las medidas obtenidas para *S. neurona* por Lindsay *et al.* (17). Se debe tener en cuenta que el número de esporocistos medidos en el presente trabajo es mayor que los n esporocistos estudiados por Lindsay *et al.* (17) y por Fenger *et al.* (13).

CONCLUSIONES

Si bien hasta el momento, no es posible diferenciar las distintas especies de *Sarcocystis* basados únicamente en las medidas de los esporocistos y en su morfología interna, podemos inferir que en la población de esporocistos estudiada en el presente trabajo hay más de una especie de *Sarcocystis*, debido a la gran dispersión que presentó dicha población.

Se concluye que las estructuras encontradas en el presente estudio corresponden a esporocistos de *Sarcocystis* spp., siendo ésta la primera comprobación de su presencia en *Didelphis albiventris* en Uruguay. Se sugiere para trabajos futuros, su aislamiento e identificación a través de técnicas moleculares, así como también la realización de un relevamiento serológico en los equinos del país para conocer si están o no expuestos a *S. neurona*.

Agradecimientos

Al Dr. Alfredo Oddo por el aporte de las comadrejas utilizadas en el presente trabajo.

Referencias bibliográficas

1. Cheadle, M.A.; Dame, J.B.; Greiner, E.C. (2001). Sporocyst size of isolates of *Sarcocystis* shed by the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). *Vet. Parasitol.* 95 (2-4): 305-311.
2. Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Saville, W.J.A.; Reed, S.M.; Granstrom, D.E.; Speer, C.A. (2001). A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Vet. Parasitol.* 95(2-4): 89-131
3. Dubey, J.P.; Lindsay, D.S.; Kerber, C.E.; Kasai, N.; Pena, H.F.J.; Gennari, S.M.; Kwok, O.C.H.; Shen, S.K.; Rosenthal, B.M. (2001). First isolation of *Sarcocystis neurona* from the South American opossum, *Didelphis albiventris*, from Brazil. *Vet. Parasitol.* 95(2-4): 295-304.
4. Dubey, J.P.; Black, S.S.; Rickard, L.G.; Rosenthal, B.M.; Lindsay, D.S.; Shen, S.K.; Kwok, O.C.H.; Hurst, G.; Rashmir-Raven, A. (2001). Prevalence of *Sarcocystis neurona* sporocyst in opossums (*Didelphis virginiana*) from rural Mississippi. *Vet. Parasitol.* 95(2-4): 283-293.
5. Dubey, J.P.; Venturini, L.; Venturini, M.C.; Speer, C.A. (2000). Isolation of *Sarcocystis speeri* Dubey and Lindsay, 1999 Parasite from the South American Opossum (*Didelphis albiventris*) from Argentina. *J. Parasitol.* 86 (1): 160-163.
6. Dubey, J.P. (2000). Prevalence of *Sarcocystis* species sporocysts in wild-caught opossums (*Didelphis virginiana*). *J. Parasitol.* 86 (4): 705-710.
7. Dubey, J.P.; Venturini, L.; Venturini, C.; Basso, W.; Unzaga, J. (1999). Isolation of *Sarcocystis falcatula* from the South American opossum (*Didelphis albiventris*) from Argentina. *Vet. Parasitol.* 86(4): 239-244.
8. Dubey, J.P.; Lindsay, D.S. (1999). *Sarcocystis speeri* n. sp. (Protozoa: Sarcocystidae) from the opossums (*Didelphis virginiana*). *J. Parasitol.* 85(5): 903-909.
9. Dubey, J.P.; Venturini, M.C.; Venturini, L.; McKinney, J.; Pecoraro, M. (1999). Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. *Vet. Parasitol.* 86(1): 59-62.
10. Dubey, J.P.; Kerber, C.E.; Granstrom, D.E. (1999). Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses in Brazil. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215(7): 970-972.
11. Dubey, J.P.; Speer, C.A.; Lindsay, D.S. (1998). Isolation of a third species of *Sarcocystis* in immunodeficient mice fed feces from opossums (*Didelphis virginiana*) and its differentiation from *Sarcocystis falcatula* and *Sarcocystis neurona*. *J. Parasitol.* 84(6): 1158-1164.
12. Dubey, J.P.; Davis, S.W.; Speer, C.A.; Bowman, D.D.; de Lahunta, A.; Granstrom, D.E.; Topper, M.J.; Hamir, A.N.; Cummings, J.F.; Suter, M.M. (1991). *Sarcocystis neurona* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. *J. Parasitol.* 77: 212-218.
13. Fenger, C.K.; Granstrom, D.E.; Gajadhar, A.A.; Williams, N.M.; McCrillis, S.A.; Stamper, S.; Langemeier, J.L.; Dubey, J.P. (1997). Experimental induction of equine protozoal myeloencephalitis in horses using *Sarcocystis* sp. Sporocysts from the opossum (*Didelphis virginiana*). *Vet. Parasitol.* 68(3):199-213.
14. González, E.M. (2001). Introducción al estudio de los mamíferos. En: González, E.M. Guía de campo de los mamíferos de Uruguay. Ed. VIDA SILVESTRE, Montevideo, pp. 48-49.
15. Gray, L.C.; Magdesian, K.G.; Sturges, B.K.; Madigan, J.E. (2001). Suspected protozoal myeloencephalitis in a tow-month-old colt. *Vet. Rec.* 149(9): 269-273.
16. Hamir, A.N.; Tornquist, S.J.; Gerros, T.C.; Topper, M.J.; Dubey, J.P. (1998). *Neospora caninum*-associated equine protozoal myeloencephalitis. *Vet. Parasitol.* 79(4): 269-274.
17. Lindsay, D.S.; Mitchell, S.M.; Vianna, M.C.; Dubey, J.P. (2004). *Sarcocystis neurona* (Protozoa: Apicomplexa): description of oocysts, sporocysts, sporozoites, excystation, and early development. *J. Parasitol.* 90 (3): 461-465.
18. MacKay, R.J. (1997). Equine protozoal myeloencephalitis. *The Veterinary Clinics of North America: Equine practice* 13(1): 79-96.
19. Masri, M.D.; Alda, J.L.; Dubey, J.P. (1992). *Sarcocystis neurona* - associated ataxia in horses in Brazil. *Vet. Parasitol.* 44(3-4): 311-314.
20. Tanhauser, S.M.; Yowell, C.A.; Cutler, T.J.; Greiner, E.C.; Mackay, R.J.; Dame, J.B. (1999). Multiple DNA markers differentiate *Sarcocystis neurona* and *Sarcocystis falcatula*. *J. Parasitol.* 85(2): 221-228.

SUPLEMENTACIÓN PROTEICA EN GANADO DE CARNE

Soto Silva, C.¹; Reinoso Ortiz, V.¹

RESUMEN

Los vacunos alimentados con forrajes de baja calidad, altos en fibra y deficientes en proteína (ej. campo natural muy empastado, rastrojos de sorgo y maíz, pajas de cereales, etc.) presentan una baja a negativa ganancia de peso vivo debido a que este tipo de forraje se degrada muy lentamente en rumen ocasionando un bajo consumo voluntario. La suplementación con proteína de alta degradabilidad ruminal corrige el déficit de nitrógeno, aumenta la velocidad de degradación, la llegada de proteína verdadera al duodeno y el consumo de forraje. Para lograr una respuesta positiva a la suplementación proteica, el forraje debe ser de baja calidad, deficiente en proteína (menor 6 a 8% PB, relación NDT : PB mayor a 7 o relación PDR : NDT menor a 11%) y encontrarse en alta disponibilidad para que los animales puedan expresar un incremento en el consumo de forraje. Se debe suplementar a bajo nivel (0.1 a 0.3% PV) con un suplemento de elevado tenor proteico (mayor a 30% PB) elaborado en base a proteína verdadera de alta degradabilidad en rumen preferentemente sin la incorporación de NNP o incorporado a bajo nivel. El suplemento proteico puede ser suministrado diariamente o cada 2 o 3 días sin pérdida de eficiencia.

Palabras clave: suplementación proteica, forrajes de baja calidad, bovinos a pastoreo.

INTRODUCCIÓN

En la zona templada las pasturas generalmente son de alta calidad (adecuadas en energía y proteína) siendo la principal limitante la cantidad de forraje, sin embargo, en determinadas condiciones algunas pasturas pueden aparecer deficientes en nitrógeno para los microorganismos del rumen lo cual limita la performance animal (1, 14, 53).

El objetivo del presente trabajo es discutir brevemente los principales aspectos de la suplementación con proteína de alta degradabilidad en rumen.

OBJETIVO DE LA SUPLEMENTACIÓN PROTEICA

Diversos trabajos han mostrado una baja a negativa ganancia de peso vivo (PV) y una pérdida de condición corporal (CC) en ganado de carne alimentado con forraje de baja calidad, lo cual se atribuye al bajo consumo de nutrientes que se logra con este tipo de alimento (14, 35, 47, 54). Los forrajes de baja calidad (deficientes en proteína) presentan un bajo consumo voluntario debido a su alto contenido de carbohidratos estructurales que se degradan muy lentamente y per-

manecen mucho tiempo retenidos en rumen. La suplementación proteica incrementa el consumo de este tipo de forraje debido a que aumenta su velocidad de digestión, la tasa de pasaje ruminal y la llegada de proteína verdadera al duodeno (18, 27, 33, 38). Para que esto suceda se requieren dos factores fundamentales:

1° el forraje debe ser de baja calidad, con alto contenido en fibra y bajo en proteína (1, 14, 27, 53). En forrajes con niveles adecuados de nitrógeno la suplementación proteica no incrementa el consumo de forraje (1, 34, 36, 41, 46, 52), ocasionando muchas veces una sustitución de forraje por suplemento, en estos casos los suplementos proteicos actuarían únicamente como fuente de energía (1). Dolberg y Finlayson (15) encontraron que con paja tratada con amoníaco, en la cual la proteína degradable en rumen no era limitante para los microorganismos ruminales, a medida que aumentaba el consumo de torta de semilla de algodón disminuía marcadamente el consumo de forraje, ocasionando una sustitución de forraje por suplemento aún con bajo nivel de suplementación.

2° la oferta forrajera no debe ser limitante, debe existir una alta disponibili-

dad de pastura, si la oferta de pastura por animal y/o por unidad de superficie es escasa no existe respuesta a la suplementación proteica por la imposibilidad de los animales de expresar un incremento en el consumo de forraje (14, 39, 53, 54).

DETERMINACIÓN DE LA NECESIDAD DE SUPLEMENTAR CON PROTEÍNA

Para determinar si es necesario suplementar con proteína se pueden emplear parámetros del forraje y/o del animal.

Los microorganismos del rumen necesitan un adecuado balance nitrógeno - energía para realizar una eficiente digestión ruminal (11, 18). Se ha sugerido que dietas con un contenido menor a 6 a 8% de Proteína Bruta (PB) serían limitantes para los microorganismos ruminales, en estas condiciones suplementar con una fuente de Proteína Degradable en Rumen (PDR) sería beneficioso (1, 14, 38, 39, 53). Moore y Kunkle (47) encontraron que el consumo declina rápidamente cuando el contenido en PB del forraje descende por debajo de 7%, lo cual sería consecuencia directa de una deficiencia de nitrógeno en rumen que limitaría la actividad microbiana.

¹DMTV, actividad privada. Manuel Oribe 389, Artigas - Uruguay; CP 55000; e-mail: srvet@adinet.com.uy

Recibido: 6/8/07 Aprobado: 24/9/07

Recientemente, investigadores de la Universidad de Florida en EE.UU. (44, 45, 46, 47) encontraron que más que el contenido aislado de un único nutriente del forraje, la relación energía – proteína conseguía explicar mucho mejor el efecto de la suplementación sobre el consumo de forraje y el balance de nutrientes (cuadro 1). Cuando la relación entre Nutrientes Digestibles Totales (NDT) y PB es mayor a 7 el forraje presenta un déficit de nitrógeno en relación a su contenido en energía (46) y en consecuencia respondería positivamente a la suplementación proteica (6, 30). El objetivo de la suplementación sería lograr dietas con una relación NDT:PB entre 4 y 6 (39). Un procedimiento más exacto para determinar las necesidades de proteína suplementaria es balancear la relación proteína: energía de la dieta utilizando la PDR en lugar de la PB. Para maximizar la fermentación ruminal y el consumo de nutrientes, la dieta debe tener una relación PDR:NDT de 10 a 11% dependiendo de

la calidad de la dieta (11, 26, 48). Usualmente el 65 a 75% de la proteína del forraje es degradada en rumen (30, 50), el óptimo aprovechamiento de forrajes de mediana a baja calidad (45 a 60% NDT) ocurre cuando el consumo de PDR representa aproximadamente el 11% del consumo de NDT (6, 7, 14, 25, 32). En consecuencia, forrajes con una relación PDR:NDT menor a 11% responderían favorablemente a la suplementación proteica (6, 7, 30).

En condiciones de pastoreo donde la calidad del forraje cambia con el tiempo y la selectividad animal es alta es dificultoso establecer con precisión la relación energía – proteína del forraje consumido (1, 20). En rumiantes la concentración de Nitrógeno Ureico en Sangre (NUS) es indicativo de la relación energía – proteína de la dieta (20). Cuando existe en rumen un exceso de nitrógeno en relación a la energía, la concentración de amoníaco (NH₃) ruminal se incrementa (6, 24, 25, 27) lo cual se refleja en un aumento en la

concentración de NUS (20). En cambio cuando existe una deficiencia dietética en proteína la concentración de NH₃ ruminal es baja (6, 21, 25, 27) y el reciclado de nitrógeno desde la sangre y por la saliva hacia el rumen es más eficiente (24) lo cual se traduce en una disminución en la concentración de NUS (20).

El NUS puede ser empleado para evaluar la respuesta biológica a la suplementación proteica o energética y los cambios en la cantidad o calidad del forraje (20). El criterio para iniciar o incrementar el nivel de suplementación proteica podría ser cuando el promedio de una muestra representativa del rodeo presenta una concentración de NUS menor a 7 mg/dl o el 25% de los animales de la muestra presentan una concentración menor a 6 mg/dl (19, 20). Bajo estas condiciones existe una respuesta muy favorable en ganancia de PV a la suplementación proteica en vacas de cría y en novillos en terminación (cuadro 2) (19, 20).

Cuadro 1. Balance energía – proteína del forraje y relación NDT:PB del forraje (adaptado de Moore y col. 1999 y Beck y col. 2005).

Balance energía – proteína del forraje	Relación NDT:PB del forraje	Ejemplos de forrajes	Suplementar con:
Excesivo en Nitrógeno	< 4	Verdeos de invierno de alta calidad en estado vegetativo	Energía
Adecuado en Nitrógeno	4 a 7	Mayoría de las praderas y del campo natural	Energía
Deficiente en Nitrógeno	7 a 12	Pasturas maduras, algunos ensilajes y henos de gramíneas	Proteínas
Muy deficiente en Nitrógeno	> 12	Algunas pajas de cereales y forrajes tropicales muy maduros	Proteínas (*)

(*) El forraje es tan deficiente en nitrógeno que responde a casi cualquier nivel de proteína del suplemento.

Cuadro 2. Relación entre la concentración de nitrógeno ureico en sangre y el balance energía – proteína de la dieta (adaptado de Hammond 1992, 1997).

Nitrógeno ureico en sangre (mg/dl)	Balance energía - proteína de la dieta	Respuesta suplementación:	
		Proteica	Energética
< 7	Deficiente en nitrógeno	Muy positiva	Negativa
8 a 12	Balanceada	Positiva marginal	Positiva
> 10 a 12	Excesiva en nitrógeno	Negativa	Muy positiva

SITUACIONES EN LAS CUALES EL FORRAJE SE PRESENTA DEFICIENTE EN PROTEÍNA

Campos muy empastados con abundante forraje maduro y restos secos presentan serias limitantes en calidad (43). A medida que la pastura madura se produce una pérdida progresiva de calidad que se traduce en una disminución de la digestibilidad y del contenido proteico (1).

La calidad del forraje disminuye a medida que se extiende el período de acumulación, aumenta la disponibilidad o la altura de la pastura. En Uruguay se ha constatado que el contenido de PB del forraje disminuye en forma importante cuando el período de descanso supera los 60 días (2, 5, 51) o se acumulan más de 2000 kg MS/ha (43).

En el cuadro 3 se puede apreciar como a partir de los 2300 kg MS/ha o un contenido en PB del forraje ofrecido menor a 7.7% ovinos pastoreando a campo natural cosecharían una dieta deficiente en nitrógeno (relación NDT:PB > 7), debido a la capacidad de los ovinos de cosechar una dieta de mayor calidad que los vacunos (43). Cabría esperar que estos últimos comiencen a cosechar una dieta deficiente en nitrógeno con menor disponibilidad de la pastura y mayor contenido proteico del forraje que los sugeridos en el cuadro 3.

En el cuadro 4 se presenta la relación energía – proteína de algunos forrajes de Uruguay, analizando los datos de dicho cuadro en general los henos y ensilajes de leguminosas, las praderas y los verdes de invierno aparecen con un balance de adecuado a excesivo en nitrógeno en relación a la energía que aportan, los verdes de verano, los henos y ensilajes de gramíneas aparecen con un contenido de adecuado a deficiente en nitrógeno mientras que el campo natural presenta un nivel intermedio de adecuado a marginal.

Si se asume que en promedio, los vacunos pastoreando campo natural en Uruguay cosechan un forraje con 55 – 59% NDT (43) y para la óptima utilización de forrajes de mediana a baja calidad se requiere una relación PDR:NDT igual a 11%, se puede inferir empíricamente del cuadro 5 que cuando el forraje cosechado presenta menos de 8 a 10% PB se estaría produciendo un déficit proteico.

CARACTERÍSTICAS DE UN BUEN SUPLEMENTO PROTEICO

Para estimular el consumo de forrajes de baja calidad un suplemento proteico debe aportar adecuada cantidad de PDR (6, 11, 14).

Origen de la fuente proteica: en ruminantes el nitrógeno de la dieta puede provenir de proteínas verdaderas (vegetal o animal) o de Nitrógeno No Proteico (NNP). Las proteínas verdaderas (Ej. harina de soja, expeller de girasol, harina de semilla de algodón, etc) son más efectivas en estimular el consumo y la digestión del forraje que el NNP (Ej. urea, biuret, fosfatos di y monoamonio, etc), a pesar que estos últimos son 100% degradables en rumen (11, 14, 28, 29). Las proteínas verdaderas además de nitrógeno aportan energía, azufre, aminoácidos, péptidos y esqueletos carbonados que tornan más eficiente los procesos de fermentación y crecimiento microbiano (11, 53), las fuentes de NNP aportan solo nitrógeno.

La urea es la fuente de NNP más comúnmente empleada en la dieta de ruminantes, es mejor aprovechada por los microorganismos del rumen con dietas altas en energía fermentecible (alta en granos) (37, 56), en cambio, en dietas a base de forraje la urea presenta una baja utilización debido en gran parte a su gran solubilidad en agua lo cual hace que sea hidrolizada en rumen muy rápidamente hasta NH₃, creando así una asincronía entre el pico de nitrógeno y la lenta fermentación de los sustratos energéticos del forraje (14, 37). La utilización de la urea

Cuadro 3. Relación entre disponibilidad de forraje del campo natural y balance energía – proteína de la dieta cosechada por ovinos (elaborado a partir de Montossi y col. 2000).

Disponibilidad (kg MS/ha)	PB forraje ofrecido (%MS)	PB forraje cosechado (%MS)	NDT forraje cosechado (%MS)	relación NDT:PB Forraje cosechado
1000	11.6	16.5	49.0	3.0
1500	10.1	14.0	61.5	4.4
2000	8.6	11.5	69.0	6.0
2300	7.7	10.0	71.1	7.1
2500	7.1	9.0	71.5	7.9
3000	5.6	6.5	69.0	10.6

Derivado del cuadro:

Relación NDT:PB dieta cosechada = $0.0000008 \cdot x^2 + 0.0003 \cdot x + 1.8733$; $r^2 = 0.9989$

donde x = Disponibilidad forraje, Kg MS/ha

Relación NDT:PB dieta cosechada = $0.0943x^2 - 2.8675x + 23.63$; $r^2 = 0.9989$

donde x = PB forraje ofrecido, % MS



Cuadro 4. Balance energía -- proteína de algunos forrajes de Uruguay (adaptado de Mieres 2004).

Alimento	PB (%MS)	NDT (%MS)	Relación NDT:PB
Praderas (mezcla gram. leg.)			
Verano	16,24	63,99	3,9
Otoño	19,25	61,83	3,2
Invierno	19,78	63,62	3,2
Primavera	17,03	62,65	3,7
Verdeos de invierno (avena + raigras)			
Invierno	17,74	63,46	3,6
Otoño	16,64	67,16	4,0
Primavera	14,80	63,68	4,3
Ensilajes y henos de leguminosas			
ensilaje de alfalfa	18,32	51,71	2,8
ensilaje de pradera	13,77	54,63	4,0
heno de alfalfa	18,82	57,03	3,0
heno de pradera	10,13	44,33	4,4
Campo natural			
Verano	8,63	54,73	6,3
Otoño	9,22	55,05	6,0
Invierno	9,15	56,01	6,1
Primavera	10,75	55,91	5,2
Verdeos de verano			
maíz, planta entera, verano	8,83	63,91	7,2
maíz, tallo, verano	3,96	50,85	12,8
maíz, tallo, otoño	2,77	54,35	19,6
sorgo forrajero, verano	8,99	54,99	6,1
sorgo forrajero, otoño	10,93	57,95	5,3
Ensilajes y henos de gramíneas			
ensilaje de maíz, grano pastoso	7,89	64,54	8,2
ensilaje de sorgo forrajero	6,06	58,26	9,6
heno de paja de avena	6,33	52,04	8,2
heno rastrojo sorgo forrajero	4,16	47,80	11,5

Cuadro 5. Nivel de PB necesario para lograr en el forraje una relación PDR:NDT igual a 11%.

NDT del forraje (% MS)	Degradabilidad de la PB del Forraje		
	65%	70%	75%
48	8.1	7.5	7.0
50	8.5	7.9	7.3
52	8.8	8.2	7.6
55	9.3	8.6	8.1
58	9.8	9.1	8.5

(*) Ejemplo (55% NDT, 70% degradabilidad) = $(55 * 0.11) / 0.70 = 8.6\%$ PB.

con dietas altas en forrajes puede ser mejorada con la adición de una fuente rica en energía rápidamente fermentable (ej. granos, melaza, etc) (56). Existe especial interés en el empleo de fuentes de NNP en dietas de rumiantes dado su bajo costo por unidad de nitrógeno (37).

Las proteínas verdaderas normalmente contienen suficiente azufre para cubrir los requerimientos de los microorganismos del rumen, sin embargo, cuando se suplementa con NNP se debe tener especial cuidado con el aporte de azufre, los microorganismos del rumen necesitan una relación nitrógeno : azufre en la dieta de 15 : 1 (3 g de azufre inorgánico cada 100 g de urea) (40, 57). La suplementación proteica es inefectiva si la dieta presenta un déficit de azufre (53, 57).

Nivel de proteína del suplemento: cuando se suplementan forrajes de baja calidad el suplemento debe poseer una relación PDR:NDT al menos suficiente para fermentar efectivamente la materia orgánica del suplemento sin necesidad de recurrir a la PDR del forraje, en consecuencia debe poseer como mínimo una relación PDR:NDT de 12 a 13% (11). Si el suplemento es bajo en proteína, la energía que este aporta exacerba la deficiencia de nitrógeno en rumen e impacta negativamente reduciendo el consumo y la digestibilidad del forraje (6, 13, 55). En la práctica, el suplemento debe poseer más de 25 a 30% PB, con una degradabilidad ruminal mínima de la proteína de 50 a 60% (14, 35, 39).

Nivel de NNP del suplemento: si bien el NNP es menos efectivo que la proteína verdadera en incrementar el consumo de forrajes de baja calidad, a bajo nivel de inclusión en el suplemento existe poca desventaja con respecto a las proteínas verdaderas (11, 29, 37). Clanton (10) en una serie de experimentos con ganado a pastoreo y diferentes niveles de inclusión de NNP al suplemento encontró que la performance animal disminuyó cuando el suplemento contenía más de 3% de urea en comparación con el ganado suplementado solo con proteína verdadera. Cuando el equivalente proteico aportado por la urea no supera el 25 a 30% de la PDR del suplemento (11, 29, 37) la diferencia en evolución de la CC en va-

cas de cría preñadas sería mínima comparado con animales suplementados solo con proteína verdadera. En animales en crecimiento es recomendable que el equivalente proteico aportado por el NNP no supere el 15% de la PDR del suplemento (37). A altos niveles de inclusión de urea (mayor a 45% PDR del suplemento) comienzan a aparecer problemas de palatabilidad y rechazo del suplemento lo cual dificulta lograr que los animales consuman todo el suplemento asignado (11).

Forma física del suplemento: los suplementos en forma de bloque y los de presentación líquida (Ej. melaza + urea) presentan mayor variabilidad individual en el consumo y mayor proporción de animales que no consumen suplemento en comparación con los de presentación seca (harinas, granos, cubos, pellets, etc) por lo cual se torna más difícil lograr que todos los animales consuman la cantidad de suplemento asignado (8). Además los bloques de bajo consumo (consistencia dura) presentan mayor variabilidad individual en el consumo que los de consistencia blanda (8).

NIVEL DE SUPLEMENTACIÓN

Para estimular significativamente el consumo y la digestión de forrajes de baja calidad se deben suministrar pequeñas cantidades de un suplemento de elevado contenido proteico (14, 35, 39, 54). A elevado nivel de suplementación (41, 46) una vez que el suplemento proteico cubre las necesidades de nitrógeno de los microorganismos del rumen actúa como energético lo cual puede ocasionar un efecto contrario al deseado, es decir una sustitución de forraje por suplemento (1, 11, 34, 52, 55). En estas condiciones la posible mejora en la performance se debe al surplus de energía que aporta el suplemento (1, 11). Además diversos trabajos han demostrado que un exceso de proteína en la dieta deprime el consumo de forraje (7, 12, 13, 25, 27). En general como guía práctica se recomienda un nivel de suplementación de 0.1 a 0.3% PV con un suplemento de elevado tenor proteico (> 30% PB) (39). Generalmente existe una respuesta positiva en ganancia de peso vivo cuando el consumo de PB proveniente del suplemento protei-

co supera el 0.05% PV y es siempre positiva cuando supera el 0.1% PV (46).

Cálculo de la cantidad de suplemento a suministrar: con forrajes de mediana a baja calidad (45 a 60% NDT) el objetivo de la suplementación es lograr una dieta con una relación PDR:NDT del 11% (6, 7, 14, 30, 32, 39).

Si representamos con:

$X1$ = consumo de MS de forraje con suplementación (kg o %PV).

$X2$ = consumo de MS de suplemento proteico (kg o %PV).

PDR_f , PDR_s = contenido en PDR del forraje y del suplemento respectivamente (%MS o kg/kgMS).

NDT_f , NDT_s = contenido en NDT del forraje y del suplemento respectivamente (%MS o kg/kgMS).

$[PDR:NDT]$ = relación deseada en la dieta entre el consumo de PDR y el consumo de NDT.

CMS_f = consumo proyectado de MS del forraje (kg o %PV), ej. 1.8 a 2.0% PV en vacas de crías preñadas no lactando, 2.3 a 2.5% PV en vacas de cría en lactación, 2.5% PV en animales en crecimiento (9, 32).

Matemáticamente el objetivo de lograr una determinada relación entre el consumo de PDR y NDT se expresa como:

$$\frac{PDR_f * X1 + PDR_s * X2}{NDT_f * X1 + NDT_s * X2} = [PDR:NDT]$$

Donde además se impone la condición que el consumo de forraje con suplementación sea igual al consumo estimado de forraje:

$$X1 = CMS_f$$

Luego de reducir apropiadamente los términos obtenemos el siguiente sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas:

$$(PDR_f - [PDR:NDT] * NDT_f) * X1 + (PDR_s - [PDR:NDT] * NDT_s) * X2 = 0$$

$$X1 = CMS_f$$

Este sistema de ecuaciones se resuelve por el método tradicional de eliminación de Gauss, o más sencillamente dado su especial configuración reduciéndolo a una única ecuación con una sola incógnita:

$$X2 = CMS_f * F / (-S)$$

Donde:

$$F = (PDR_f - [PDR:NDT] * NDT_f)$$

$$S = (PDR_s - [PDR:NDT] * NDT_s)$$

Si no se cuenta con la degradabilidad de la proteína de los alimentos, otra posibilidad es balancear la dieta en base a la relación NDT:PB (óptimo 4 a 6) (39), con lo cual las ecuaciones anteriores quedarían como:

$$X2 = CMS_f * F / (-S)$$

$$F = (NDT_f - [NDT:PB] * PB_f)$$

$$S = (NDT_s - [NDT:PB] * PB_s)$$

Donde:

PB_f , PB_s = contenido en PB del forraje y del suplemento respectivamente (%MS o kg/kgMS).

$[NDT:PB]$ = relación deseada entre el consumo de NDT y el consumo de PB.

Es importante destacar que la exactitud de la metodología de cálculo propuesta depende de la precisión con la cual se estimen los diferentes parámetros del modelo (Ej. degradabilidad de la proteína, calidad del forraje cosechado, consumo de forraje, etc.).

Ejemplo. Se estima que vacas de cría preñadas consumen el 2% PV de una pastura de alta disponibilidad y de mediana a baja calidad cuando la dieta presenta adecuado nivel de proteína. Si el forraje presenta 50% NDT y 6% PB (70% degradable en rumen, PDR = 4.2%) la relación PDR:NDT es de 8.4% (óptimo 11%) y la relación NDT:PB es de 7.7 (óptimo 4 a 6) lo cual está indicando una deficiencia en nitrógeno haciéndose necesario una suplementación proteica. La cantidad de suplemento (expeller de girasol con 91% MS, 65% NDT, 36% PB, 74% degradabilidad de la proteína = 26.6% PDR) necesario para corregir el déficit proteico de una vaca de cría preñada (395 kg PV) se calcula como:

$$CMS_f = 2\% \text{ PV}$$

$$F = 4.2 - [0.11] * 50 = -1.3$$

$$S = 26.6 - [0.11] * 65 = 19.45$$

$$X2 = 2 * (-1.3) / (-19.45) = 0.13\% \text{ PV} \\ (0.514 \text{ kg MS suplemento})$$

En este ejemplo se debería suministrar en base húmeda 0.565 kg de expeller de girasol/vaca/día (0.514 kg MS / 0.91 = 0.565 kg = 0.14% PV en base húmeda).

Para lograr el máximo consumo de forraje en pastoreo la oferta de pastura por animal debe ser de 2 a 5 veces el máximo consumo esperado de forraje (Hodgson 1990, NRC 1996). Continuando con el ejemplo, si la suplementación es por 60 días, la pastura presenta 2580 kg MS/ha y la oferta deseada es 3 veces superior al consumo voluntario, la carga del potrero se estima como:

$$\text{Oferta} = (2580 \text{ kg MS/ha}) / 60 \text{ días} = 43 \text{ kg MS/ha/día}$$

$$\text{CMSf} = (395 \text{ kg} * 2 \% \text{PV}) / 100 = 7.9 \text{ kg MS/día}$$

$$\text{Demanda} = \text{CMSf} * 3 \text{ veces} = 23.7 \text{ kg MS/día}$$

$$\text{Carga} = \text{Oferta} / \text{Demanda} = 1.84 \text{ vacas/ha}$$

FRECUENCIA EN EL SUMINISTRO DE SUPLEMENTO

Debido a la capacidad de los rumiantes de retener y reciclar el nitrógeno ingerido en la dieta (24), el suministro de su-

plementos proteicos en forma infrecuente generalmente no presentaría desventaja frente al suministro diario cuando se compara a través de la evolución de la ganancia diaria del peso vivo, CC o performance reproductiva (3, 16, 23, 35, 49), pero dada la rápida degradación de las fuentes de NNP, cuando el suplemento posee elevadas cantidades de urea (equivalente proteico aportado por la urea > 15% PDR del suplemento) es conveniente el suministro diario (17, 37).

En general se recomienda suministrar el suplemento proteico diariamente o cada 2 a 3 días (16, 39), por ejemplo si el nivel de suplementación es de 0.5 kg/animal/día y el suministro es cada 3 días, significa que cada 3 días se suministrarán 1.5 kg suplemento/animal (0.5 kg * 3 días = 1.5 kg).

RESPUESTA A LA SUPLEMENTACIÓN PROTEICA

Cuando la proteína es deficiente muchos estudios indican que la suplementación

proteica incrementa el consumo de forraje en un 15 a 45% y algunos estudios han demostrado un incremento de 2 a 5 puntos porcentuales en la digestibilidad del forraje (30), obteniéndose generalmente una eficiencia de conversión de 1.5 a 3 kg de suplemento por kg de ganancia de peso vivo adicional (39, 41). La eficiencia de conversión disminuye a medida que aumenta el nivel de suplementación (41).

Debe quedar claro que la suplementación proteica mejora la performance del ganado alimentado con forrajes de baja calidad principalmente debido a un aumento en el consumo de forraje, si por alguna razón (baja disponibilidad forrajera, adecuado contenido proteico del forraje, alto nivel de suplementación, bajo contenido proteico del suplemento, etc.) el ganado no puede aumentar el consumo de forraje, la suplementación proteica se torna ineficaz y antieconómica (14, 39, 53, 54).

Referencias bibliográficas

1. **Allden, W.** (1981). Energy and protein supplements for grazing livestock. *En*: F. H. W. Morley (Ed.): *Grazing Ruminants*, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, pp. 289 – 307.
2. **Ayala, W; Bermúdez, R.** (2005). "Estrategias de manejo en campos naturales sobre suelos de lomadas en la región este". *En*: Seminario de actualización técnica en manejo de campo natural, INIA, Serie Técnica 151, pp. 41 – 50.
3. **Beaty, J; Cochran, R; Lintzenich, B; Vanzant, E; Morrill, J; Brandt, R; Johnson, D.** (1994). Effect of frequency of supplementation and protein concentration in supplements on performance and digestion characteristics of beef cattle consuming low-quality forages. *J. Anim. Sci.* 72: 2475 – 2486.
4. **Beck, P; Gunter, S; Gadberry, S.** (2005). *Growing cattle on cool-season annual grasses*, University of Arkansas, Cooperative Extension Service.
5. **Bermúdez, R; Ayala, W.** (2005). "Producción de forraje de un campo natural de la zona de lomadas del este". *En*: Seminario de actualización técnica en manejo de campo natural, INIA, Serie Técnica 151, pp. 33 – 39.
6. **Bodine, T; Purvis, H.** (2003). Effects of supplemental energy and/or degradable intake protein on performance, grazing behavior, intake, digestibility, and fecal and blood indices by beef steers grazed on dormant native tallgrass prairie. *J. Anim. Sci.* 81: 304 – 317.
7. **Bodine, T; Purvis, H; Ackerman, C; Goad, C.** (2000). Effects of supplementing prairie hay with corn and soybean meal on intake, digestion, and ruminal measurements by beef steers. *J. Anim. Sci.* 78: 3144 – 3154.
8. **Bowman, J; Sowell, B.** (1997). Delivery method and supplement consumption by grazing ruminants: A review. *J. Anim. Sci.* 75:543-550.
9. **Burns, J.** (1982). "Integration of grazing to other feed resources". *En*: J. B. Hacker (Ed.), *Nutritional limits to animal production from pasture*. Farnham Royal, UK, Commonwealth Agricultural Bureaux, pp 455-471.
10. **Clanton, D. C.** (1978). Non-protein nitrogen in range supplements. *J. Anim. Sci.* 47 :765-779.
11. **Cochran, R; Koster, H; Olson, K; Heldt, J; Mathis, C; Woods, B.** (1998). Supplemental protein sources for grazing beef cattle, Proc. 9th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, University of Florida, Gainesville.
12. **Del Curto, T; Cochran, R; Corah, A; Beharka, A; Vanzant, E; Johnson, D.** (1990b). Supplementation of dormant tallgrass-prairie forage: II. Performance and forage utilization characteristics in grazing beef cattle receiving supplements of different protein concentration. *J. Anim. Sci.* 68: 532 – 542.
13. **Del Curto, T; Cochran, R; Harmon, D; Beharka, A; Jacques, K; Towne, G; Vanzant, E.** (1990a). Supplementation of dormant tallgrass-prairie forage: I. Influence of varying supplemental protein and

- (or) energy levels on forage utilization characteristics of beef steers in confinement. *J. Anim. Sci.* 68: 515 – 531.
14. **Del Curto, T; Hess, B; Huston, J; Olson, K.** (2000). Optimum supplementation strategies for beef cattle consuming low-quality roughages in the western United States, *Proc. of Am. Soc. of Anim. Sci.* 1999.
 15. **Dolberg, F; Finlayson, P.** (1995). Treated straw for beef production in China. *World Animal Review* 82 (1):14.
 16. **Farmer, C; Cochran, R; Simms, D; Klevesahl, E; Wichersahm, T; Johnson, D.** (2001). The effects of several supplementation frequencies on forage use and the performance of beef cattle consuming dormant tallgrass prairie forage. *J. Anim. Sci.* 79: 2276 – 2285.
 17. **Farmer, C; Woods, B; Cochran, R; Heldt, J; Mathis, C; Olson, K; Titgemeyer, E; Wickersham, T.** (2004). Effect of supplementation frequency and supplemental urea level on dormant tallgrass-prairie hay intake and digestion by beef steers and prepartum performance of beef cows grazing dormant tallgrass-prairie. *J. Anim. Sci.* 82: 884 – 894.
 18. **Galyean, M.; y Goetsch, A.** (1993). Utilization of forage fiber by ruminants. *En:* H. G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield, y J. Ralph (Ed.) *Forage cell wall structure and digestibility*, ASA-CSSA-SSSA, Madison, pp. 33-71.
 19. **Hammond, A.** (1992). Use of blood urea nitrogen concentration to guide protein supplementation in cattle, *Proc. 3rd Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*, University of Florida, Gainesville.
 20. **Hammond, A.** (1997).: Update on BUN and MUN as a guide for protein supplementation in cattle, *Proc. 8th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*, University of Florida, Gainesville.
 21. **Heldt, J; Cochran, R; Mathis, C; Woods, B; Olson, K; Titgemeyer, E; Nagaraja, T; Vanzant, E; Johnson, D.** (1999). Effects of level and source of carbohydrate and level of degradable intake protein on intake and digestion of low-quality tallgrass-prairie hay by beef steers. *J. Anim. Sci.* 77: 2846 – 2854.
 22. **Hodgson, J.** (1990).: “Grazing management. Science into Practice”, Longman Handbooks in Agriculture, 201 p.
 23. **Holechek, J; Herbel, C.** (1986). Supplementing range livestock, *Rangelands* 8:29-33.
 24. **Huntington, G; Archibeque, S.** (2000). Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants, *Proc. of Am. Soc. of Anim. Sci.* 1999.
 25. **Klevesahl, E; Cochran, R; Titgemeyer, E; Wickersham, T; Farmer, C; Arroquy, J; Johnson, D.** (2003). Effect of a wide range in the ratio of supplemental rumen degradable protein to starch on utilization of low-quality, grass hay by beef steers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 105: 5 – 20.
 26. **Klopfenstein, T.** (1993). Strategies for predicting the first limitin nutrient for grazing cattle. *Proc. 4th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*, University of Florida, Gainesville.
 27. **Koster, H; Cochran, R; Titgemeyer, E; Vanzant, E; Abdelgadir, I; St-Jean, G.** (1996). Effect of increasing degradable intake protein on intake and digestion of low-quality, tallgrass-prairie forage by beef cows. *J. Anim. Sci.* 74:2473 – 2481.
 28. **Koster, H; Cochran, R; Titgemeyer, E; Vanzant, E; Nagaraja, T; Kreikemeier, K; St. Jean, G.** (1997). Effect of increasing proportion of supplemental nitrogen from urea on intake and utilization of low-quality, tallgrass-prairie forage by beef steers. *J. Anim. Sci.* 75:1393 – 1399.
 29. **Koster, H; Woods, B; Cochran, R; Vanzant, E; Titgemeyer, E; Grieger, D; Olson, K; Stokka, G.** (2002): Effect of increasing proportion of supplemental N from urea in prepartum supplements on range beef cow performance and on forage intake and digestibility by steers fed low-quality forage. *J. Anim. Sci.* 80: 1652 – 1662.
 30. **Kunkle, W; Bates, D.** (1998). Evaluating feed purchasing options: energy, protein, and mineral supplements, *Proc. of the 47th Annual Florida Beef Cattle Short Course*, University of Florida, Gainesville.
 31. **Kunkle, W; Johns, J.; Poore, M; Herd, D.** (2000). Designing supplementation programs for beef cattle fed forage – bases diets, *Proc. of Am. Soc. of Anim. Sci.* 1999.
 32. **Lardy, G; Adams, D; Klopfenstein, T; Patterson, H.** (2004). Building beef cow nutritional programs with the 1996 NRC beef cattle requirements model. *J. Anim. Sci.* 82 (E. Suppl.): E83 – E92.
 33. **Leng, R. ; Jessop, N.; Kanjanapruthipong, J.** (1993). Control of feed intake and the efficiency of utilisation of feed by ruminants. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*, 12:70 – 88.
 34. **Matejovsky, K; Sanson, D.** (1995). Intake and digestion of low-, medium-, and high-quality grass hays by lambs receiving increasing levels of corn supplementation. *J. Anim. Sci.* 73: 2156 – 2163.
 35. **Mathis, C.** (2003). Protein and energy supplementation to beef cows grazing New Mexico rangelands, *New Mexico State University, College of Agriculture and Home Economics, Circular* 564.
 36. **Mathis, C; Cochran, R; Heldt, J; Woods, B; Abdelgadir, I; Olson, K; Titgemeyer, E; Vanzant, E.** (2000). Effects of supplemental degradable intake protein on utilization of medium- to low-quality forages. *J. Anim. Sci.* 78:224 – 232.

37. **Mathis, C; Sawyer, J; Waterman, R.** (2003). Urea in range cattle supplements, New Mexico State University, College of Agriculture and Home Economics, Circular 583.
38. **McCollum, F; Galyean, M.** (1985). Influence of cottonseed meal supplementation on voluntary intake, rumen fermentation and rate of passage of prairie hay in beef steers. *J. Anim. Sci.* 60: 570 – 577.
39. **McCollum, T.** (1997). Supplementation strategies for beef cattle, Texas A & M University System, Texas Agric. Ext. Service, Publ. B – 6067.
40. **McDowell, L. R.** (1992). Minerals in animal and human nutrition, Academic Press, pp. 524.
41. **McLennan, S. ; Poppi, D. ; Gulbransen, B.** (1995). Supplementation to increase growth rates of cattle in the tropics-protein or energy. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*, p. 89 – 96.
42. **Mieres, J.** (2004). Guía para la alimentación de rumiantes, 3ra. Edición, INIA, Serie Técnica 142.
43. **Montossi, F; Pigurina, G; Santamarina, I; Berretta, E.** (2000). “Selectividad animal y valor nutritivo de la dieta de ovinos y vacunos en sistemas ganaderos: teoría y práctica”. INIA, Serie Técnica Nro. 113.
44. **Moore, J.** (1992). Matching protein and energy supplements to forage quality. *Proc. 3rd Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*, University of Florida, Gainesville.
45. **Moore, J; Bowman, J; Kunkle, W.** (1996). Liquid vs. Dry supplements for grazing beef cattle. *Proc. 7th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*, University of Florida, Gainesville.
46. **Moore, J; Brant, M; Kunkle, W; Hopkins, D.** (1999). Effects of supplementation on voluntary forage intake, diet digestibility, and animal performance, *J. Anim. Sci.* 77(Suppl. 2):122-135.
47. **Moore, J; Kunkle, W.** (1995). Improving forage supplementation programs for beef cattle, *Proc. 6th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*, University of Florida, Gainesville.
48. **NRC** (1996). Nutrient requirements of beef cattle. 7th Revised Edition, National Academy Press, 242 p.
49. **Porath, M; Males, J.** (2004). Supplements and supplementation strategies. *En: D. Bohnert, S. Felley, C. Parsons, R. White (Ed.): Beef Cattle Nutrition WorkBook*, Oregon State University, EM 8883 – E, pp. 49 – 56.
50. **Repetto, J.; Cajarville, C.; D’Alessandro, J.; Curbelo, A.; Soto, C.; Garín, D.** (2005). Effect of wilting and ensiling on ruminal degradability of temperate grass and legume mixtures, *Anim. Res.* 54:73–80.
51. **Saldaña, S.** (2005). “Manejo del pastoreo en campos naturales sobre suelos medios de basalto y suelos arenosos de cretácico”. *En: Seminario de actualización técnica en manejo de campo natural*, INIA, Serie Técnica 151, pp. 75 – 84.
52. **Sanson, D.** (1993). Effects of increasing levels of corn or beet pulp on utilization of low-quality creste wheatgrass hay by lambs and in vitro dry matter disappearance of forages. *J. Anim. Sci.* 71: 1615 – 1622.
53. **Siebert, B; Hunter, R.** (1982). “Supplementary feeding of grazing animals”. *En: J. B. Hacker (Ed.), Nutritional limits to animal production from pasture*. Farnham Royal, UK, Commonwealth Agricultural Bureaux, pp 409-426.
54. **Sprinkle, J.** (2000). Protein supplementation, The University of Arizona, Cooperative Extension.
55. **Stafford, S; Cochran, R; Vanzant, E; Fritz, J.** (1996). Evaluation of the potential of supplements to substitute for low-quality, tallgrass-prairie forage. *J. Anim. Sci.* 74: 639 – 647.
56. **Stanton, T.** (1998). Urea and NPN for cattle and sheep, Colorado State University, Cooperative Extension, Bull. No. 1608.
57. **Underwood, E.; Suttle, N.** (1999). The mineral nutrition of livestock, 3rd. Edition, CAB International, pp. 614.

REVISTA DE LA SOCIEDAD DE MEDICINA VETERINARIA DEL URUGUAY

Veterinaria es la revista oficial de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay destinada a publicar artículos en idioma español sobre temas técnicos, científicos y otras comunicaciones referentes a las Ciencias Veterinarias.

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

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES DE TRABAJOS PARA PUBLICACIÓN

Normas generales

Los trabajos se enviarán a la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay, Consejo Editor de la revista Veterinaria, Cerro Largo 1895, CP11200, Montevideo, con un original y dos copias y en diskette (3.5").

La etiqueta del diskette deberá contener el apellido del primer autor, las primeras palabras del artículo y el nombre del procesador de texto utilizado. El texto será archivado en documento Word y no deberá exceder de 20 páginas en formato carta (21,6 x 27,9 cm), escrito en una sola carilla, con margen de 2,5 cm a cada lado y deberá estar escrito con caracteres de 12 puntos, con interlineado doble. Los cuadros y figuras deben ir al final del manuscrito (cada una en hoja aparte). Las figuras deben estar fuera del manuscrito hechas en Excell. Las fotografías o impresiones serán en blanco y negro (con 300 dpi de resolución como mínimo), en un máximo de 5 que serán adjuntadas al original, con leyenda en hoja aparte y numeradas al dorso indicando el borde superior derecho. Las fotografías o ilustraciones en color podrán ser publicadas pero a costo de los autores, no se aceptarán diapositivas.

Los autores solicitarán por nota aparte y con la firma de todos ellos la publicación del trabajo, designando a uno de los mismos para ser enviada la correspondencia (indicando dirección postal completa, teléfono, fax y correo electrónico), dejándose establecido que el mismo no se ha publicado ni se ha remitido a ninguna otra publicación periódica. Se aceptarán trabajos que hubieran sido publicados como resúmenes o comunicaciones cortas en congresos, simposios o jornadas, debiéndose en este caso indicarse en el pie de la primera página del artículo.

Los trabajos recibidos serán evaluados por el Consejo Editor pudiendo darle los destinos siguientes: aceptarlos, devolverlos a los autores para su adecuación o rechazarlos. El Consejo Editor los clasificará en: 1. Trabajo científico (artículo original, revisión) y 2. Trabajo de divulgación (práctica veterinaria, diagnóstico, tecnológico, conferencia). Los autores recibirán 10 separatas.

Los trabajos aceptados para publicación pasan a ser propiedad intelectual de la SMVU quedando los derechos de publicación del trabajo a su cargo. Las reproducciones parciales o totales sólo pueden realizarse con la autorización escrita del editor.

1. Trabajos científicos

Es una publicación que aporta y amplía el conocimiento o la comprensión de un problema determinado y que describe resultados originales que contiene suficiente información como para que otro investigador pueda: evaluar las observaciones, repetir los experimentos y comprobar las conclusiones. Un artículo original requiere rigor científico, expresado con lógica, claridad y precisión, con una extensión en función de los resultados y respaldado por citas bibliográficas imprescindibles. Existirá un arbitraje de estos trabajos que serán evaluados por miembros de un Comité de Arbitros de la revista Veterinaria.

2. Trabajos de divulgación

Son aquellos trabajos que no cumplen con las normas de trabajos científicos originales pero que su contenido es de un interés o seriedad tal que merece su publicación.

El Consejo Editor evaluará el trabajo y lo clasificará según su contenido en: prácticas veterinarias, diagnósticos, tecnológicos, conferencias, educación, u otro según corresponda. También podrán ser publicadas Cartas al Editor de intercambio profesional.

Normas de redacción para Artículos Originales

Contendrán los siguientes elementos:

Título: Será lo más breve posible y conciso, reflejando exactamente lo que el trabajo contiene. Escrito en minúsculas.

Nombre de Autores: apellido, inicial del nombre ¹; otro/s nombres

ejemplo: Vidal, L.¹; Gómez, J.²

dirección:(en pie de página): ejemplo: ¹ Departamento de Bovinos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Suipacha 698, Buenos Aires, Argentina, tel.: (497)3002511, e-mail: vidal@facvet.com; ² Facultad de Veterinaria.

Se detallará solamente la dirección postal completa del autor responsable o correspondiente, para los demás autores solamente el nombre de la institución.

RESUMEN

Dará una idea clara y precisa del contenido, será una versión en miniatura del artículo, conteniendo: objetivos, materiales y métodos, resultados, conclusión. No debe excederse de 200 palabras. Escrito en español en tiempo presente y en un sólo párrafo luego del encabezado del título y los autores.

El resumen con texto en inglés se denominará: Summary.

Palabras clave

El autor propondrá las palabras clave que representen al contenido del texto para una clasificación y búsqueda bibliográfica. Se permitirán hasta 5 (cinco) palabras.

Las mismas palabras en idioma inglés (Key words) serán agregadas para complementar el Summary.

INTRODUCCIÓN

Los autores deben suministrar antecedentes suficientes sobre el tema para que el lector no deba recurrir a otras publicaciones anteriores y para que comprenda la importancia o trascendencia de la investigación que se comunica. Deben referirse al contexto en general (en el mundo, etc.) y en particular (en el país), eligiendo las informaciones más recientes y más relevantes.

Se deben dar los fundamentos científicos del estudio y definir claramente cuál es el propósito de escribir el artículo, precisando en el último párrafo los objetivos del trabajo. Escrito en tiempo presente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los autores deben dar suficientes detalles para que un investigador competente pueda repetir los experimentos y definir el diseño experimental.

Describir claramente los animales utilizados, su número, especie, género, raza, edad.

Describir claramente la marca, modelo y origen (ciudad y país del fabricante) de los equipos utilizados. Los reactivos, drogas o medicamentos deben describirse por su nombre genérico o químico o por marcas comerciales patentadas (que se señalarán al pie de página).

Los métodos y procedimientos deben ser detallados y bibliográficamente referenciados. Deben precisarse con claridad, tiempos, temperaturas, etc. Los métodos de los análisis estadísticos deben señalarse y citarse bibliográficamente.

RESULTADOS

La descripción de los resultados obtenidos debe presentarse con claridad. Primeramente hacer un "pantallazo general" de los resultados experimentales y luego pueden describirse en cuadros (tablas) o figuras (gráficos, dibujos, fotografías) los datos de los experimentos. No deben presentarse datos repetitivos o demasiado extensos y detallistas.

Deben usarse medidas del sistema métrico decimal dentro de lo posible u otras medidas convencionales. Los análisis estadísticos de datos deben señalar su significación.

Debe redactarse en tiempo pasado

DISCUSIÓN

Deben mostrarse las relaciones entre los hechos observados, con las hipótesis del propio experimento y/o con las teorías, resultados o conclusiones de otros autores. Formule las conclusiones en forma clara. Deben aplicarse las referencias bibliográficas al experimento y no abundar en detalles no estudiados.

Deben exponerse la significación de los resultados y evitar las repeticiones.

Escrito en tiempo pasado en tercera persona del singular o plural según corresponda.

CONCLUSIONES

Sé deben dar interpretaciones que sean justificadas por los datos.

Se deben resumir y globalizar las conclusiones parciales que se obtuvieron de diferentes resultados del trabajo. No deben darse conclusiones demasiado generales.

Debe haber una coherencia entre los objetivos, los resultados y las conclusiones, pudiendo sugerirse recomendaciones.

Agradecimientos

Deberá constar el nombre de las personas y la institución a la que pertenecen haciendo mención al motivo del agradecimiento. Debe ser escrito en forma concisa

sa y hacer referencia a materiales o equipos y al apoyo financiero.

Referencias Bibliográficas

En el texto: Al final de cada cita bibliográfica se colocará: el número correspondiente al autor con punto. Si existieran varias citas en el mismo párrafo se citará de la siguiente manera (ej.): (8, 10, 12-14, 22). Si es necesario mencionar un autor en el texto, se escribirá el apellido del 1er. autor entre paréntesis; si los autores fueran dos se colocarán los apellidos de ambos y entre medio el símbolo &. En todos los casos deberá citarse además el número correspondiente a la referencia bibliográfica.

En el ítem de Referencias bibliográficas: Debe hacerse especial atención al texto de las referencias bibliográficas, no se aceptarán trabajos mal referenciados. Las referencias deben colocarse en orden alfabético de autores, numerando las obras citadas y consultadas en el texto. Deberán citarse de la siguiente manera: Apellido seguido de coma y un espacio (,) y luego la(s) inicial(es) seguida(s) de un punto (.). Ej.: González, R.. Si hubieran varios autores deben separarse entre sí por un punto y coma (;). A continuación, se colocará el año de la publicación entre paréntesis. Ejemplo: González, R.; López, A. (1989). Más de una referencia del mismo autor se ordenará en orden cronológico decreciente.

Después del año se escribirá el título del artículo terminado en punto. Las revistas científicas serán citadas según las abreviaturas convencionales, ej.: Am.J.Vet.Res. o el nombre completo de la revista, seguido por el volumen, el número entre paréntesis, seguido por los números de páginas precedidos por dos puntos, ejemplos: 12:44-48. ó también: 12(8):44-48. Ejemplo: González, R.; López, A. (1989) Paraqueratosis en suínos. Am.J.Vet.Res. 12(8):44-48.

En el caso de la cita de libros, se indicará Autores (Año) Título, n° de edición (salvo la 1ra.), Lugar de edición, Editorial, Cantidad de páginas del libro. Ejemplo: Rosemberger, G. (1983) Enfermedades de los bovinos. 2a. ed. Berlín, Ed. Paul Parey, 577 p.

En el caso de la cita de capítulo de libros, se indicará Autores (Año) Título del capítulo, In: Autores (editores) del libro, Título del libro, Edición, Lugar de edición, Editor, Páginas inicial y final del capítulo precedido por pp y entre guión. Ejemplo: Dirksen, G. (1983) Enfermedades del aparato digestivo. En: Rosemberger, G. Enfermedades de los bovinos. 2a. ed. Berlín, Ed. Paul Parey, pp. 235-242.

En la cita de congresos: Autores (Año) Título del artículo. Nombre del congreso.

Número ordinal del congreso, Ciudad, País, páginas.

En la cita de una tesis: Autores (Año) Título de la tesis. Tipo de tesis (ej.: doctor veterinario), Institución, Ciudad, País.

En la cita de comunicaciones personales: se cita el Nombre (apellido, inicial del nombre) (Año), se hace una llamada y se cita al pie de página con el texto: Comunicacion personal. No citar en las referencias bibliográficas.

Cuadros

Los cuadros deben tener un n° de identificación correlativo que figurará en el texto y contendrán un texto de título en la parte superior. Deben contener información sobre el experimento que lo autodefinen. Las referencias o símbolos de los cuadros se presentarán al pie del mismo en letra cursiva de tamaño 10 puntos. Ejemplo: Cuadro I. Variación de la temperatura en función del tiempo., Ejemplo de pie de cuadro: T = temperatura, t = tiempo (en minutos). Si el cuadro no es original, citar la fuente (Autor y año) en pie de página.

Figuras y Gráficos

Las figuras o gráficos deben tener un n° de identificación correlativo que corresponda con el texto y contener un texto de definición del contenido en la parte inferior, con leyendas y definición de los símbolos utilizados. Si la figura o gráfico no es original, citar la fuente (Autor y año) en pie de página.

Fotos

Las fotografías y especialmente las microfotografías deben contener una escala de referencia. Deben tener un n° de identificación correlativo que corresponda con el texto y contener un texto de definición del contenido en la parte inferior, con leyendas y definición de los símbolos utilizados. Si la fotografía no es original, citar la fuente (Autor y año) en pie de página.

Normas de redacción para Revisiones

Es un trabajo científico con el objetivo de efectuar una revisión o recapitulación actualizada de los conocimientos presentando una evaluación crítica de la literatura publicada según la perspectiva del autor. Este tipo de trabajo permite una mayor discrecionalidad en la presentación de la organización pero debe mantener rigor científico. Deberán describirse los objetivos y el alcance que se pretende lograr. La cita de bibliografía será la misma que la de los artículos originales.