



## Molecular Diagnosis of Cattle Hereditary Diseases in Uruguay

Kelly, L.<sup>1</sup>, Dutra, F.<sup>3</sup>, Llambí, S.<sup>2</sup>, Rivero, R.<sup>3</sup>, Moraes, J.<sup>4</sup>, Trenchi, G.<sup>1</sup>, D'Agosto, S.<sup>1</sup>, Peraza, P.<sup>1</sup>, Ravagnolo, O.<sup>1</sup>, Dalla Rizza, M.<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se presenta una revisión sobre enfermedades hereditarias letales descritas en nuestro país con énfasis en aquellas que han sido confirmadas por diagnóstico anatomopatológico y molecular. Las enfermedades congénitas y/o hereditarias observadas por el DILAVE para la región Este de nuestro país, se estiman entre un 3% a 9% de morbilidad en el período de 2009 a 2011. Se discute la pertinencia y relevancia de realizar su control considerando la actual legislación uruguaya con el fin de detectar animales portadores sanos y disminuir las pérdidas por mortandad. Se concluye que las enfermedades genéticas son de una importancia considerable en los sistemas productivos comerciales siendo una oportunidad de mejora en nuestros rodeos.

**Palabras claves:** *enfermedades hereditarias bovinas, diagnóstico molecular*

### SUMMARY

This review presents information about lethal hereditary diseases described in Uruguay, with emphasis on those that have been confirmed pathologically and by molecular diagnostics. Congenital and / or hereditary diseases observed by DILAVE for the eastern region of our country are estimated to be 3% - 9% in the period 2009-2011. We discuss the relevance and importance of controlling these diseases considering the current Uruguayan legislation to detect healthy carrier animals and reduce death losses. We conclude that genetic diseases have a considerable importance in commercial production systems being an opportunity for improvement in our herds.

**Keywords:** *bovine Inherited diseases, molecular diagnostics*

### INTRODUCCIÓN

A nivel mundial se han descrito numerosas enfermedades hereditarias letales (EHL) que afectan la producción en bovinos (Gentile y Testoni, 2006; Giovambattista y Garcia, 2010), muchas de las cuales se detectan a través de diagnósticos moleculares. La Sociedad Internacional de Genética Animal fundada en 1972 (ISAG: <http://www.isag.us/index.asp?autotry=true&ULnotkn=true> (22/08/12) realiza pruebas comparativas internacionales remitiendo a los laboratorios que son miembros de dicha Sociedad, muestras de ADN bovino con el fin de hacer el test de comparación internacional para EHL y marcadores moleculares.

Actualmente existen varias EHL que se han diseminado por el mundo a través del semen (Cuadro 1) y el uso intensivo de reproductores que son portadores sanos que al cruzarse aumentan la mortalidad y por ende afectan la producción animal.

En nuestro país la morbilidad causada por enfermedades congénitas y/o hereditarias han sido descritas por Archivo Veterinario del Este pertenecientes a la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE: <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Dilave.htm>) desde el año 2009 (Dutra y col., 2009, 2010, 2011).

En nuestro país se han detectado enfermedades genéticas en razas de bovinos mediante sintomatología clínica, necropsias y histopatología. Sin embargo estas técnicas no permiten identificar animales portadores sanos que transmiten el alelo letal recesivo y diseminan las EHL que se manifiestan luego de varias generaciones de endocria (Dutra y Baroni, 2007; Dutra y Castro, 2007; Dutra y Lussich, 2007; Rivero y col., 2011). Actualmente con el desarrollo de la biotecnología es posible identificar mediante técnicas moleculares, animales portadores asintomáticos de genes letales. Además debemos considerar que existen otras patologías genéticas como las alteraciones cromosómicas producidas durante la formación de los gametos y se transmiten a las siguientes generaciones disminuyendo la tasa de preñez. Algunas enfermedades congénitas son producidas por mutaciones que ocurren durante el desarrollo embrionario de las células somáticas, naciendo animales con malformaciones letales que no dejan descendencia. También existen EHL como el Síndrome de malformación vertebral (CMV) cuyo diagnóstico es difícil de realizar dado que las malformaciones vertebrales pueden confundirse con otras malformaciones congénitas. También existen casos como la deficiencia de la enzima uridina monofosfato sintetasa (DUMPS) causada por una mutación letal que es esencial

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA Las Brujas. Ruta 48 km10, Rincón del Colorado, Canelones-Uruguay.

Correo electrónico: gokellyster@gmail.com.

<sup>2</sup>Área Genética. Departamento de genética y Mejoramiento Animal. Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

<sup>3</sup>DILAVE «Miguel C. Rubino». Laboratorio Regional Este. Treinta y Tres-Uruguay.

<sup>4</sup>Departamento de Salud en los Sistemas Pecuarios, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay.

Recibido: 4/5/12 Aprobado: 13/8/12

**Cuadro 1.** Descripción de los genotipos (sanos y portadores) según la nomenclatura utilizada internacionalmente (código genético) para las EHL descritas en las razas Holstein, RedAngus y Hereford (página de internet de los criadores).

| Enfermedades hereditarias letales   |       |            | Enfermedades hereditarias letales |       |                  |
|-------------------------------------|-------|------------|-----------------------------------|-------|------------------|
| Genotipos                           |       |            | Genotipos                         |       |                  |
| HOLSTEIN*                           | Sanos | Portadores | REDANGUS**                        | Sanos | Portadores       |
| Brachyspina                         | TY    | BY         |                                   |       | NH               |
| BLAD                                | TL    | BL         | Hidrocéfalo Neuropático           |       |                  |
| Complejo de Malformación Vertebral. | TV    | CV         | Osteopetrosis                     |       | OS               |
| DUMPs                               | TD    | DP         | Hipoplasia Pulmonar con Anasarca  |       | PH               |
| Pie de Mula                         | TM    | MF         | Protoporfira                      |       | PR               |
| REDANGUS**                          |       |            | Sindactilia (Pie de Mula)         |       | MF               |
|                                     |       |            | HEREFORD***                       |       |                  |
| Arthrogryposis Multiplex            |       | AM         | Hipotricosis (Alopecia)           |       | S/N <sup>1</sup> |
| Contractural Arachnodactyly         |       | CA         | Dilución del color de pelo.       |       | S/N              |
| Double Musculatura                  |       | DM         | Epilepsia Idiopática              |       | S/N              |
| Dwarfism (enanismo)                 |       | DW         | Epidermiolisis Bullosa            |       | S/N              |
| Hypotrichosis                       |       | HY         | MSUD 248                          |       | S/N              |
| Alpha-Mannosidosis                  |       | MA         | Cardiomiopatía de Pelo Crespo.    |       | S/N              |
| Hemimelia Tibial                    |       | TH         | VARIAS RAZAS                      |       |                  |
|                                     |       |            | Citrulinemia                      |       | S/N              |

1: S/N= Sin Nomenclatura  
Pagina web:  
\*Holstein Frisian: [http://www.holsteinusa.com/pedigree\\_info/genetic\\_codes\\_traits.html](http://www.holsteinusa.com/pedigree_info/genetic_codes_traits.html)  
\*\*Angus: <http://redangus.org/genetics/defects/OS>  
\*\*\*Hereford: <http://www.hereford.org/>

para la formación de los nucleótidos de pirimidina que es requerida en gran cantidad durante el desarrollo embrionario. En este caso el embrión muere *in utero* alrededor de los 40 días de gestación produciendo un retorno al servicio de las vacas portadoras (Schwenger y col., 1993). Los portadores son fenotípicamente normales, pero al tener una disminución de la actividad normal de la enzima uridina monofosfato sintetasa deben realizarse más servicios por parto (3,1) en vez de 2 servicios cuando se cruzan individuos normales (Harden y Robinson, 1987).

En resumen, en animales domésticos es difícil determinar si una malformación congénita es de origen genético, ambiental o la combinación de ambas. A continuación se diferencian las causas que producen dichas enfermedades según Legates y Warwick, (1992) y Nicholas, (1990).

Para que una enfermedad sea considerada hereditaria se deben cumplir los siguientes requisitos:

- 1- Aparecer con más frecuencia en rodeos consanguíneos donde los individuos de la progenie están emparentados y vinculados a una genealogía, ya que hay un incremento de individuos homocigotos para el gen recesivo debido a la endocria.
- 2- El carácter anormal suele aparecer en más de una temporada aunqu las condiciones ambientales hallan cambiado.

Para determinar si una enfermedad es hereditaria se deben realizar los siguientes pasos:

- 1- En caso de que exista una mayor incidencia de un defecto o enfermedad en una familia o una raza, se debe comprobar mediante un análisis de segregación entre las diferentes generaciones realizando una genealogía para determinar que la enfermedad se trasmite a los miembros de dicha familia.
- 2- Las variaciones entre y dentro de las razas en la contribución genética no indica necesariamente que sean producidas por diferentes genes, sino que puede ser debido a que presentan diferente frecuencia génica del alelo deletéreo entre las razas o familias según el grado de endocria.
- 3- En el caso que la enfermedad sea similar en otra especie o raza es muy probable que se deba a la misma mutación (ej. Alfa Manosidosis en humanos y bovinos), pero existen algunos casos que dicha enfermedad presenta mutaciones diferentes en el mismo gen para una EHL en una misma raza o especie. A esto se le llama heterogeneidad genética como veremos en ciertos casos presentados en el artículo como el Síndrome neuroaxial en bovinos.
- 4- Para descartar otras causas, se debe determinar si la enfermedad está asociada a causas ambientales como la alimentación

deficiente de la madre y/o cría, infecciones víricas, plantas tóxicas o estrés ambiental. En caso de mejorar dichas condiciones (ración, ambiente), y si la enfermedad no recurre, se puede concluir que la causa probablemente era ambiental.

5- En caso que se presente una sola vez y en raras ocasiones, la malformación se puede deber a alteraciones en el desarrollo.

A continuación se describen las EHL cuyo diagnóstico molecular ha sido desarrollado en nuestro país. En razas de bovinos de leche se han diagnosticado: BLAD (Llambí y col., 2003; Llambí y col., 2007; <http://enfermedadeshereditariasderumiantes.blogspot.com/>) y Citrulinemia (Llambí, 2002; Kelly y col., 2010), y en razas de bovinos de carne: MSUD 248 (Kelly y col., 2008), Alfa Manosidosis I (Kelly y col., 2010; Rivero y col., 2011), Epidermolisis Bullosa (Kelly y col., 2010) y Osteopetrosis (Dutra y col., 2011). La mayoría de estas EHL son recesivas y actualmente se detectan los portadores con técnicas moleculares. También se han descrito enfermedades poligénicas o recesivas ligadas al sexo como la Displasia u osteoartrosis de cadera en bovinos Hereford machos (toros y novillos) (Bellenger, 1971; Berg y col., 1997; Carnahan y col., 1968; Dutra, 1995).

En la actualidad, en el mundo hay descritas 397 EHL en bovinos según la base de datos gestionada por NCBI-OMIA (On line Mendelian Inheritance in Animals, <http://omia.angis.org.au>) de las cuales 145 son producidas por mutaciones de uno o más genes y se ha identificado la mutación en 78 de estas, permitiendo desarrollar el diagnóstico molecular. Existen asociaciones de criadores de razas (como Angus **Association USA** y **Holstein Association USA**) que publican en internet los animales de pedigrí portadores de genes deletéreos ([http://www.holsteinusa.com/pedigree\\_info/genetic\\_codes\\_traits.html](http://www.holsteinusa.com/pedigree_info/genetic_codes_traits.html); <http://redangus.org/genetics/defects/OS>) (30/8/12). En el Cuadro 1 se resumen la nomenclatura genética que utilizan dichas asociaciones para las EHL presentes en cada raza estudiada.

A continuación se describen las enfermedades hereditarias que han sido diagnosticadas en Uruguay y la frecuencia genética (Cuadro 2) de las muestras analizadas (pertenecientes a individuos de rodeos afectados).

**Cuadro 2.** Descripción de las muestras analizadas molecularmente. Número, procedencia y raza según EHL estudiadas. Detalle de los resultados: portadores calculados como:  $2pq$  siendo  $p$ = fr. génica del alelo normal y  $q$ = frecuencia génica del alelo letal.

| EHL           | Muestra | Depto.      | Raza      | Fr. genotípica de portadores | Fr. génica del alelo letal (q) | Ref. |
|---------------|---------|-------------|-----------|------------------------------|--------------------------------|------|
| Alfa          | 7       | Paysandú    | Braford   | 0,452(MA)                    | 0,345                          | 34   |
| Manosidosis   |         |             | xLimousin |                              |                                |      |
| MSUD 248      | 14      | Lavalleja   | Hereford  | 0,357                        | 0,459                          | 35   |
| E.Bullosa     | 3       | Cerro Largo | Hereford  | -                            | -                              | 34   |
| BLAD          | 253     | Colonia     | Holando   | (BL) 0,162                   | 0,08                           | 34   |
| Osteopetrosis | 116     | Rocha       | Angus     | 0,398                        | 0,075                          | 47   |
| C.M.P.P.C.    | 70      | CerroLargo  | Hereford  | 0,387                        | 0,068                          | 17   |
|               | 80      | Cerro Largo | Hereford  | 0,364                        | 0,057                          |      |
|               |         | Lavalleja   |           | 0,314                        | 0,038                          |      |

EHL: enfermedades Hereditarias Letales.  
BL: portadores del BLAD.  
MA: portadores de la Alfa-Manosidosis.  
C.M.P.P.C.: cardiomiopatía de Pelo Crespo.

### 1 - BLAD (DEFICIENCIA EN LA ADHESIÓN LEUCOCITARIA BOVINA) (OMIA 000595-9913)

El BLAD es una EHL que produce infecciones bacterianas recurrentes con muerte prematura en terneros de 2 a 8 meses de edad (Gerardi, 1996), siendo un problema en el tambo por las infecciones inespecíficas que presentan los terneros. La etiología es la Deficiencia en la Adhesión Leucocitaria Bovina de tipo I. Es una mutación autosómica recesiva que fue descrita por primera vez por Shuster y col. (1992) quien demostró que la enfermedad se debía a una mutación sin sentido en el gen CD18 que codifica una glicoproteína de membrana del leucocito llamada beta-2 integrina. Esta familia de glicoproteínas son moléculas de adhesión leucocitaria que permiten el pasaje de las células de defensa del sistema vascular al sitio de infección. Las células leucocitarias (neutrófilos) de los terneros homocigotos para el gen CD18 (padre y madre portadores heterocigotos) no pueden realizar la migración ni la fagocitosis. En la raza Holando la enfermedad es producida por la sustitución de un aminoácido por otro en la posición 128 de la proteína. Esta sustitución se produce por la mutación Adenina (A) a Guanina (G) en el exón 4 produciéndose un cambio del aminoácido ácido aspártico por glicina en dicha proteína. Kehrli y col. (1992) desarrollaron un diagnóstico molecular utilizando la técnica de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) para identificar el alelo mutado del alelo normal permitiendo detectar así animales portadores de BLAD (Cuadros 1 y 2). Esta técnica en nuestro país fue descrita por primera vez en bovinos Holando (Llambí y col., 2003) por la amplificación de la región del gen CD18 donde se localiza la mutación. Posteriormente una enzima de restricción (Taq I) reconoce la mutación y corta en ese sitio exacto, permitiendo distinguir el alelo mutado del normal según la relación de tamaño y peso molecular dependiendo del largo en pares de bases (pb) del o los fragmentos resultantes.

En el ganado de raza Holando de Uruguay, se estudiaron 15 establecimientos lecheros (N=138) que se dividieron en tres grupos: 1) 104 vacas seleccionadas al azar; 2) 15 toros (14 toros nacionales y 1 toro importado); 3) 19 terneros (11 pertenecien-

tes a la progenie de un toro portador de BLAD). En los grupos se obtuvo una frecuencia de portadores de BLAD de 0.96%, 13.30% y 36.84% respectivamente (Llambí y col., 2007). Posteriormente se realizó un estudio en un tambo del departamento de Colonia en 253 vacas Holando encontrándose 0,79% portadores del BLAD (Kelly y col., 2010), confirmando la presencia de esta enfermedad el país (Cuadro 2).

## 2 - SÍNDROMES DE MIOCLONIAS CONGÉNITAS

La mioclonía congénita es un síndrome letal y hereditario de bovinos de razas de carne que se caracteriza porque los terneros presentan sintomatología nerviosa al nacer (Healy y col., 2002). La afección puede deberse a tres mutaciones diferentes que están presentes en dos genes distintos: el gen de la BCKDHA (branched chain keto dehydrogenase acid E1 beta) o el gen de la subunidad alfa-1 del receptor de la glicina (GLRA 1). El gen BCKDHA presenta heterogeneidad genética dado que dicha EHL puede deberse a dos mutaciones diferentes de un mismo gen en la posición 248 o 1380. Esta enfermedad produce el **MSUD** (Maple Syrup Urine Disease) o Enfermedad de la orina con olor a Jarabe de Arce. La otra mutación se produce en el gen de la subunidad alfa-1 del receptor de la glicina denominado GLRA 1 en la posición 156 del exón 2 y es causa de la **Mioclonía congénita hereditaria o ICM**. Ambas enfermedades son muy similares y pueden presentarse simultáneamente en el mismo rodeo (Healy y col., 2002) por lo cual se requiere realizar un diagnóstico diferencial mediante técnicas moleculares.

### 2.1 - MSUD (Enfermedad de la Orina con Olor a Jarabe de Arce) (OMIA 000627-9913)

El MSUD se presenta en terneros Hereford y Shorthorn y las características clínicas son idénticas, produciéndose una enfermedad neurológica rápida y progresiva terminando con la muerte a los pocos días de nacer. Los síntomas son: incapacidad para levantarse, hiperestesia, rigidez muscular y espasmos de los músculos extensores. Estas EHL se producen en los genes del ADN mitocondrial denominándose encefalomiopatías mitocondriales que afectan la fosforilación oxidativa (Rubio y Verdecia, 2004). Se caracterizan por afectar las células que requieren más energía en el organismo como son las neuronas, las células musculares y cardíacas. Las neuronas son particularmente sensibles a la disfunción mitocondrial debido a que afecta la fosforilación oxidativa pues la mitocondria no le provee de ATP, alterando la modulación de la excitabilidad neural y la transmisión sináptica. La disfunción de las mitocondrias por estrés oxidativo puede generar convulsiones epilépticas, encefalopatía, afectan los músculos y otros órganos (Rubio y Verdecia, 2004).

La enzima mitocondrial BCKADH interviene en el metabolismo de los aminoácidos ramificados esenciales. Esta enzima tiene 4 subunidades  $\alpha$ E1,  $\beta$ E1, E2 y E3 que son codificados por diferentes genes. El MSUD se produce por la deficiencia en la subunidad  $\beta$ E1 de dicha enzima lo que aumenta la concentración en sangre y tejidos de los precursores de los aminoácidos: valina, leucina e isoleucina. Esta EHL fue descrita por Harper y col. (1986) y Healy y col. (2002) en terneros Hereford y Shorthorn respectivamente. La base molecular en Hereford es una muta-

ción sin sentido (posición: 248, mutación: C → T) que ocasiona la terminación prematura de la síntesis de esta proteína. En Shorthorn la mutación sin sentido ocurre en otra posición del mismo gen: 1380 de C → T (Zhang y col., 1990). El diagnóstico molecular fue desarrollado por Dennis y Healy (1999) para la detección de las dos mutaciones mediante la técnica de PCR-RFLP.

En el Uruguay se realizó el diagnóstico de esta enfermedad por primera vez por Dutra y Lussich (2007). Posteriormente Kelly y col. (2008) analizaron las muestras remitidas por el Laboratorio Regional Este de la DILAVE «Miguel C. Rubino» determinando la mutación MSUD 248 en 5 portadoras de las 14 vacas madres de los terneros Hereford afectados. El diagnóstico molecular se realizó con la técnica de PCR/RFLP descritas por Dennis y Healy (1999) y Healy y col. (2002) Cuadro 2.

### 2.2 - ICM o Mioclonía congénita hereditaria (OMIA: 000689-9913)

Esta EHL se presenta en terneros Polled Hereford y se caracteriza por presentar hiperestesia, mioclonias tetaniformes que ocurren espontáneamente o como respuesta a estímulos sensoriales (visual, táctil y auditivo), pérdida del tono muscular y espasticidad (Dutra y Lussich, 2007). También produce signos nerviosos en terneros *in útero* o a los pocos minutos de nacer. Los animales suelen morir por apnea o parálisis de los músculos respiratorios. Los síntomas se producen por una falla de la inhibición espinal de la sinapsis en los receptores de la glicina en la médula espinal (GLRA 1). La glicina es un neurotransmisor inhibidor del sistema nervioso central de los mamíferos que controla las funciones motoras y sensoriales de la médula espinal (Pierce y col., 2001). La mutación del GLRA 1 cambia en el DNA de C → A en la posición 156 del exón 2 en la posición 24 del gen autosómico que codifica la subunidad alfa-1 de dicho receptor de la glicina produciendo un codón stop y terminación prematura del mismo. Al perder la función inhibitoria de dicho neurotransmisor de la médula espinal se pierde el control de las funciones nerviosas presentando los síntomas descriptos.

### 3 - Alfa Manosidosis (OMIA: 000625-9913)

La manosidosis también puede simbolizarse como MAN2B1 por (Mannosidase alpha class 2B member 1). Los síntomas se presentan en terneros de 3 a 6 meses de edad con sintomatología nerviosa como ataxia, convulsiones, anorexia y dejan de mamar. Presentan postura con los miembros abiertos, marcha con dificultad de apoyo, incoordinación, decúbito esternal y muerte (Rivero y col. 2001).

La mutación de la  $\alpha$ -manosidasa bovina es equivalente a la enfermedad humana Manosidosis Alfa B (OMIM: 248500); la misma se produce por el almacenamiento lisosomal debido al déficit de la enzima  $\alpha$ -manosidasa que produce la acumulación de oligosacáridos ricos en manosa en los lisosomas.

En el Uruguay se diagnóstico por primera vez por Rivero y col. (2001) en novillos de la raza Aberdeen Angus, encontrándose con el método lectinohistoquímico que los animales afectados tenían lesiones coincidentes con una  $\alpha$ -manosidosis en el bulbo raquídeo, cerebelo y medula espinal. Esta técnica se realizó mediante el análisis de la actividad enzimática de la  $\alpha$ -manosi-

dasas cuya actividad en los heterocigotos estaba disminuida hasta en un 40% con respecto al homocigoto normal (Healy, 1981). Sin embargo existían variaciones en la actividad enzimática entre los individuos portadores lo que dificultaba diferenciar entre bovinos portadores y normales (Jolly y col., 1974). Posteriormente se determinó la mutación del gen que codifica la enzima ámanosidasa presentándose heterogeneidad genética pues existen diferentes mutaciones en el gen de la  $\alpha$ -manosidasa bovina que son específicas de razas: en la raza Galloway la mutación está en la posición 622 y cambia el nucleótido G por A y en las razas Aberdeen Angus, Murray Grey y Brangus la mutación está en la posición 961 y cambia el nucleótido T por C (Tollersrud y col., 1997). En ese año, se desarrolla la técnica molecular de PCR-RFLP que diferencia claramente los animales portadores de los sanos (Berg y col., 1997). Esta técnica molecular fue posteriormente puesta a punto en nuestro país (Kelly y col., 2010) confirmando su presencia en cruces Bradford-Limousin (Cuadro 2). Actualmente en la página de la Asociación de Criadores Red Angus de USA el número de portadores de Alpha-Mannosidosis es de 188 <http://redangus.org/genetics/defects/list/carrier/MA>

#### 4 - EPIDERMOLISIS BULLOSA (OMIA: 000340-9913)

La Epidermolisis Bullosa (EB) ha sido descrita en varias razas de bovinos, incluyendo Simmental, Jersey y Holando, y en diferentes especies: humanos, bovinos, ovinos, caninos, felinos y equinos (Agerholm, 1994; Ford y col., 2005).

En el Uruguay, se diagnosticó macro y microscópicamente como EB de tipo simple en terneros Hereford recién nacidos (Dutra y Baroni, 2007). Los síntomas son: fragilidad de la piel y mucosas que se desprenden en grandes extensiones ante el menor trauma, con lesiones muy severas en la piel y de otros tejidos llevando a la muerte del animal al poco tiempo de nacer. Las lesiones son particularmente severas en los extremos distales de los miembros en los que se observa ulceraciones extensas, con desprendimiento del rodete coronario y exungulación en los casos más severos («enfermedad de las patas rojas») (Dutra y Baroni, 2007). Histológicamente es una patología caracterizada por la separación de la piel a nivel de la membrana basal de la epidermis (Agerholm, 1994).

La enfermedad es producida por una mutación del gen KRT5: keratina 5 (Ford y col., 2005) con herencia autosómica recesiva. La mutación sustituye una base G por A en la secuencia del gen en la posición 4051 que cambia el aminoácido ácido glutámico por lisina en la posición 478 al final del dominio de la Keratina (E478K). El diagnóstico molecular identificó dicha mutación en los animales Hereford remitidos por el DILAVE Treinta y Tres (Cuadro 2) (Kelly y col., 2010).

#### 5 - OSTEOPETROSIS (OS) (OMIA 000755-9913)

La osteopetrosis, también llamada Marble Bone Disease o Enfermedad de los Huesos de Mármol, es un trastorno del esqueleto de los seres humanos y animales que se caracteriza por la formación de huesos densos, debido a la deficiencia en el número y/o función de resorción ósea de los osteoclastos. Se caracteriza histopatológicamente por la acumulación de hueso endocranal en el espacio medular, malformaciones en el modelado y

remodelado del esqueleto (Dutra y col., 2012; Greene y col., 1974; Leipold y col., 1970; Leipold y col., 1977).

Los terneros afectados genéticamente suelen ser abortados al final de la gestación, nacen prematuros o mueren pocas horas después de nacer. Presentan deformidades del cráneo con frente abovedada, deformación de huesos de la cara, braquignatismo inferior, impactación de molares, protrusión de la lengua y ausencia de médula ósea en los huesos largos (enfermedad de huesos de mármol).

En bovinos Aberdeen Angus la Osteopetrosis puede ser inducida tanto por un defecto hereditario recesivo como por la infección transplacentaria del virus de la diarrea viral bovina, aunque morfológicamente ambas enfermedades son diferentes (Scruggs y col., 1995; Wight-Carter, 2006). Esta EHL se presenta en las razas: Hereford (Leipold, 1977) y Simmental (Thompson, 2007), Aberdeen Angus negro y en Red Angus. Se produce por una mutación autosómica recesiva del gen SLC4A2 (solute carrier family 4, anion exchanger, member 2) que codifica una proteína que interviene en el intercambio de aniones necesario para la función apropiada de los osteoclastos. El gen SLC4A2 presenta una sustitución en la posición 4164 en la secuencia genómica cambiando el nucleótido G por A, produciendo un cambio en el codón y su posterior traducción aminoacídica del aminoácido ácido Glutámico a Lisina (básico) con pérdida de su función induciendo a la muerte celular prematura por la alcalinización citoplasmática de los osteoclastos. El diagnóstico molecular se realiza mediante una reacción de PCR que permite la amplificación diferencial del alelo normal y del mutante utilizando un trío de cebadores (Meyers y col., 2010).

En el Uruguay se reportó esta EHL por primera vez en terneros Angus negro y colorado en 2 rodeos de cría (Quinteros y col. 2011). Se confirmó mediante diagnóstico molecular de Osteopetrosis en el Laboratorio IGENITY de Canadá (Cuadro 2). De acuerdo a estos autores probablemente la osteopetrosis ingresó al país por la importación de semen de toros Red Angus americanos portadores, los cuales se han utilizados en Uruguay ([www.redangus.org/node/215](http://www.redangus.org/node/215)). Los casos se presentaron en predios comerciales donde se realizaban cruzamiento entre parientes (Dutra y col., 2012).

#### 6) CARDIOMIOPATÍA CONGÉNITA ASOCIADA AL PELAJE CRESPO (OMIA 000161-9913)

El síndrome de miocardiopatía con pelaje lanoso (CMPPC) del ganado Hereford es una enfermedad letal, autosómica recesiva. Los terneros al nacer presentan la enfermedad con los siguientes síntomas: pelaje denso, enulado o rizado. A los pocos días presentan dificultad respiratoria, arritmias ventriculares, intolerancia al calor y muerte cardíaca súbita, a veces inmediatamente después de un ejercicio. Algunos tienen la frente abovedada, exoftalmia, corrimiento ocular seroso y desarrollan una ulceración y queratitis en los primeros días del nacimiento. Esta EHL fue diagnosticada por primera vez en 1967 en Australia (Acland y Cook, 1969), presentando los neonatos en el útero fibrosis miocárdica y muerte temprana dentro de las primeras doce semanas de vida (Cook, 1981). Al nacer presentan cambios

cardíacos y del pelaje, desarrollando en algunos casos queratitis neonatal.

En el Uruguay se diagnostica por primera vez la CMPPC en Hereford (Dutra y col., 2011), observando que la mayoría de los animales murieron dentro de los 7 días de haber nacido. La necropsia en 4 terneros sacrificados mostró marcada cardiomegalia con hipertrofia de cardiomiocitos, desorganización en la arquitectura de las fibras miocárdicas y fibrosis intersticial leve, en la piel los folículos pilosos estaban distorsionados. La enfermedad fue diagnosticada en una cabaña de Cerro Largo y en un predio comercial de Lavalleya donde usaban toros de pedigrí de diferentes líneas de sangre. Los animales afectados que nacieron en la cabaña fueron del 5,71% y en el predio comercial del 3,75%. En el caso de Lavalleya las frecuencias para los portadores es de 31,4% y los que manifiestan la EHL son 3,8% o sea que los enfermos CMPPC son 6,3 veces menos que los portadores sanos (Cuadro 2). Los autores concluyen que la Cardiomiopatía asociada al pelaje crespado tiene una incidencia relativamente alta en la raza Hereford de Uruguay.

## DISCUSIÓN

El 31 de agosto de 2008 en el Uruguay se modificó el Artículo 14 de la Ley 18.341 en el cual se incluyó la verificación del mérito genético de los reproductores bovinos mediante la aplicación de nuevas tecnologías para acceder a exenciones tributarias. Textualmente se transcribe dicho artículo: *«Los gastos que se incurran para la incorporación de material genético animal, a saber reproductores (machos y hembras) embriones, semen y cualquier otro producto resultante de la aplicación de nuevas tecnologías, siempre que se disponga de un medio de verificación válido que compruebe objetivamente el mérito genético, y que este haya sido generado o certificado por instituciones públicas o personas jurídicas de derecho público no estatal.* La instrumentación de su ejecución permitirá valorar objetivamente el mérito genético de los animales con el fin de evitar vicios redhibitorios (Código Rural, Cap. V) como el caso de aquellos reproductores portadores de enfermedades hereditarias recesivas. Sin embargo dicho artículo aún no se ha reglamentado a pesar de la presencia de varias EHL en nuestro país y su repercusión en la producción nacional. Dicha ley incentivaría a las cabañas y ganaderos a la adopción de nuevas tecnologías -como es el diagnóstico molecular para determinar portadores de EHL- cuyo costo sería deducido de los impuestos agropecuarios. Además de disminuir las pérdidas económicas por mortandad perinatal, éstas técnicas permitiría detectar genes deletéreos en los portadores sanos con un método confiable, validado internacionalmente en semen, embriones y reproductores. Dado que se requieren dos alelos recesivos en el genotipo para el nacimiento de animales con EHL se requiere 2 intervalos generacionales (Cardellino y Rovira, 1987) o sea de 8 a 12 años para que se aparezcan portadores de nuevas EHL (Cuadro 1) que lleve a un incremento de la morbilidad total actual (3 a 9%) en bovinos. El uso de pocos toros «elite» y la posibilidad de difundir animales a nivel internacional gracias a la inseminación artificial, puede llevar a un incremento en la endocría que llevaría a un incremento de las EHL de no ser consideradas al momento de seleccionar dichos reproductores. En el caso de la raza Holstein Friesian la población americana excede los 10 millones pero el número efec-

tivo de fundadores es muy bajo (< 1000) dado el uso sistemático de la inseminación artificial en la que pocos machos dejan descendencia (Georges y Anderson, 1996). En el Uruguay se ha observado una disminución de la variabilidad genética de la raza Holando de una generación a otra dado los cruzamientos absorbentes con la población Holstein Frisian Norteamericana lo que hace que la identidad entre ambas es cercana a 0,9 (Kelly y col., 2002) indicando la existencia de una apreciable uniformidad racial entre poblaciones de diferentes países. El uso de la inseminación artificial, si bien ha permitido expandir los progresos genéticos mediante el uso de excelentes reproductores también trajo consecuencias en la expansión de las EHL. Un ejemplo es el caso del toro Carlin-M Ivanhoe Bell de EE.UU. del año 1980, portador del BLAD y del CMV (Síndrome de malformación vertebral) y tuvo 79.000 hijas registradas con producción y 1200 hijos (Čítek y Bláhová, 2004; Odalys y Acosta, 2009 en dicho país). Actualmente EEUU acepta animales de pedigree Holstein portadores de 5 EHL y en Red Angus 12 EHL (Cuadro 1) pero informa el resultado del diagnóstico molecular de las mismas. En el caso del CMV el gen y la mutación que la producen se han identificado recién en el año 2001 pero el origen de la mutación se remonta al padre norteamericano de Carlin-M Ivanhoe Bell. Este toro también es portador de BLAD y se ha utilizado ampliamente en programas de ganadería en todo el mundo: Penstate Ivanhoe Star del año 1963 y era portador del BLAD (Gentle y Testoni, 2006) por lo tanto dichas enfermedades se difundieron en el mundo. El defecto genético responsable de la CVM se hereda como un rasgo autosómico recesivo y los terneros que llevan una copia del alelo deletéreo. Actualmente los animales portadores son identificados con el código genético CV en los registros de pedigree y los individuos sanos tienen el código TV. En el Cuadro 1 se describen el código genético de las EHL de las razas que más se crían en Uruguay. Por lo tanto es de gran importancia proporcionar asesoramiento genético a los criadores sobre dichos datos ya que si cruzamos hermanos portadores de EHL cuya transmisión es autosómica recesiva existe una probabilidad del 25% que sus hijos estén afectados y que un 50% sean portadores asintomáticos que transmitan la enfermedad. En nuestro país se cuenta con la tecnología molecular para testar dichas EHL que permiten detectar los portadores, además de contar con la ley 18.341 que podría dar la posibilidad de deducir su costo en los impuestos. En este sentido, es importante realizar el diagnóstico en los reproductores de dichas EHL para planificar los cruzamientos y disminuir la morbilidad mediante la selección de los reproductores libres de las mismas. Esto nos permitirá certificar los reproductores como libre de EHL y disminuir las pérdidas económicas ocasionadas por la morbilidad así como detectar la presencia de las 24 EHL descritas en el Cuadro 1.

En el Cuadro 2 se estima los portadores de las EHL presentes en los rodeo analizados, de acuerdo a la ley del equilibrio génico de Hardy-Weinberg según la fórmula:  $P+H+Q=p^2+2pq+q^2$ , siendo P, H y Q las frecuencias genotípicas y p y q las Frecuencias génicas (Falconer y Mackay, 1996). Por ejemplo para el caso de la Cardiomiopatía de pelo Crespado en uno de los establecimiento de Lavalleya la frecuencia genotípica de los portadores es de 31,4% y los animales que manifiestan la EHL es de 3,8% o sea que son 8,26 veces menos la cantidad de individuos portadores normales que los afectados.

## CONCLUSIONES

Los diagnósticos patológicos y moleculares de enfermedades hereditarias en nuestro país confirman la presencia de 6 EHL de las presentes en USA para las razas Holando, Hereford y Angus. Estas son: en bovinos para carne MSUD 248, Epidermolisis Bullosa y á-Manosidosis, CMP de pelo crespo y osteopetrosis y en razas de bovinos para leche, BLAD.

-El desarrollo de esta herramienta biotecnológica permite controlar la diseminación de estas enfermedades hereditarias en el ganado bovino mediante un programa de erradicación y/o control testando a los toros y los sémenes. La ejecución en el Uru-

guay de la Ley 18.341 (Art.14) podría facilitar la aplicación de el diagnóstico molecular de EHL presentes en nuestro país que contribuirá a determinar la incidencia de las mismas en nuestras razas y estimar las pérdidas económicas que éstas ocasionan.

- Debemos tener en cuenta que los portadores de las EHL son normales pero mucho más numerosos que los enfermos siendo los que transmiten el alelo letal y se deberían testar ya que son el reservorio de los alelos letales y se expresan varias generaciones después.

## Agradecimientos

Por su colaboración técnica a Emma Solares y Sara Murchio.

## Referencias Bibliográficas

1. Acland H, Cook RW. (1969). Congenital cardiac disorder in calves. Vet Notes. Division of Animal Industry, NSW. Department of Agriculture, Sydney, 5: 8.
2. Agerholm JS. (1994). Congenital generalized Epidermolysis bullosa in a calf. Zentralbl Veterinaria Med 41:139-142.
3. Bellenger CR. (1971). Bull wastage in beef cattle. Aust Vet J 47:83-90.
4. Berg T, Healy PJ, Tollersrud OK, Nilssen O. (1997). Molecular heterogeneity for bovine á-manosidosis: PCR based assays for detection of breed-specific mutations. Res Vet Sci 63:279-282.
5. Cardellino R, Rovira J. (1987). Mejoramiento Genético Animal. Montevideo, Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L. 253 p.
6. Carnahan DL, Guffy MM, Hibbs CM, Leipold HW, Huston K. (1968). Hip Dysplasia in Hereford Cattle. JAVMA 152:1150-1157.
7. Citek J, Bláhová B. (2004). Recessive disorders-a serious health hazard? J Appl Biomed 2:187-194.
8. Cook RW. (1981) Cardiomyopathy and woolly haircoat in Poll Hereford calves. In: Australian Veterinary Association Year Book. En: Australian Veterinary Association. Sydney. Ed. M.G. Cooper y J.C. Holt. pp. 210.
9. Dennis JA, Healy PJ. (1999). Definition of the mutation responsible for maple syrup urine disease in Poll Shorthorns and genotyping Poll Shorthorns and Poll Herefords for maple syrup urine disease alleles. Res Vet Sci 67:1-6.
10. Dutra F. 1995. Estudio sobre la osteoartritis de cadera del novillo Hereford y su relación con la osteocondrosis y la displasia de cadera. Veterinaria, Uruguay, 30:3-24.
11. Dutra F, Baroni L. (2007). Epidermolisis hereditaria en terneros Hereford en Uruguay. Jornadas Uruguayas de Buiatría XXXV. Paysandú. Uruguay, 270-271.
12. Dutra F, Castro A. (2007). Cardiomiopatía congénita asociada al pelaje crespo en terneros Polled Hereford en Uruguay. Jornadas Uruguayas de Buiatría XXXV. Paysandú. Uruguay, 268-269.
13. Dutra F, Lussich M. (2007). Edema neuroaxial (posiblemente, maple syrup urine disease) en terneros Polled Hereford en Uruguay. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú. Uruguay, 306-307.
14. Dutra F. 2009. Arch. Vet. Este. 4º Trim. Pag: 8-9. DILAVE «Miguel C Rubino», MGAP. ISSN: 1688-6321.
15. Dutra F. 2010. Arch. Vet. Este. 4º Trim. Pag: 7-9. DILAVE «Miguel C Rubino», MGAP. ISSN: 1688-6321.
16. Dutra F. 2011. Arch. Vet. Este. 4º Trim. Pag 7. DILAVE «Miguel C Rubino», MGAP. ISSN: 1688-6321.
17. Dutra F, Castro A, Mayol C, Quinteros C. (2011). Cardiomiopatía congénita asociada al pelaje crespo en terneros Polled Hereford en Uruguay. Veterinaria (Montevideo). 47:17-23.
18. Dutra F, Baroni L, Techera M, Quinteros C. (2012). Osteopetrosis letal hereditaria (enfermedad de los huesos de mármol) en terneros Aberdeen Angus en Uruguay. Veterinaria (Montevideo). 48:23-29.
19. Falconer D.S. y Mackay T.F.C. Introducción a la genética cuantitativa. Cap. 1. 4ª Ed. 2006. Zaragoza. Ed. Acribia S.A. pp.469.
20. Ford CA, Stanfield AM, Spelman RJ, Smits B, Ankersmidt-Udy AE, Cottier K, Holloway H, Walden A, Al-Wahb M, Bohm E, Snell RG, Sutherland GT. (2005). A mutation in bovine keratin 5 causing epidermolysis bullosa simplex, transmitted by a mosaic sire. J Invest Dermatol 124: 1170-1176.
21. Georges M, Andersson L. (1996). Livestock Genomics comes of Age. Genome Research 6:907-921.
22. Gerardi A. (1996). Bovine leucocyte adhesion deficiency: a review of a modern disease and its implications. Res Vet Sci 61:183-186.
23. Giovambattista G, García P. (2010). Genética de animales domésticos. Buenos Aires. Ed. Intermédica. 261p.
24. Greene HJ, Leipold HW, Hibbs CM, Kirkbride CA. (1974). Congenital osteopetrosis in Angus calves. JAVMA 164: 389-395.

25. Harden KK, Robinson JL. (1987). Deficiency of UMP synthase in dairy cattle: a model for hereditary orotic aciduria. *J Inher Metab Dis.* 10:201-209.
26. Harper P, Healy PJ, Dennis JA. (1986). Maple syrup urine disease as a cause of spongiform encephalopathy in calves. *Vet Rec* 19:62-65.
27. Healy PJ, Dennis JA, Windsor PA, Pierce KD, Schofield PR. (2002). Genotyping cattle for inherited congenital myoclonus and maple syrup urine disease. *Aust Vet J* 80:695-697.
28. Healy, PJ. (1981). Modified granulocyte test for determination of mannosidosis genotype of cattle. *Res Vet Sci* 30:281-283.
29. Healy PJ. (1996). Testing for undesirable traits in cattle: an Australian perspective. *J Anim Sci* 74:917-922.
30. Herron BJ, Rao C, Lui S, Laprade L, Richardson JA, Olivieri E, Semsarian C, Millar SE, Stubbs L, Beier DR. (2005). A mutation in NFkB interacting protein 1 results in cardiomyopathy and abnormal skin development in *wa3* mice. *Human Mol Genet* 14:667-677.
31. Jolly R.D. (1974). Mannosidosis of Angus Cattle: a prototype control program for some genetics disease. *Recent Adv Vet Sci Comp Med.* 19:1-29.
32. Kehrli ME, Ackermann M.R, Shuster DE, Vandermaaten MJ, Schmalstieg FC, Anderson DC, Hughes BJ. (1992). Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency beta2 Integrin Deficiency in Young Holstein Cattle. *Am J Pathol.* 140:1489-1492.
33. Kelly L, Mortari N, De Andrés D, Postiglioni A. (2002). Estudio de la estructura genética de la raza Holando Uruguayo mediante marcadores genéticos. Comparación intraracial. *Veterinaria.* 37:7-15.
34. Kelly L, Trenchi G, D'Agosto S, Ravagnolo O, P Peraza, Llambí S, Rivero R, Moraes J, Solares E, Dutra F.(2010). Molecular diagnosis of inherited diseases. World Buiatrics Congress XXVI. Santiago, Chile, Pag.31.
35. Kelly L. Dutra F. D'Agosto S. (2008). Diagnostico molecular de enfermedades hereditarias en el Uruguay: MSUD e ICM. Jornadas Uruguayas de Buiatría. XXXVI Paysandú. Uruguay. pp 241-241.
36. Legates J.E. y Warwick E.J. (1992). Cría y mejora del Ganado. 8ª ed. México, Ed. Interamericana-McGraw-Hill 344 p.
37. Leipold HW. (1977). Osteopetrosis in Angus and Hereford Calves. *Am J Path* 86:745-748.
38. Llambí S, Guevara K, Rincón G, Zaffaroni R, de Torres E, Barrera J, Arruga MV, Rodríguez V, Postiglioni A. (2003). Frecuencia da deficiência na adesao leucocitaria em uma populacao de bovinos da raca holandesa, no Uruguai. *Ars Veterinaria* 19:52-56.
39. Llambí S, Nicolini P, Kelly L, de Torres E. (2007). Frecuencia de la enfermedad hereditaria BLAD en vacas Holando-Uruguayo con control de mastitis. Jornadas Técnicas Veterinaria-UdelaR V°, Montevideo. Uruguay, pp 26-27.
40. Llambí S. 2002. Estudios citogenéticos-moleculares de la fragilidad del cromosoma sexual X y enfermedades hereditarias monogénicas en bovinos de la raza Holando-Uruguayo (*Bos taurus*) Tesis PhD. Universidad de Zaragoza. Zaragoza. España.
41. McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A, Norman M, Baboonian C, Jeffery S, Mc Kenna WJ. (2000) Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) *Lancet.* 355: 2119-2124.
42. Meyers SN, McDaneld TG, Swist SL, Marron BM, Steffen DJ, O'Toole D, JR O'Connell, Beever JE, Sonstegard TS, Smith TPL. (2010). A deletion mutation in bovine *SLC4A2* is associated with osteopetrosis in Red Angus cattle. *BMC Genómica* 11:337- 351.
43. Nicholas F.W. (1990). Genética Veterinaria. Zaragoza. Ed. Acribia 618 pp.
44. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). Reprogen, Faculty of Veterinary Science, University of Sydney. MIA Number: 324/000161. World Wide Web URL: <http://omia.angis.org.au/>
45. Odalys U, Acosta A. (2009). Molecular diagnosis and control strategies for the relevant genetic diseases of cattle. *Biotechnol Apl* 26: 204-208.
46. Pierce KD, Handford CA, Morris R, Vafa B, Dennis JA, Healy PJ, Schofield PR. (2001). A nonsense mutation in the  $\alpha 1$  subunit of the inhibitory glycine receptor associated with bovine myoclonus. *Mol Cell Neurosci* 17:354-363.
47. Quinteros C, Baroni L, Techera M, Dutra F. (2011). Osteopetrosis. XV Congreso Latinoamericano de Buiatría. Jornadas Uruguayas de Buiatría XXXIX. Paysandú. Uruguay. p: 233-234.
48. Rajesh K, Patel KM, Singh K, Soni JB, Chauhan KRS, Sambasiva R. (2006). Lack of carriers of citrullinaemia and DUMPS in Indian Holstein cattle. *J Appl Genet* 47: 239-242.
49. Rivero R, Kautz S, Gomar MS, Barros SS, Gimeno EJ. (2001). Enfermedad de almacenamiento lisosomal en terneros del norte de Uruguay. *Veterinaria.* 36: 5-9.
50. Rivero R, Matto C, Verdes JM, Kelly L, Guerrero F, Gimeno E. (2011). Diagnóstico de á Manosidosis Hereditaria en bovinos de Uruguay. ENAPAVE XV. Goiânia. CD.
51. Rubio T, Verdecia M. (2004). Las enfermedades mitocondriales: un reto para las ciencias médicas. *MEDISAN:* 8:43-50.
52. Schwenger B, Schöber S, Detlef S. (1993). Cattle Carry a Point Mutation in the Uridine Monophosphate Synthase Gene. *Genomics.*16: 241-244.
53. Scruggs DW, Fleming SA, Maslin WR, Groce AW. (1995). Osteopetrosis, anemia, thrombocytopenia, and marrow necrosis in beef calves naturally infected with bovine virus diarrhea virus. *J Vet Diagn Invest.*7:555-559.

54. Shuster DE, Bosworth BT, Kehrli ME. (1992). Sequence of the Bovine CD18-Encoding cDNA Comparison with the Human and Murine Glycoproteins. *Gene*. 114:267-271.
55. Simpson MA, Cook RW, Solanki P, Patton MA, Dennis JA, Crosby AH. (2009). A mutation in NFkappaB interacting protein 1 causes cardiomyopathy and woolly haircoat syndrome of Poll Hereford cattle. *Animal genetic*. 40:42-46.
56. Schwenger B., Tammen I. and Aurich. C. (1993). Detection of the homozygous recessive genotype for deficiency of uridine monophosphate synthase by DNA typing among bovine embryos produced in vitro. *J Reprod Fertil* 100: 511-514.
57. Thompson K. (2007). Diseases of bones and joints. In: *Pathology of Domestic Animals*, ed. Maxie G, 5th ed., WB Saunders, Edinburgh, Scotland, vol. 1: 38-40.
58. Tollersrud OK, Berg T, Healy P, Evjen G, Ramachandran U, Nilssen O. (1997). Purification of bovine lysosomal alpha-mannosidase, characterization of its gene and determination of two mutations that cause alpha-mannosidosis. *Eur J Biochem* 246:410-419.
59. Wight-Carter M. (2006). Inherited and BVD induced osteopetrosis in calves. *Kansas Vet Q* 2-3.
60. Zhang B, Healy PJ, Zhao Y, Crabb DW, Harris RA. (1990). Premature Translation Termination of the Pre-E1-Alpha-Subunit of the Branched Chain Alpha-Ketoacid Dehydrogenase as a Cause of Maple Syrup Urine Disease in Polled Hereford Calves. *J Biol Chem* 265:2425-2427.



# Incidencia de *Nosema ceranae* durante el invierno en colonias de abejas melíferas retiradas de una forestación de *Eucalyptus grandis*



## Incidence of *Nosema ceranae* During Winter in Honey Bees Colonies Removed from *Eucalyptus grandis* Plantations

Mendoza, Y.<sup>1\*</sup>; Díaz, S.<sup>1</sup>; Ramallo, G.<sup>1</sup>; Invernizzi, C.<sup>2</sup>

### RESUMEN

La nosemosis es una enfermedad del sistema digestivo de las abejas melíferas (*Apis mellifera*) causada por los microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae*. En Uruguay solo ha sido detectado *N. ceranae*. La enfermedad se presenta indefectiblemente en las colonias que se trasladan a las forestaciones de *Eucalyptus grandis* al final del verano y suele causar importantes pérdidas cuando las colonias permanecen allí durante el invierno. Los objetivos de este estudio fueron determinar cómo *N. ceranae* afecta la invernada de las colonias que se retiran de las plantaciones de *E. grandis* en otoño, y si la suplementación proteica afecta el nivel de infección. En mayo se instalaron dos apiarios en Salto y San José con colonias retiradas de una plantación de *E. grandis*. Las colonias recibieron uno de los siguientes tratamientos: 1) control de nosemosis, 2) suplementación proteica, 3) control de nosemosis y suplementación proteica, y 4) sin control de nosemosis y sin suplementación proteica (testigo). En primavera se encontró en ambos apiarios que las colonias de los diferentes grupos no diferían en población y área de cría. En el apiario de San José no se encontró diferencia en el nivel de nosemosis entre las colonias con diferentes tratamientos, pero en el de Salto las colonias que no recibieron fumagilina y con suplementación proteica estaban más infectadas que las colonias tratadas con antibiótico y sin suplementación proteica. Este estudio muestra que *N. ceranae* no afecta a las colonias durante la invernada y que la suplementación proteica puede aumentar la infección.

**Palabras clave:** *Apis mellifera*, Nosemosis, parásitos, invernada

### INTRODUCCIÓN

La nosemosis es una enfermedad que afecta las funciones digestivas de las abejas melíferas (*Apis mellifera*) causada por los microsporidios *Nosema apis* y *Nosema ceranae* (Fries, 2010). Durante más de un siglo se creyó que *N. apis* era la única especie responsable de la nosemosis. Sin embargo, en el año 2005 Higes y col. (2006) encontraron que *N. ceranae*, cuyo hospedero original es la abeja asiática *Apis cerana* (Fries y col., 1996), estaba presente en España infectando a *A. mellifera*. Actualmente, *N. ceranae* se halla ampliamente distribuido en el mundo (Klee y col., 2007; Fries, 2010; Aurori y col., 2011). En Uruguay Invernizzi y col. (2009) encontraron únicamente a *N. ceranae* en

### SUMMARY

Nosemosis is a digestive disease of honey bees (*Apis mellifera*) caused by the microsporidia *Nosema apis* and *N. ceranae*. In Uruguay only *N. ceranae* has been detected. The disease appears invariably in colonies that are moved to *Eucalyptus grandis* plantations at the end of the summer and causes important losses when colonies remain there during winter. The aims of this study were to determine how *N. ceranae* affects wintering of colonies that are removed from *E. grandis* plantations at the end of the fall, and if proteic supplementation affects levels of infection. Two apiaries were installed in May in Salto and San José using colonies removed from an *E. grandis* plantation. Colonies received one of the following treatments: 1) nosemosis controlling, 2) proteic supplementation, 3) nosemosis controlling and proteic supplementation, and 4) without nosemosis controlling and without proteic supplementation (control). In the spring, colonies of the four groups in both apiaries presented no differentiation in their population and brood area. In San José apiary there were not differences in the nosemosis level between colonies with different treatments, while in Salto, colonies that have not received fumagilin and with proteic supplementation were more infected than the ones treated with antibiotic and without proteic supplementation. The present study shows that *N. ceranae* does not affect colonies during wintering and that proteic supplementation can increase infection.

**Key words:** *Apis mellifera*, *Nosema* disease, parasites, wintering

todas las regiones del país y confirmaron la presencia de esta especie en una muestra de abejas colectada antes de 1990.

La presencia de *N. ceranae*, aparentemente más virulento que *N. apis* (Higes y col., 2007; Martín-Hernández y col., 2007; Paxton y col., 2007; Higes y col., 2008; Higes y col., 2010), podría ser una de las causas de las elevadas pérdidas de colonias ocurridas en los últimos años en Europa y Estados Unidos (Stokstad, 2007; van Engelsdorp y col., 2009; Neumann y Carreck, 2010; Potts y col., 2010). Sin embargo, varios estudios han puesto en duda la responsabilidad de *N. ceranae* en las pérdidas de colonias (Cox-Foster y col., 2007; Chen y col., 2008; Gómez Pajuelo y col., 2008; Invernizzi y col., 2009; Forsgren y Fries, 2010; Williams y col., 2011; Traver y col., 2012).

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Ruta 50 km11, CP 70000, Colonia, Uruguay. Correo electrónico: ymendoza@inia.org.uy

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

Recibido: 25/5/12 Aprobado: 9/8/12

En Uruguay la nosemosis se presenta indefectiblemente en las colonias que se trasladan a las plantaciones comerciales de *Eucalyptus grandis* durante el periodo de floración entre los meses de febrero y mayo (Invernizzi y col., 2011a; Invernizzi y col., 2011b). Los apicultores suelen reportar importantes pérdidas de colmenas cuando los apiarios no pueden ser retirados al finalizar la floración y permanecen en las plantaciones durante el invierno. Invernizzi y col. (2011b) corroboraron esta situación encontrando que colonias libres de nosemosis trasladadas a una forestación de *E. grandis* al comienzo de la floración presentaban al finalizar la misma un promedio de pecoreadoras infectadas de 90,8% y dos meses después constataron la pérdida del 39% de las colonias y un extremo debilitamiento de las restantes. Los autores adjudican a la nosemosis la elevada mortandad de colonias registrada. También Mendoza y col. (2012) encontraron en una forestación de *E. grandis* que la infección por *N. ceranae* incide en la mortandad y tamaño de las colonias durante el invierno.

Según Fries (1995) la deficiencia de proteína es una de las causas que incrementa la nosemosis, especialmente cuando las abejas aprovechan flujos de néctar en otoño e invierno. En el estudio de Invernizzi y col. (2011b), realizado en una forestación de *E. grandis* se constató, durante la primera mitad del periodo de floración, que las colonias que disponían de reservas de polen de variado origen botánico presentaban menor nivel de infección por *N. ceranae* que las colonias que solo disponían del polen de los eucaliptos. Sin embargo, Rinderer y Dell Elliott (1977) y Porrini y col. (2011), trabajando en condiciones de laboratorio con abejas confinadas en cajas hallaron que las abejas infectadas con *Nosema* spp. y alimentadas con polen se infectaban más que las abejas que no disponían de polen.

Los objetivos de este estudio fueron determinar cómo *N. ceranae* afecta la invernada de colonias fuertemente infectadas retiradas de una plantación de *E. grandis*, y si la suplementación proteica afecta el nivel de infección de las abejas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Dos apiarios de 114 y 76 colonias que entre marzo y mayo del año 2010 permanecieron en una forestación de *E. grandis* en el departamento de Rivera durante el periodo de floración, fueron trasladados a fines de mayo a Salto y San José, respectivamente. Antes de retirar los apiarios las colonias recibieron un tratamiento acaricida para eliminar al ácaro *Varroa destructor*. Los lugares donde se emplazaron los apiarios son áreas abiertas con pequeños aportes de néctar y polen provenientes de diversas fuentes florales. Estos sitios son similares a los que los apicultores utilizan en gran parte del país para emplazar los apiarios.

Una vez instalados los apiarios, el 16 de junio en San José y el 23 de junio en Salto, se registró el nivel de infección por *N. ceranae*, la población de abejas, el área de cría, y las reservas de miel y polen de las colonias. Para medir la infección se colectaron abejas pecoreadoras cuando regresaban a la colmena (tapan-do la piquera) y luego se maceraron conjuntamente los abdómenes de 60 abejas determinando el número promedio de esporas por abeja con un hemocitómetro (Cantwell, 1970). La población de abejas se midió como el número de panales cubiertos

por abejas, mientras que el área de cría se estimó como cuartos de cara de panal ocupados por huevos, larvas o pupas. La reserva de polen se evaluó como cuartos de cara de panal conteniendo polen ensilado y la de miel contando el número de panales con miel. Todas las estimaciones se realizaron visualmente por el mismo observador.

En cada apiario se formaron cuatro grupos homogéneos de colonias en cuanto a población, área de cría y reservas de alimento y se aplicaron los siguientes tratamientos: 1) control de la nosemosis, 2) suplementación proteica, 3) control de la nosemosis y suplementación proteica, y 4) sin control de la nosemosis y sin suplementación proteica (testigo). En el apiario de Salto el número de colonias asignado a cada uno de los tratamientos fue de 30, 30, 28 y 26, respectivamente, mientras que en el apiario de San José se asignaron 19 colonias a cada tratamiento.

Para controlar la nosemosis se suministró a cada colonia 200 mg de fumagilina mezclados en 200 g de candi (mezcla de azúcar impalpable y fructosa) en una sola aplicación (Gómez Pajuelo y col. 2008). El producto comercial utilizado fue Nosemix del laboratorio Kinter. Los tratamientos fueron realizados el 29 de junio en el apiario San José y el 10 de julio en el de Salto.

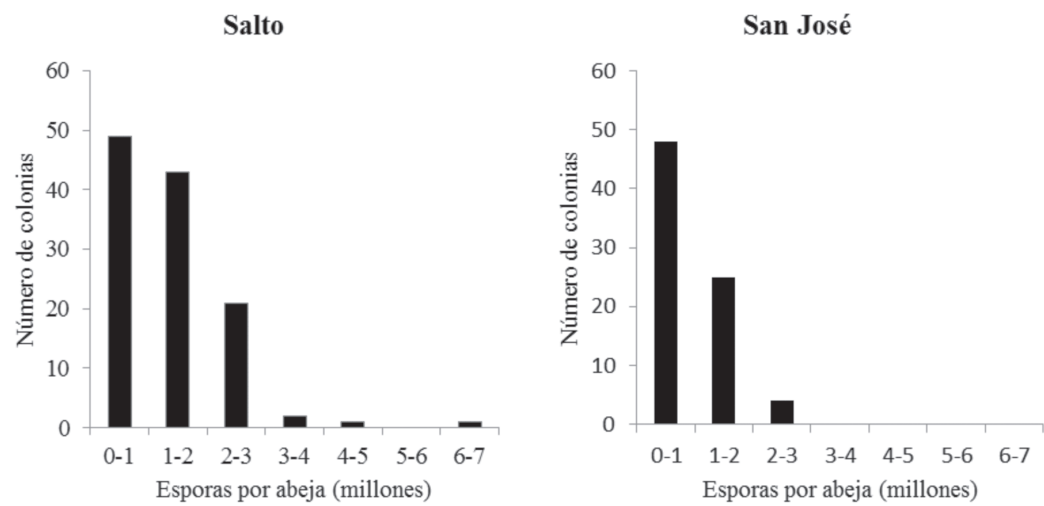
La suplementación proteica de las colonias se hizo con dos tortas de 150 g compuestas por 50% de levadura de cerveza, 30% de azúcar impalpable, 16,5% de fructosa y 3,5% de aceite de girasol, siendo éstos los productos y las proporciones más utilizadas por los apicultores para aportar proteínas a las colonias (Herbert, 1992). La primera torta de suplemento proteico fue suministrada conjuntamente con la aplicación de fumagilina y la segunda 20 días después.

La infección por *N. ceranae*, la población de abejas y el área de cría de las colonias fue determinada el 27 de setiembre en el apiario de Salto y el 5 de octubre en el apiario de San José.

La población de abejas, el área de cría y el nivel de nosemosis de las colonias de los diferentes grupos en el mes de junio se compararon utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis debido a que los datos no cumplían con los supuestos de la estadística paramétrica. En primavera el nivel de nosemosis de las colonias con diferentes tratamientos se comparó utilizando un análisis de varianzas (ANOVA) luego de una transformación logarítmica de los datos. Posteriormente se empleó el test de Tukey para comparar las medias de los diferentes grupos. En todos los casos se estableció un nivel de significación de 0,05. Los cálculos se realizaron empleando el programa estadístico R (R Development Core Team 2010).

## RESULTADOS

Todas las colonias retiradas de la forestación de *E. grandis* y llevadas a Salto y San José estaban infectadas con *N. ceranae*, salvo tres colonias del apiario de San José en las que no se encontraron esporas (Salto:  $0,9 \pm 0,6$  millones esporas por abeja, San José:  $1,4 \pm 0,9$  millones esporas por abeja). En la Figura 1 se muestra la distribución de colmenas en los apiarios de Salto y San José según los millones de esporas por abeja encontrados. El nivel de nosemosis, la población adulta, el área de cría y las reservas de miel y polen de ambos apiarios se muestran en el Cuadro 1.



**Figura 1.** Distribución de las colonias de los apiarios de Salto y San José en el mes de junio según el grado de infección por *N. ceranae*.

**Cuadro 1.** Esporas de *N. ceranae* por abeja, población de abejas, área de cría y reservas de polen y miel en las colonias de los apiarios de Salto y San José en el mes de junio.

| Apiario  | Fecha    | N   | Nosemosis | Población | Cría       | Polen     | Miel      |
|----------|----------|-----|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| Salto    | 23 junio | 114 | 1,4 ± 0,9 | 8,2 ± 1,7 | 10,5 ± 5,0 | 4,6 ± 3,7 | 4,8 ± 2,0 |
| San José | 16 junio | 76  | 0,9 ± 0,6 | 8,0 ± 2,3 | 14,1 ± 4,5 | 3,1 ± 2,6 | 6,1 ± 1,2 |

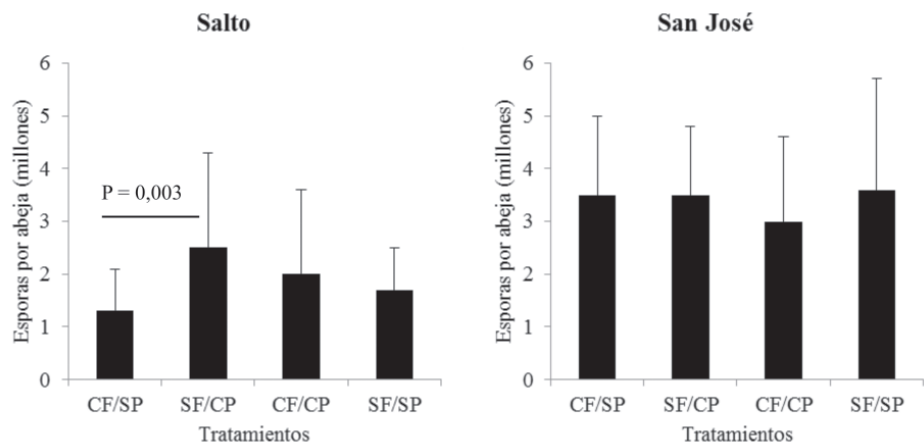
Nosemosis: millones de esporas por abeja.  
 Población: panales cubiertos por abejas.  
 Cría: cuartos de cara de panal.  
 Polen: cuartos de cara de panal.  
 Miel: número de panales con miel.

Tanto en el apiario de Salto como en el de San José, previo a la aplicación de los tratamientos no hubieron diferencias estadísticas entre los cuatro grupos de colonias en el nivel de infección por *N. ceranae* (Salto:  $\text{Chi}^2 = 4,613$ ;  $P = 0,20$ ; San José:  $\text{Chi}^2 = 5,053$ ;  $P = 0,17$ ), la población de abejas (Salto:  $\text{Chi}^2 = 0,888$ ;  $P = 0,83$ ; San José:  $\text{Chi}^2 = 0,692$ ;  $P = 0,88$ ) y el área de cría (Salto:  $\text{Chi}^2 = 1,821$ ;  $P = 0,61$ ; San José:  $\text{Chi}^2 = 3,059$ ;  $P = 0,38$ ).

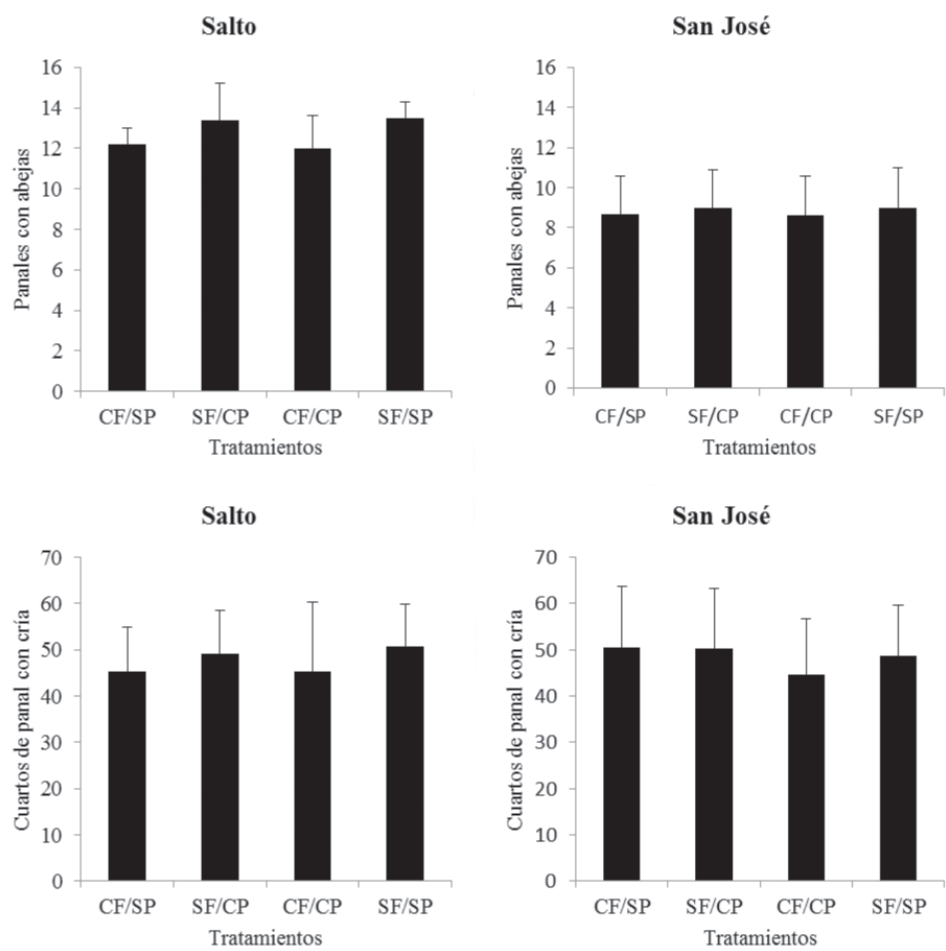
A lo largo del invierno se constató la pérdida de tres colonias en el apiario de Salto (2,6%) y 7 en el de San José (9,2%). De las 10 colonias muertas, cinco habían recibido fumagilina y suplementación proteica, dos habían recibido fumagilina, una había recibido suplementación proteica y dos correspondían al grupo control. Aunque el espaciamiento de las visitas a los apiarios no permitió visualizar las causas de la muerte de las colonias, se supone la pérdida de reinas fue la causas principal (las obreras no pueden reemplazarla durante el invierno) ya que no se hallaron indicios de enfermedades de la cría o muerte por falta de alimento.

Al comienzo de la primavera se estimó el nivel de infección por *N. ceranae*, la población adulta y el área de cría en las colmenas de los dos apiarios. En ambos se registró un aumento de la nosemosis pasando en el apiario de Salto de  $1,4 \pm 0,9$  a  $1,9 \pm 1,4$  millones de esporas por abeja y en el apiario de San José de  $0,9 \pm 0,6$  a  $3,4 \pm 1,7$  millones de esporas por abeja. En el apiario de Salto se encontró diferencias entre en el nivel de infestación de las colonias sometidas a los diferentes tratamientos ( $F = 4,19$ ;  $P = 0,008$ ) estando las colonias que no recibieron fumagilina y con suplementación proteica más infectadas que las colonias tratadas con antibiótico y sin suplementación proteica ( $P = 0,003$ ). En cambio, en el apiario de San José las colonias de los diferentes grupos no se diferenciaron en el nivel de infección ( $F = 0,71$ ;  $P = 0,549$ ) (Figura 2).

En primavera en ninguno de los apiarios se encontraron diferencias estadísticas entre las colonias de los diferentes grupos en la población de abejas (Salto:  $\text{Chi}^2 = 2,262$ ;  $P = 0,52$ ; San José:  $\text{Chi}^2 = 1,579$ ;  $P = 0,66$ ) y el área de cría (Salto:  $\text{Chi}^2 = 5,476$ ;  $P = 0,14$ ; San José:  $\text{Chi}^2 = 3,380$ ;  $P = 0,34$ ) (Figura 3).



**Figura 2.** Infección por *N. ceranae* en primavera en las colonias de los apiarios de Salto y San José sometidas a diferentes tratamientos. CF/SP: colonias tratadas con fumagilina y sin suplementación proteica; SF/CP: colonias sin tratamiento con fumagilina y con suplementación proteica; CF/CP: colonias tratadas con fumagilina y con suplementación proteica; SF/SP: colonias sin tratamiento con fumagilina y sin suplementación proteica.



**Figura 3.** Población de abejas y área de cría en primavera en las colonias de los apiarios de Salto y San José sometidas a diferentes tratamientos. CF/SP: colonias tratadas con fumagilina y sin suplementación proteica; SF/CP: colonias sin tratamiento con fumagilina y con suplementación proteica; CF/CP: colonias tratadas con fumagilina y con suplementación proteica; SF/SP: colonias sin tratamiento con fumagilina y sin suplementación proteica.

## DISCUSIÓN

Las colonias que se retiraron de las forestaciones de *E. grandis* al terminar la floración, no sufrieron pérdidas relevantes y llegaron a la primavera en buenas condiciones, a pesar de estar fuertemente infectadas por *N. ceranae*. Este resultado fue independiente de si las colonias fueron tratadas con fumagilina o recibieron suplementación proteica. Incluso, sorprendentemente, la nosemosis aumentó a lo largo del invierno, especialmente en el apiario de San José. Esto demuestra que *N. ceranae* no afectaría la supervivencia y desarrollo de las colonias durante el invierno si las colonias son retiradas de las forestaciones de *E. grandis* al culminar a floración. Resultados análogos fueron los obtenidos por Gómez Pajuelo y col. (2008), William y col. (2011) y Traver y col. (2012) quienes en trabajos similares hallaron que *N. ceranae* por sí sola, sin otros factores adversos como pueden ser un estrés nutricional, la presencia de *V. destructor* o la intoxicación por agroquímicos, no tendría efecto sobre las pérdidas invernales y el desarrollo primaveral. Esta situación es opuesta a la que ocurre en las colonias que permanecen en las forestaciones de *E. grandis* durante el invierno, donde *N. ceranae* sería la responsable de las pérdidas de colonias (Invernizzi y col., 2011b; Mendoza y col., 2012).

En el apiario de San José las colonias tratadas con fumagilina presentaron niveles de nosemosis similares a las colonias sin tratamiento, mientras que en el de Salto solo las colonias que no recibieron fumagilina y con suplementación proteica estaban más infectadas que las colonias tratadas con antibiótico y sin suplementación proteica. La aplicación de fumagilina utilizando candi como vehículo ha sido empleada con éxito por Gregorc y Sulimanoviæ (1996) y Gómez Pajuelo y col. (2008), pero su eficacia ha sido puesta en duda por Williams (1973) y Higes y col. (2011). Este estudio no permitió determinar si la fumagilina aplicada con candi es eficiente en el control de *N. ceranae*. En primer lugar, el tiempo transcurrido desde la aplicación del antibiótico al análisis de las colonias fue de 79 días en el apiario de Salto y de 98 días en el apiario de San José. En este tiempo las colonias pudieron volver a reinfectarse, por ejemplo a partir de la limpieza de excrementos con esporas. Por otro lado, el hecho de que en cada apiario se dejaran juntas colonias curadas y no curadas con fumagilina favorecería que las primeras tuviesen contacto con las abejas infectadas de las segundas, por ejemplo

a través de simple deriva de las abejas entre colonias vecinas, dificultando la eliminación de *N. ceranae*.

En el apiario de Salto las diferencias detectadas en el número de esporas por abeja entre dos grupos de colonias pudieron deberse tanto al efecto de la fumagilina como del aporte de proteína. En relación a la incidencia del consumo de proteína en el nivel de nosemosis Rinderer y Dell Elliott (1977) y recientemente, Porrini y col. (2011), realizando pruebas de laboratorio observaron que las abejas infectadas con *Nosema* spp. y alimentadas con polen presentaban más esporas que las abejas a las que no se les suministró polen en la dieta. Sin embargo, Invernizzi y col. (2011b) hallaron en una forestación de *E. grandis* que las colonias que disponían de polen de diverso origen botánico estaban menos infectadas que las que disponían fundamentalmente de polen de los eucaliptos. Es posible que en colonias que disponen de abundante polen la diversidad del origen botánico juegue un rol relevante en la resistencia a la nosemosis. En este sentido Alaux y col., (2010) encontraron que la diversidad botánica del polen afecta la respuesta inmune de las abejas induciendo una mayor actividad de la glucosa oxidasa en comparación con los pólenes monoflorales, aunque fueran ricos en proteína. Sin embargo, no mejoran la expresión de otros componentes de la respuesta humoral y celular implicados en la resistencia a la nosemosis (Antúnez y col., 2009).

Finalmente, la fuerte incidencia de la nosemosis registrada al comienzo de la primavera se ajusta a las descripciones sobre la estacionalidad de la enfermedad. Así, Fries (1997) señala que *N. apis* se presenta normalmente al final del invierno y principio de primavera, aunque puede aparecer un pico en otoño. En cambio, Martín-Hernández y col. (2007) encuentran que la nosemosis en España, donde se encuentra a *N. apis* y *N. ceranae*, fue perdiendo la estacionalidad. De todos modos, otro estudio reciente sobre la incidencia de *N. ceranae* a lo largo del año indica que se mantiene la estacionalidad que históricamente presentó *N. apis* (Traver y col., 2012).

En suma, este estudio muestra que *N. ceranae* no afecta a las colonias con buena población y reservas de alimentos durante la invernada en zonas con recursos nectaríferos y poliníferos limitados, pero suficientes para mantener la cría, y que la suplementación artificial con proteínas puede aumentar la infección sin que se obtenga ningún otro beneficio.

## Referencias Bibliográficas

- Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Le Conte Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol Lett* 6:562-565.
- Antunez K, Martin-Hernandez R, Prieto L, Meana A, Zunino P, Higes M. (2009). Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environ Microbiol* 11: 2284-2290.
- Aurori CM, Dezmirean DS, Marghitas LA, Moritz RFA. (2011). *Nosema apis* and *N. ceranae* in Western honeybee (*Apis mellifera*) – geographical distribution and current methods of diagnosis. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies* 68: 63-70.
- Cantwell G E. (1970). Standard methods of counting nosema spores. *Am Bee J* 110: 220-223.
- Chen Y, Evans JD, Smith IB, Pettis J S. (2008). *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J Invertebr Pathol* 97: 186-188.
- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan, P-L, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, van Engelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318: 283-287.

7. Forsgren E, Fries I. (2010). Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. *Vet Parasitol* 170:212-217.
8. Fries I. (1995). *Nosema apis* – a parasite in the honey bee colony. *Bee World* 74:5-19.
9. Fries I. (1997). Protozoa. In: Morse RA, Flottum K. Honey bee pest, predators and diseases. Medina, Ohio, Ed. The A.I. Root Company pp. 57-76.
10. Fries I. (2010). *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol* 103:73-79.
11. Fries I, Feng F, da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek NJ. (1996). *Nosema ceranae* n. sp. (Microsporida, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee (*Apis cerana*) (Hymenoptera, Apidae). *Eur J Protistol* 32:356-365.
12. Gómez Pajuelo A, Torres C, Orantes Bermejo FJ. (2008). Colony losses: a double blind trial on the influence of supplementary protein nutrition and preventative treatment with fumagillin against *Nosema ceranae*. *J Apic Res* 47:84-86.
13. Gregorc A, Sulimanoviæ D. (1996). The effect of Fumagillin in honey-sugar patties on suppression of *Nosema* disease of the honeybee (*Apis mellifera*) in mating nuclei. *Veterinarski Arhiv* 66:129-133.
14. Herbert E W J (1992). Honey bee nutrition. En: Graham JE. The hive and the honey bee. Hamilton, Illinois, Ed Dadant & Sons Inc. pp. 197-233.
15. Higes M, Martín R, Meana A. (2006) *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J Invertebr Pathol* 92:93-95.
16. Higes M, García-Palencia P, Martín-Hernández R, Meana A. (2007) Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporida). *J Invertebr Pathol* 94:211-217.
17. Higes M, Martín-Hernández R, Botias C, Bailon EG, Gonzales-Porto A, Barrios L, del Nozal MJ, Palencia PJ, Meana A. (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environ Microbiol* 10:2659-2669.
18. Higes M, Martín-Hernández R, Meana A. (2010). *Nosema ceranae* in Europe: An emergent type C nosemosis. *Apidologie*. 41:375-392.
19. Higes M, Nozal MJ, Alvaro A, Barrios L, Meana A, Martín-Hernández R, Bernal JL. (2011). The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporida) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. *Apidologie*. 42: 64-377.
20. Invernizzi C, Abud C, Tomasco I, Harriet J, Mendoza Y, Ramallo G, Campá J, Katz E, Gardiol G, Mendoza Y. (2009). Presencia de *Nosema ceranae* en abejas melíferas (*Apis mellifera*) en Uruguay. *J Invertebr Pathol* 101:150-153.
21. Invernizzi C, Antúnez K, Campa JP, Harriet J, Mendoza Y, Santos E, Zunino P. (2011a). Sanitary situation of the Uruguayan honeybees. *Veterinaria* 42:9-13.
22. Invernizzi C, Santos E, García E, Daners G, Di Landro R, Saadoun A, Cabrera C. (2011b). Sanitary and nutritional characterization of honeybee colonies in *Eucalyptus grandis* plantations in Uruguay. *Arch Zootec* 60:1303-1314.
23. Klee J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, Chinh TX, Puerta F, Ruz JM, Kryger P, Message D, Hatjina F, Korpela S, Fries I, Paxton RJ. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* 96:1-10.
24. Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, Salvador AM, Garrido-Bailon E, Higes M. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol* 73:6331-6338.
25. Mendoza Y, Harriet J, Campa J, Katz H, Ramallo G, Díaz-Cetti S, Invernizzi C. (2012) Control de *Nosema ceranae* en colonias de abejas (*Apis mellifera*) en forestaciones de *Eucalyptus grandis*. *Agrociencia*. En prensa.
26. Neumann P, Carreck N. (2010). Honey bee colony losses. *J Apic Res* 49:1-6.
27. Paxton RJ, Klee J, Korpela S, Fries I. (2007). *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie*, 38:558-565.
28. Porrini MP, Sarlo EG, Medici SK, Garrido PM, Porrini DP, Damiani N, Eguaras MJ. (2011). *Nosema ceranae* development in *Apis mellifera*: influence of diet and infective inoculum. *J Apic Res* 50:35-41.
29. Potts S, Roberts S, Dean R, Marris G, Brown M, Jones R, Neumann P, Settele J. (2010). Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *J Apic Res* 49:15-22.
30. R Development Core Team. (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Recuperado a partir de <http://www.R-project.org>
31. Rinderer TE, Dell Elliott K. (1977). Worker honey bee response to infection with *Nosema apis*: influence of diet. *J Econ Entomol*. 70:431-433.
32. Stokstad E. (2007). The case of the empty hives. *Science* 316:970-972.
33. Traver B E, Williams M R, Fell RD (2012). Comparison of within hive sampling and seasonal activity of *Nosema ceranae* in honey bee colonies. *J Invertebr Pathol* 109:187-193.
34. Van Engelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpy DR, Pettis JS. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS One* 4: e6481.
35. Williams J L. (1973). Fumagillin-treated extender patties ineffective for *Nosema* control in nuclei. *Am Bee J* 113:58-59.
36. Williams G R, Shutler D, Little C M, Burgher-MacLellan KL, Rogers RE (2011). The microsporidian *Nosema ceranae*, the antibiotic Fumagilin-B®, and western honey bee (*Apis mellifera*) colony strength. *Apidologie*. 42:15-22.



## Postpartum Anestrus in Dairy Cows: Hormonal Treatments. A Review

Morales, J.T.<sup>1</sup>; Cavestany, D.<sup>2</sup>

### RESUMEN

Reducir el intervalo entre partos significa incrementar los ingresos por vaca y por año justificando la aplicación de técnicas de manejo reproductivo para acortar el anestro posparto o prevenir que éste se prolongue. Se habla de inducción del celo cuando se tratan animales en anestro con la finalidad de corregir esa situación. En los sistemas lecheros los tratamientos están basados en hormonas, las cuales aplicadas en el momento adecuado mimetizan los acontecimientos producidos en el ovario normal. Se debe tener en cuenta que en vacas en anestro siempre es necesario el uso de progesterona para estimular el sistema hipotálamo-hipofisario. Luego de esto sí se pueden utilizar las combinaciones de hormonas para llegar a la ovulación (GnRH, Estradiol, Prostaglandinas, eCG). En este trabajo se analizan y discuten los diferentes protocolos existentes para tratar el anestro posparto prolongado.

**Palabras claves:** anestro, inducción del celo, eficiencia

### SUMMARY

Reducing calving interval means increasing income per cow per year thus justifying intervention techniques to shorten prolonged postpartum anestrus through the use of different hormonal protocols. The induction of estrus refers when anestrus animals are treated with finality to correct this situation. In dairy systems treatments are based on hormones which mimic the events of a normal estrus cycle. Anestrus cows always require the use of progesterone to stimulate the hypothalamic-pituitary system. After this, combinations of hormones to reach ovulation (GnRH, Estradiol, prostaglandins, eCG) can be used. In this review we discussed different hormonal treatments for the extended postpartum anestrus.

**Keywords:** anestrus, induction of estrus, reproductive efficiency.

### INTRODUCCIÓN

Para lograr el mayor aprovechamiento del potencial productivo y genético de la hembra lechera es necesario que las vacas queden preñadas lo más pronto posible y que tengan un ternero por año; para esto debe estar preñada en los primeros tres meses luego del parto. Por lo tanto reducir el intervalo entre partos significa incrementar los ingresos por vaca y por año justificando la aplicación de técnicas de manejo reproductivo para llegar a ese fin.

La incidencia de anestro posparto prolongado ha ido en aumento a nivel mundial de 7% (Fagan y Roche, 1986) hasta un 38% (Opsomer y col., 2000; Lucy, 2001; Walsh y col., 2005; Wilbank y col., 2007).

En Uruguay, trabajos que evalúan protocolos de inducción de celos han obtenido porcentajes de vacas en anestro con porcentajes de preñez que van de un 8% a un 47%, variando no solo entre año sino entre establecimientos (Cavestany, 2000a; Cavestany y col., 2003; de Nava, 2011). Estas incidencias justifican algún tipo de intervención en tratamiento y prevención (de Nava, 2011).

### Eficiencia reproductiva

Una buena eficiencia reproductiva implica lograr el mayor número de animales preñados en el menor tiempo posible (Cavestany, 2000b). El incremento en la producción de leche dado en los últimos años ha provocado cambios tanto fisiológicos como

de manejo en las vacas lecheras; dichos cambios han llevado a una reducción en la fertilidad del rodeo en general (Lucy, 2001), provocando que la eficiencia reproductiva sea cada vez más baja (García Bouissou, 2008; Walsh y col., 2011).

Para medir la eficiencia reproductiva se han desarrollado diferentes índices: los intervalos parto a primer servicio (IPS) y a concepción (IPC), intervalo entre partos (IEP), número de servicios por concepción (SC), porcentaje de detección de celos (%DC), porcentaje de concepción (%C) y porcentaje de preñez (%P) (Lemaire y col., 2012). La duración del anestro posparto puede afectar los índices reproductivos mencionados y por lo tanto estar determinando la eficiencia reproductiva de un tambo (Lucy, 2004; Peter y col., 2009).

### Fisiología del posparto

Para que una hembra pueda volver a quedar preñada deben ocurrir básicamente dos eventos: la involución del útero y la recuperación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (H-H-O). La involución uterina ocurre normalmente 4 a 5 semanas después del parto (Morrow y col., 1969). Algunos autores han encontrado una relación entre una involución uterina retardada y baja fertilidad. Zhang y col. (2010) reportaron que vacas que presentaban una involución uterina más rápida tenían un intervalo parto a primera ovulación (IPO) más corto que vacas que presentaron involución uterina retardada; esto coincide con lo ya encontrado por Kindahl y col. (1992). Melendez y col. (2004) observaron

<sup>1</sup>Doctor en Ciencias Veterinarias (DCV), Unidad de Lechería, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), INIA La Estanzuela CC 39173 Colonia, Uruguay. Correo electrónico: jmorales@inia.org.uy

<sup>2</sup>DV, PhD, Departamento de Reproducción, Facultad de Veterinaria, UDELAR, Uruguay.

Recibido: 22/5/12 Aprobado: 5/9/12

que vacas con un menor tamaño del cuerno uterino presentaban mayor porcentaje de concepción.

La primera ovulación posparto refleja el reinicio de la actividad ovárica, siendo el retraso en el inicio de la ovulación y manifestación externa de celos un factor asociado a la reducción en el porcentaje de concepción. El IPO en vaca para leche sin restricciones alimenticias tiene una duración de entre 20 a 30 días (Canfield y Butler, 1990; Rajamahendram y Taylor, 1990; Tanaka y col., 2008).

De acuerdo con Macmillan y Day (1987), para desencadenar la secuencia de eventos que llevan al celo es necesario un período de exposición previa de  $P_4$  («priming») que estimula el eje H-H-O (Kyle y col., 1992). Esto se relaciona con el largo período anovulatorio y ciclos cortos que aparecen después de la primera ovulación en el posparto.

### Anestro posparto

El anestro es la ausencia de comportamiento estral en un período de tiempo esperado; es un evento fisiológico normal que tiene un promedio de tiempo, siendo bajo condiciones pastoriles 45 a 60 días (Gatica, 1993; Cavestany y col., 2001).

Actualmente el anestro se clasifica según la dinámica folicular y luteal, en:

**Tipo I:** emerge una onda folicular pero no existe desviación de los folículos; esta condición ocurre en menos del 10% de las vacas de un rodeo (Markusfeld, 1987) y es causada básicamente por una extrema subnutrición (Peter y col., 2009).

**Tipo II:** desviación y crecimiento de los folículos, con o sin folículo dominante (FD), seguido de atresia o regresión. En este caso o existe una baja pulsatilidad de LH o el folículo produce pocas concentraciones de  $E_2$  (Peter y col., 2009).

**Tipo III:** crecimiento y establecimiento de un FD pero éste no ovula, persistiendo en el ovario. Puede ser causado por que el hipotálamo esta insensible al feedback positivo del estradiol o por una respuesta alterada del folículo a las gonadotrofinas (Peter y col., 2009).

**Tipo IV:** La vaca tiene ovulación, celo y formación de un cuerpo lúteo con una prolongada fase luteal (el cuerpo lúteo no sufre regresión). Muchas pueden ser las causas para esta condición: distocia, enfermedades en el primer mes de lactación, estrés, ovulación luego del parto (Peter y col., 2009), infecciones uterinas (Mateus y col., 2002) o piometra (Sheldon y col., 2006). Las vacas con este tipo de anestro podrían ser las llamadas «vacas fantasma», las cuales presentan una larga fase luteal (más de 4 semanas) a pesar de que no se detecta ningún embrión al día 30 pos inseminación artificial (IA) (Cavalieri y Macmillan, 2002).

### Factores que prologan el anestro posparto

En vacas para leche los principales factores que afectan el reinicio de la actividad ovárica son: balance energético negativo (BEN), pobre condición corporal (CC), paridad/edad, diferentes enfermedades, alta producción de leche y la estación (Bulman y Lamming, 1978; Markusfeld, 1987; Lucy, 2001; Roche, 2006; Wathes y col., 2007).

### Tratamientos hormonales para acortar el anestro posparto prologando

Los tratamientos de inducción del celo se realizan en animales en anestro con la finalidad de: 1) controlar el desarrollo de las ondas foliculares, 2) promover la ovulación y 3) sincronizar el estro y/o la ovulación al final del tratamiento. Estos tratamientos están dirigidos a aumentar la frecuencia de pulsos de LH y así permitir que el FD madure y ovule pero, como ya lo expresaron Peter y col. (2009), no existe un tratamiento único para el anestro posparto prolongado; se deben tener en cuenta todos los factores, mencionados anteriormente, que lo afectan.

A partir del conocimiento del control neuroendocrino del ciclo estral en las vacas, surgió la utilización de las hormonas que regulan ese ciclo con fines terapéuticos. Generalmente los tipos de anestro que se tratan con hormonas son los de tipo II y III («anestro superficial»), dado que animales en anestro tipo I («anestro profundo»), están generalmente en un BEN por lo tanto tienen pocas chances de respuesta a estos tratamientos (Cavestany, 2010).

Si se tiene en cuenta que vacas en anestro necesitan progesterona o progestágenos para estimular el sistema H-H-O, éstos pueden combinarse con hormonas que induzcan una nueva onda folicular y provoquen la ovulación del FD generado de ella (GnRH, Estradiol, Prostaglandinas, eCG) (Lucy y col., 2004; Cavestany, 2010).

**«Priming» de progesterona:** como se dijo anteriormente la utilización de  $P_4$  es necesaria si se quiere obtener una mejor fertilidad en vacas en anestro (Macmillan y Peterson, 1993). Con la utilización de  $P_4$  se busca imitar la fase luteal corta producida previo al reinicio de la actividad sexual cíclica posparto. La utilización de  $P_4$  mejora los porcentajes de preñez en animales inseminados artificialmente ya que ésta evita la formación de un cuerpo lúteo de vida corta (Breuel y col., 1993), por lo tanto, el cuerpo lúteo de la ovulación precedida por el tratamiento de  $P_4$  tendrá una actividad normal permitiendo el desarrollo y el mantenimiento de la preñez (Wiltbank y col., 2002).

Al cabo del tiempo se han desarrollado diferentes fuentes de  $P_4$  o progestágenos sintéticos: acetato de melengestrol (MGA, oral), su uso ha dado como resultado una baja calidad del oocito ya que se administra por un período muy prolongado de días (Odde, 1990); dispositivos intravaginales [esponjas con acetato de medroxiprogesterona (MAP) y dispositivos de silicona con  $P_4$ ] de diferentes formas y con diferentes concentraciones; soluciones inyectables (soluciones oleosas con diferentes concentraciones de  $P_4$ ).

La utilización de la  $P_4$  o progestágeno se realiza por 5 a 10 días (Diskin y col., 2002; Lucy y col., 2004; Baruselli y col., 2004), junto con alguna hormona (GnRH o estradiol) que produzca el recambio de una onda folicular. A la retirada de los implantes los animales deberán tener un FD con capacidad de ovular. Diskin y col. (2002) al igual que con Rhodes y col. (2003) sugieren que la tasa de éxito de los protocolos con progestágenos o  $P_4$  sola es variable (50% a 70%) ya que depende del intervalo parto a tratamiento y la causa del anestro.

**GnRH:** la GnRH es capaz de inducir la liberación de LH y causar la ovulación o regresión del FD, surgiendo una nueva onda folicular (Lucy y col., 1992). La dosis varía de 8 y 100 µg dependiendo del principio activo de los mismos (Macmillan y col., 2003). Vacas que estén en anestro tipo III pueden ovular el FD y por lo tanto el protocolo GnRH - PGF2α - inducirá el celo (Twagiramungu y col., 1992a, b), pero estas ovulaciones serán poco fértiles ya que ni el FD ovulado ni el cuerpo lúteo son normales, por lo tanto una suplementación con P<sub>4</sub> permitirá fertilidades tan buenas como el protocolo en vacas cíclicas (Twagiramungu y col., 1992a). También la GnRH es usada en tratamientos de ovarios quísticos (Garverick, 1997).

**Estradiol:** desde que Bó y col. (1995) reportaron que la utilización de implantes de progestágenos más 5 mg de estradiol (o sus esteres) producen atresia folicular y resurgimiento de una nueva onda folicular, los E<sub>2</sub> (al igual que la GnRH) se han utilizado en vacas en anestro para lograr un desarrollo sincronizado de la onda folicular, luego de una exposición a la P<sub>4</sub>. El agregar E<sub>2</sub> a los tratamientos con P<sub>4</sub> también permite la manifestación de estro en vacas anestro anovulatorios (Rhodes y col., 2003). Su acción en un ambiente con altas concentraciones de P<sub>4</sub> es reducir la secreción de LH induciendo atresia del FD y surgimiento de una nueva onda folicular, pero en ambientes con baja concentración de P<sub>4</sub> el estradiol induce la liberación de GnRH (por lo tanto de LH) que lleva a la ovulación o luteinización del FD. Los diferentes compuestos de estradiol (benzoato, valerato o cipionato) tienen diferente vida media en sangre aspecto a considerar en los tratamientos; pero sus efectos son similares a los de la GnRH (Lucy y col., 2004).

**Gonadotrofina coriónica equina (eCG):** el objetivo de un tratamiento con eCG después de un período de tratamiento con P<sub>4</sub> es el de estimular el desarrollo folicular ovárico y la producción de estradiol (Rhodes y col., 2003). Al administrar a las vacas eCG provoca desarrollo y maduración folicular, ovulación y desarrollo viable del cuerpo lúteo (Duffy y col., 2004);

además produce cuerpos lúteos accesorios que mejorarían el mantenimiento de la preñez (Thatcher y col., 2002). Esta adición de eCG a los protocolos de control de anestro basados en P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub> se ha informado como una herramienta útil para mejorar la fertilidad en razas índicas con un alto porcentaje de vacas acíclicas antes de los 60 días posparto (Baruselli y col. 2004), pero en vacas Holando hay menos trabajos publicados.

### Protocolos de inducción de la ovulación

Si se controla la fase folicular junto a la fase luteal se obtiene sincronía del celo y de la ovulación con fertilidad normal (Gregory y col., 2009). La fase luteal es controlada con la P<sub>4</sub>, y el desarrollo folicular e inducción de la ovulación es controlado por el estradiol o la GnRH (Alberio y Butler, 2001); a partir de esta premisa es que los protocolos para el tratamiento del anestro se basan en la combinación de estas hormonas.

**Progesterona y estradiol:** como se vio anteriormente la administración de estradiol al principio de los tratamientos con P<sub>4</sub> produce el desarrollo de una nueva onda folicular; si se quiere sincronizar la ovulación de esa nueva onda (y poder realizar IATF) se puede utilizar una segunda dosis de estradiol (Cavestany, 2010), logrando buenos porcentajes de concepción a la primer inseminación (Rhodes y col., 2003; McDougall, 2001) (Cuadro 1). En general los dispositivos intravaginales son asociados con BE o cipionato de estradiol (CPE).

Básicamente los protocolos de P<sub>4</sub> con estradiol son: día 0 se inserta el dispositivo de P<sub>4</sub> más 1 ó 2 mg de benzoato de estradiol (BE), al día 7 u 8 se retira el dispositivo y a las 24 h del retiro se inyecta 1 mg de BE; la ovulación ocurrirá 40 h después del BE, por lo tanto la inseminación artificial (IA) debería ser 48-52 h luego de la retirada de la P<sub>4</sub>. Al provocar los síntomas de celo, el estradiol permite la opción de realizar la IA luego de la detección de celos entre 1-5 días pos tratamiento o una IATF (Thatcher y col., 2001).

**Cuadro 1.** Resultados reproductivos de tratamientos hormonales para vacas lecheras en anestro. T = tratadas; C = controles.

| Referencia              | Protocolo (T/C*)                                                           | N<br>(T/C) | % Preñez<br>(T/C)                 |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------|------------|-----------------------------------|
| Xu y col. (1997)        | 8d CIDR + eCG                                                              | 219/229    | 39/43 17d pos IA                  |
| Hanlon y col. (2000)    | 6d CIDR + BE                                                               | 385/376    | 60/39 <sup>b</sup> 21 días pos IA |
| Xu y col. (2000)        | GnRH+CIDR+PG+BE vs CIDR+BE                                                 | 602/597    | 44/26 <sup>b</sup> 6 días pos IA  |
| Darwash y col. (2001)   | PG+7d CIDR                                                                 | 90/190     |                                   |
| McDougall (2001)        | BE+8d CIDR+BE vs 6d CIDR+BE                                                | 602/603    | 43/35 <sup>a</sup> 14 días pos IA |
| McDougall y col. (2001) | Ovsynch vs 6d CIDR + BE                                                    | 96/97      | 58/68 28 días pos IA              |
| Cavestany y col. (2003) | Ovsynch+ MAP 7d vs Ovsynch                                                 | 86/81      | 17,4/3,7 <sup>c</sup>             |
| Gumen y col. (2003)     | Ovsynch                                                                    | 33/31      | 9/3                               |
| Ozturk y col. (2010)    | PG+GnRH+PG+GnRH vs Ovsynch                                                 | 25/26      | 72/23,1 <sup>a</sup>              |
| Cavestany y col. (2011) | GnRH+P4 7d+PG+BE vs GnRH+CIDR 7d + PG+BE                                   | 184/193    | 30,6/31                           |
| De Nava (2011)          | BE + P <sub>4</sub> , PG+eCG, GnRH vs GnRH + P <sub>4</sub> , PG+eCG, GnRH | 343/313    | 23/21,5                           |

\*C: grupo control.

a: diferencias significativas entre T y C (P < 0,05).

b: diferencias significativas entre T y C (P < 0,001).

c: diferencias significativas entre T y C (P < 0,01).

Modificado de Rhodes y col., 2003.

Los mejores porcentajes de concepción se logran con 7 u 8 días de permanencia de los dispositivos intravaginales (Burke y col., 2001; Rhodes y col., 2003; McDougall y col., 2005) ya que se asegura que el folículo llegue al tamaño adecuado para ovular. Existen varios dispositivos vaginales con concentraciones de progesterona que van desde 0,5 g a 1,9 g pudiendo estos últimos utilizarse más de una vez, si son manejados adecuadamente. Recientemente ha surgido una formulación de progesterona natural en vehículo oleoso para uso parenteral. Algunos trabajos realizados con ésta han arrojado resultados similares a las intravaginales (Cavestany y col., 2011), aunque éstos pueden estar relacionados al nivel de anestro (profundo o superficial).

Con respecto al estradiol, estudios de campo realizados en vacas lecheras de Nueva Zelanda sugirieron que la administración de 2 mg de BE en el momento de la inserción de un dispositivo intravaginal de  $P_4$  en lugar de 1 mg tiende a aumentar el porcentaje de preñez al primer servicio (49,0% vs. 61,7%) (Day y col., 2000), pero estudios realizados en Australia no mostraron diferencias de la fertilidad después del uso de cualquiera de las dosis de BE (Cavaleri y col., 2006), por lo que es así que se utiliza indistintamente 1 a 2 mg para el BE (Macmillan y Rhodes, 1996; Rhodes y col., 2003); 0,5 a 1 mg para el cipionato de estradiol (CE) (Thundathil y col., 1997; Lopes y col. 2000). Para inducir la ovulación, al final del protocolo, el momento de la inyección de estradiol dependerá del tipo: si se utiliza BE se recomienda hacerlo unas 50-55 horas luego de retirados los dispositivos intravaginales (Rhodes y col., 2003), mientras que si se utiliza CPE se recomienda hacerlo al día de retirada ya que al liberarse más tardíamente hará el efecto al mismo tiempo del BE dando como ventaja la reducción del manejo de los animales (Uslenghi y col., 2010). Este protocolo ha resultado efectivo en Australia y Nueva Zelandia al producir celo y ciclos fértiles (70% a 100%), dando como resultados buenos porcentajes de preñez al primer servicio (27% - 62%) y una preñez final de 67% (Rhodes y col., 2003). Se puede remplazar el BE o CPE por GnRH en el protocolo (Duchens y col., 2007).

En general los tratamientos basados en  $P_4$  en animales en anestro dan resultados variables; algunos autores reportan resultados similares a los obtenidos en vacas inseminadas después de un primer estro espontáneo (Hanlon y col., 2000; Day y col., 2000; Xu y Burton, 2000) (Cuadro 1), mientras otros han informado respuestas menores que en vacas ciclando (Cartmill y col., 2001; Macmillan, 2002; Mapletoft y col., 2003). Si se trata a las vacas temprano en la estación reproductiva con dispositivos vaginales se puede lograr un alto porcentaje de concepción (60% a 64%) al primer servicio (Rhodes y col., 2003; Gutierrez y col., 2009); se puede pensar entonces que la inducción de la ovulación aumentaría el porcentaje de vacas preñadas antes de los 100 días posparto (Ross y col., 2004), beneficiando económicamente al productor.

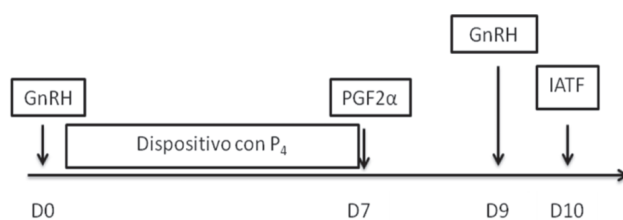
Se debe tener en cuenta que los tratamientos hormonales no pueden acelerar el proceso de recuperación en todos los animales a la vez, por lo tanto es probable que el estado corporal o metabólico de la vaca inmediatamente antes del tratamiento, más que el tratamiento utilizado, contribuya a la fertilidad menor.

**Protocolo Ovsynch:** el Ovsynch (GnRH-PGF2 $\alpha$ -GnRH) ampliamente usado para sincronización de vacas ciclando provoca

ovulación, generalmente sin ocurrencia de celo (Pursley y col., 1995) por esto es que después de este tratamiento se debe hacer IATF. La GnRH provoca que el folículo más grande ovule o regrese, iniciando una nueva onda folicular; 7 días después al aplicar la PGF2 $\alpha$  se provoca luteolisis (del CL formado a partir de la administración de GnRH) y al día 9 la segunda inyección de GnRH induce la ovulación del nuevo folículo; 16 horas después se insemina. Los resultados han sido variables (9% a 37%) (Thatcher y col., 2002; Gumen y col., 2003; Shepard, 2005).

Debido a lo mencionado anteriormente surgió una modificación del Ovsynch el cual tiene el agregado de  $P_4$  y se denomina Cosynch (Figura 1). Agregar una fuente de  $P_4$  durante 7 días junto con la inyección de GnRH mejora los porcentajes de preñez (50%: Cavestany y col., 2000a; 55%: Pursley y col., 2001; 28-34%: López-Gatius y col., 2001) en comparación con vacas en anestro tratadas con el Ovsynch tradicional (Cavestany y col., 2003; Stevenson y col., 2008) (Cuadro 1).

Existe cierta dicotomía de los efectos de la GnRH en la progresión de la onda folicular en los tratamientos de inducción con  $P_4$  (Diskin y col., 2002); siendo cuestionado el uso de la GnRH para sincronizar la emergencia de una onda folicular (Macmillan, 2010); tal vez esta sea la causa de los resultados variables explicados anteriormente. Por esto algunos técnicos se inclinan por la utilización de BE al principio y no GnRH (de Nava, 2011).



**Figura 1.** Esquema protocolo CIDR – Synch.

**Presynch:** el protocolo Presynch clásico consiste en dos inyecciones de PGF2 $\alpha$ , administradas con un intervalo de 14 días. Esto es seguido, 12 - 14 días más tarde, por la primera administración de GnRH del protocolo Ovsynch. Debido que este protocolo ha sido efectivo en aumentar la fertilidad en vacas cíclicas (Moreira y col., 2001) es que se han realizado modificaciones en él para su uso en vacas en anestro. Chebel y col. (2006) probaron el uso de un dispositivo CIDR durante los 7 días anteriores a la PGF2 $\alpha$  final del protocolo Presynch tradicional, induciendo ciclicidad en las vacas anovulatorias a los 62 días posparto y aumentando ésta de un 30% a 47%, con un porcentaje de concepción de 33% a la primera IA utilizando un protocolo Ovsynch. De todos modos los tratamientos de presincronización más sincronización en vacas en anestro no son efectivos dado que al no haber un cuerpo lúteo, la administración de prostaglandina no tendría sentido. Por otra parte, en nuestras condiciones, el tratamiento propuesto por Chebel resulta excesivamente costoso, aunque la inducción de la ciclicidad en vacas anovulatorias es posible (Wiltbank y col., 2007).

**Doublesynch:** Bello y col. (2006) comprobaron la mejoría de la fertilidad con un protocolo de presincronización con PGF2 $\alpha$  y GnRH (Doublesynch) en vacas cíclicas; siendo estudiada pos-

teriormente vacas en anestro por Ozturk y col. (2010); los autores obtuvieron buen porcentaje de preñez (72%) (Cuadro 1) sugiriendo que el protocolo Doublesynch se puede utilizar para IATF tanto en vacas ciclando como en anestro. Una posible explicación del hecho que vacas sin cuerpo lúteo mejoren su fertilidad con PGF2 $\alpha$  es la dada por diversos autores que demostraron efectos favorables de la PGF2 $\alpha$  en vacas con problemas de ovulación, a partir del aumento de los niveles de LH y las tasas de ovulación, sugiriendo que existe una mejora en la respuesta de la hipófisis a la GnRH luego de un tratamiento con PGF2 $\alpha$  (Randel y col., 1996; Cruz y col., 1997; López-Gatius y col., 2004).

**Heatsynch y P<sub>4</sub>:** sustituir la inyección final de GnRH por CPE o BE (Heatsynch) no compromete el desempeño reproductivo en vacas cíclicas (Thatcher y col., 2002; Stevenson y col., 2004), obteniéndose más vacas en estro y porcentajes de preñez similares al protocolo Ovsynch (Yaniz y col., 2004). En un estudio realizado por Balla y col. (2006) encontraron que el BE es igual de efectivo que la GnRH para inducir el crecimiento de una nueva onda folicular y para sincronizar la ovulación tanto en vacas cíclicas como en anestro.

Si al Heatsynch se le agrega una fuente de P<sub>4</sub> (Figura 2) se obtienen porcentajes de preñez a la primera inseminación mejores que el protocolo CIDR + BE (Xu y col., 2000; Cavestany, 2005; Cavestany y col., 2011) (Cuadro 1).

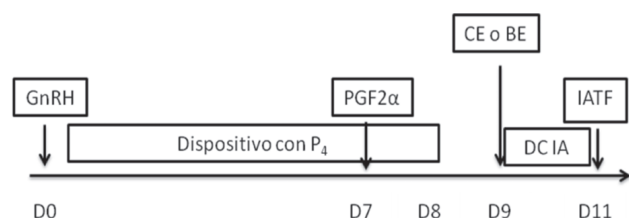


Figura 2. Esquema protocolo Heatsynch + CIDR.

**Protocolos con eCG:** se ha reportado que al combinar P<sub>4</sub> con una inyección de eCG al retiro de la fuente de P<sub>4</sub> se logra aumentar la sincronía y los porcentajes de concepción en la inseminación subsiguiente. Esto se ha probado en el caso de vacas para carne donde se han obtenido porcentajes de concepción del 70% y porcentajes de preñez de 64% en protocolos: P<sub>4</sub> + eCG + PGF2 $\alpha$  (Ross y col., 2004). En rodeos lecheros de Australia se ha evaluado la utilización de CIDR o implantes de norgestomet con eCG demostrando que el intervalo parto a concepción, en comparación con grupos controles no tratados, no es afectado (Rhodes y col., 2003). Sin embargo existen autores que afirman que la utilización de eCG en protocolos de BE-P<sub>4</sub> podría mejorar los porcentaje de preñez en vacas en anestro (Cutaia y col., 2003; Veneranda y col., 2008). Bryan y col. (2010) demostraron que un protocolo Ovsynch + P<sub>4</sub> + eCG disminuye los días abiertos; sin embargo reportes recientes obtuvieron buenos porcentaje de preñez de 20% (Cuadro 1) utilizando protocolos parecidos (de Nava, 2011). Tal vez los resultados dependan de varios factores como ser la edad (Bryan y col., 2010) o la CC (de Nava y Cavestany, 2000; Souza y col., 2009). Probando la eCG como tratamiento de vacas anovulatorias (sin protocolo de

IA) Rostami y col. (2011) inyectaron a los 6 días posparto 500 UI de eCG obteniendo una primera ovulación más temprano, e igual cantidad de ondas foliculares pero en menor tiempo que las vacas no tratadas.

**Protocolos de resincronización:** la combinación de programas para la primera IA con resincronización temprana de las vacas no preñadas permite realizar inseminaciones sistemáticas de los animales vacíos sin necesidad de detectar celos en los retornos alcanzando fertilidades del 55% al 75% y de esta forma mejorar el desempeño reproductivo de las vacas lactando (Chenault y col., 2003). En algunos casos, vacas en anestro que no han respondido al tratamiento inicial de inducción de ovulación responden favorablemente a un segundo tratamiento (McDougall y Loeffler, 2004).

El protocolo que se ha reportado más efectivo es el P<sub>4</sub> más estradiol al inicio y al retiro del implante (Figura 3) (Cavalieri y col., 2006). Diversos autores coinciden que el tratamiento de resincronización en vacas lecheras en anestro con P<sub>4</sub> y BE podría mejorar los porcentaje de preñez al día 28 pos IA pero al final de la temporada reproductiva no se obtienen mejoras en la fertilidad global (McDougall, 2001; Rhodes y col., 2001; Cavestany y col., 2003; Hanlon y col., 2005; McDougall y Compton, 2005) (Cuadro 1), ya que las vacas en anestro responden menos a la resincronización que las vacas ciclando (Cavestany y col., 2003); estos datos concuerdan con lo informado por Cavalieri y col. (2006) que los porcentaje de preñez de las resincronizaciones con P<sub>4</sub> y estradiol son variables (aumentan, disminuyen o no cambian). Una posible explicación a estos resultados es que vacas anovulatorias tendría bajas concentraciones de P<sub>4</sub> luego de la primera inducción de la ovulación llegando al tratamiento de resincronización con menor concentración de P<sub>4</sub> que las vacas ciclando y esto afectaría luego los porcentaje de preñez, siendo la concentración de P<sub>4</sub> antes de la IA un factor relevante más que el tratamiento de resincronización.

Se podría utilizar GnRH mejorando los porcentaje de preñez en vacas no cíclicas (Sterry y col., 2006). Chebel y col., (2003) demostraron que es seguro iniciar un Ovsynch en el día 21 pos IA antes del diagnóstico de preñez. También se ha probado que el agregar una GnRH antes de un Ovsynch en la resincronización mejora los porcentaje de preñez en vacas con ovarios quísticos (Bartolome y col., 2005).

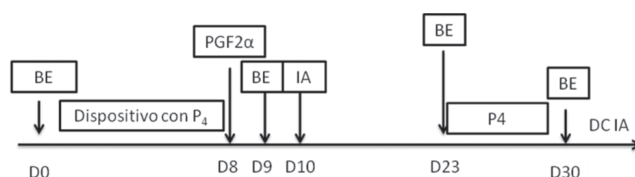


Figura 3. Esquema protocolo de resincronización con P<sub>4</sub> y BE.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Debido a los muchos factores e interacciones que afectan el reinicio de la actividad ovárica, el control y la gestión del anestro posparto es complejo. Existen señales y factores no solo ováricos sino que también extra-ováricos que determinan si un

foliculo ovulará o no. Estas señales provienen principalmente de la energía que consume y las reservas que tenga el animal.

Las opciones terapéuticas que se resumieron son alternativas para lograr un intervalo entre partos cercano a los 12 meses en más del 75% de los animales. Las respuestas a los tratamientos

no son uniformes sino que parecería que dependen de los factores mencionados. Para estudiar y evaluar si un protocolo para tratar el anestro es el adecuado, debemos tener en cuenta que el manejo de vacas en anestro es diferente para los sistemas en pastoreo y estabulados, a pesar de que los animales se encuentran en un estatus ovárico similar.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alberio RH, Butler H. (2001). Sincronización de los celos en hembras receptoras. En: Palma GA. Biotecnología de la reproducción. Balcarce, Ed. Palma GA, pp. 61-77.
2. Balla E, Filippi L, Maraña Peña D, Pincinato D, Peres LC, Cutaia L, Veneranda C, Matínez MF, Bó GA. (2006). Efectos de diferentes protocolos de sincronización de la ovulación con dispositivos intravaginales con progesterona sobre el desarrollo folicular y las tasas de preñez en vacas lecheras en lactancia. Jornadas de Actualización en Biotecnologías de la Reproducción en Bovinos, Córdoba, Argentina, pp. 1-11.
3. Bartolome JA, Sozzi A, McHale J, Melendez P, Artech ACM, Silvestre FT, Kelbert D, Swift K, Archbald LF, Thatcher WW. (2005). Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows, II: assigning protocols according to stages of the estrous cycle, or presence of ovarian cysts or anestrus. *Theriogenology* 63:1628-1642.
4. Baruselli OS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. (2004). The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci* 82/83:479-486.
5. Bello NM, Steibel JP, Pursley JR. (2006). Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 89:3413-3424.
6. Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. (1995). Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 43:31-40.
7. Breuel KF, Lewis PE, Inskeep EK, Butcher RL. (1993). Endocrine profiles and follicular development in early-weaned postpartum beef cows. *J Reprod Fertil* 97: 205-212.
8. Bryan MA, Bó GA, Heuer C, Emslie FR. (2010). Use of equine chorionic gonadotrophin in synchronized AI of seasonal-breeding, pasture-based, anoestrus dairy cattle. *Reprod Fertil Dev* 22:126-131.
9. Bulman DC, Lamming GE. (1978). Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. *J Reprod Fertil* 54: 447-458.
10. Burke CR, Mussard ML, Grum DE, Day ML. (2001). Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of estrus and ovulation in cattle with estradiol benzoate. *Anim Reprod Sci* 66:151-160.
11. Canfield RW, Butler WR. (1990). Energy balance and pulsatile LH secretion in early postpartum dairy cattle. *Domest Anim Endocrinol* 7:323-330.
12. Cartmill JA, El-Zarkouny SZ, Hensley BA, Lamb GC, Stevenson JS. (2001). Stage of cycle, incidence, and timing of ovulation, and pregnancy rates in dairy cattle after three timed breeding protocols. *J Dairy Sci* 84:1051-1059.
13. Cavalieri J, Macmillan KL. (2002). Synchronisation of oestrus and reproductive performance of dairy cows following administration of oestradiol benzoate or GnRH during a synchronised pro-oestrus. *Aust Vet J* 80:486-493.
14. Cavalieri J, Hepworth G, Fitzpatrick LA, Shepard RW, Macmillan KL. (2006). Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology* 65:45-64.
15. Cavestany D. (2000a). Resumen de ensayos sobre eficiencia reproductiva en vacas de leche en producción, factores que la afectan y alternativas de manejo para incrementarla (periodo 1992 a 1997). En: Cavestany D. Reproducción. Serie Técnica n° 116, Uruguay, Ed. INIA La Estanzuela, pp. 1-18.
16. Cavestany D. (2000b). Manejo reproductivo en vacas lecheras. Serie Técnica n° 115. Uruguay, Ed. INIA La Estanzuela, 32 p.
17. Cavestany D, Galina CS, Viñoles C. (2001). Efecto de las características del reinicio de la actividad ovárica posparto en la eficiencia reproductiva de vacas Holstein en pastoreo. *Arch Med Vet* 33:217-226.
18. Cavestany D, Cibils J, Freire A, Sastre A, Stevenson JS. (2003). Evaluation of two different oestrus-synchronisation methods with timed artificial insemination and resynchronisation of returns to oestrus in lactating Holstein cows. *Anim Reprod Sci* 77:141-155.
19. Cavestany D. (2005). Manejo Reproductivo en Vacas de Leche ¿Producir o no producir? Revista INIA, n° 4. pp. 1-5.
20. Cavestany D. (2010). Inducción de celos e inseminación artificial en vacas de leche en anestro. una nueva aproximación a un viejo problema. *Taurus* 12: 24-34.
21. Cavestany D, Costa G, Martínez Barbitta M. (2011). Comparación entre dos fuentes de progesterona (dispositivo intravaginal o inyectable subcutánea) incluidas en un protocolo de sincronización de ovulaciones en vacas Holando posparto, tratadas en fase folicular o luteal del ciclo estral. XXXIX Jornadas Uruguayas de Buatría, Paysandú, Uruguay, 258 p.

22. Chebel RC, Santos JEP, Cerri RLA, Galvao KN, Juchem SO, Thatcher WW. (2003). Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Theriogenology* 60:1389-1399.
23. Chebel RC, Santos JEP, Cerri RLA, Rutigliano HM, Bruno RGS. (2006). Reproduction in dairy cows following progesterone insert presynchronization and resynchronization protocols. *J Dairy Sci* 89:4205-4219.
24. Chenault JR, Boucher JF, Dame KJ, Meyer JA, Wood-Follis SL. (2003). Intravaginal progesterone insert to synchronize return to estrus of previously inseminated dairy cows. *J Dairy Sci* 86:2039-2049.
25. Cruz LC, doValle ER, Kesler DJ. (1997). Effect of prostaglandin F2a and gonadotropin releasing hormone induced luteinizing hormone releases on ovulation and corpus luteum function of beef cows. *Anim Reprod Sci* 49:135-42.
26. Cutaia L, Tribulo R, Moreno D., Bó GA. (2003). Pregnancy rate in lactating beef cows treated with progesterone-releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). *Theriogenology* 59:216-216.
27. Darwash AO, Lamming GE, Royal MD. (2001). A protocol for initiating oestrus and ovulation early postpartum in dairy cows. *Anim Sci* 72:539-546.
28. Day ML, Burke CR, Taufá VK, Day AM, Macmillan KL. (2000). The strategic use of estradiol to enhance fertility and submission rates of progestin-based estrus synchronization programs in dairy herds. *J Anim Sci* 78:523-529.
29. de Nava G, Cavestany D. (2000). Efecto de la utilización de dos fuentes de progesterona en el tratamiento del anestro posparto en vacas Holando en producción (resultados preliminares). En: Cavestany D. *Reproducción. Serie Técnica n° 116*. Uruguay, Ed. INIA La Estanzuela, pp. 55-57.
30. de Nava G. (2011). Un manejo reproductivo controlado en tambos del Uruguay. XXXIX Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, pp.35-43.
31. Diskin MG, Austin EJ, Roche JF. (2002). Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 23:211-228.
32. Duchens M, Meléndez P, Moraga L. (2007). Comparación de dos protocolos de sincronización de la ovulación e inseminación a tiempo fijo en vacas lecheras Holstein con exceso de días vacíos. Séptimo Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, pp.252-253.
33. Duffy P, Crowe MA, Boland MP, Roche JF. (2000). Effect of exogenous LH pulses on the fate of the first dominant follicle in postpartum beef cows nursing calves. *J Reprod Fertil* 118:9-17.
34. Duffy P, Crowe MA, Austin EJ, Mihm M, Boland MP, Roche JF. (2004). The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. *Theriogenology* 61:725-734.
35. Fagan JG, Roche JF. (1986). Reproductive activity in postpartum dairy cows based on progesterone concentrations in milk or rectal examination. *Irish Vet J* 40:124-131.
36. García Bouissou R. (2008). Los costos ocultos de la ineficiencia reproductiva. XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, pp.133-135.
37. Garverick HA. (1997). Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci* 80:995-1004.
38. Gatica R. (1993). Causas, incidencia, control y tratamientos de anestro. XXI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, pp. 1-19.
39. Gregory RM, Melo L, Beskow A, Mattos RC, Jobim MIM, Gregory JW. (2009). Dinâmica folicular e uso de hormonioterapias na regulação do ciclo estral na vaca. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, pp.29-35.
40. Gumen AJ, Guenther M, Wiltbank MC. (2003). Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 86:3184-3194.
41. Gutierrez JC, Palomares R, González R, Portillo G, Montero-Urdaneta M, Rubio-Guillen J, Hernández-Fonseca HJ, Soto-Belloso E. (2009). Shortening the postpartum anoestrous interval in suckled crossbred dual purpose cows using progestagen intravaginal sponges plus eCG and PGF2a. *Reprod Domest Anim* 44:48-54.
42. Hanlon DW, Wichtel JJ, Xu ZZ, Burton LJ. (2000). The reproductive performance of anoestrous dairy cows following treatment with progesterone and oestradiol prior to the start of mating. *NZ Vet J* 48:136-143.
43. Hanlon DW, Jarratt GM, Davidson PJ, Millar AJ, Douglas VL. (2005). The effect of hCG administration five days after insemination on the first service conception rate of anoestrous dairy cows. *Theriogenology* 63:1938-1945.
44. Kindahl H, Odensvik K, Aiumlamai S, Fredriksson G. (1992). Utero-ovarian relationships postpartum period. *Anim Reprod Sci* 28:363-369.
45. Kyle SD, Callahan CJ, Allrich RD. (1992). Effect of progesterone on the expression of estrus at first post partum ovulation in dairy cattle. *J Dairy Sci* 75:1456-1460.
46. Lemaire C, Grela C, De María P, Cavestany D. 2012. Indicadores reproductivos en predios lecheros en Uruguay: Resultados de dos años de evaluación. *Veterinaria (Montevideo)* 48:17-22.
47. Lopes FL, Arnold DR, Williams J, Pancarci SM, Thatcher MJ, Drost M, Thatcher WW. (2000). Use of estradiol cypionate for timed insemination. *J Anim Sci* 78(Suppl.):216.
48. López-Gatius F, Yaniz JL, Santolaria P, Murugavel K, Guijarro R, Calvo E, López-Béjar M. (2004). Reproductive performance of lactating dairy cows treated with

- cloprostenol at the time of insemination. *Theriogenology* 62:677-89.
49. Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De la Sota RL, Thatcher WW. (1992). Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci* 70:3615-3626.
50. Lucy MC. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J. Dairy Sci.* 84: 1277-1293.
51. Lucy MC, McDougall S, Nation DP. (2004). The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. *Anim Reprod Sci* 82-83:495-512.
52. Macmillan KL, Day AM. (1987). Treating the non-cycling cow. *Proc Ruakura Farmers Conf* 39:65-68.
53. Macmillan KL, Peterson AJ. (1993). A new intravaginal progesterone releasing device in cattle (CIDR-B) for oestrus synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of anoestrus. *Anim Reprod Sci* 33:1-25.
54. Macmillan KL, Rhodes FM. (1996). Synchrony systems for dairy heifers and cows. *Proc Soc Dairy Cattle Vet NZ Vet Assoc* 13:149-158.
55. Macmillan KL. (2002). Advances in bovine theriogenology in New Zealand. I. Pregnancy, parturition and the postpartum period. *NZ Vet J* 50 (Suppl.):67-73.
56. Macmillan KL, Segwagwe BV, Pino CS. (2003). Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. *Anim Reprod Sci* 78:327-344.
57. Macmillan KL. (2010). Recent advances in the synchronization of estrus and ovulation in dairy cows. *J Reprod Dev* 56:S42-S47.
58. Mapletoft RJ, Martinez MF, Colazo MG, Kastelic JP. (2003). The use of controlled internal drug release devices for the regulation of bovine reproduction. *J Anim Sci* 81(E. Suppl. 2):28-36.
59. Markusfeld O. (1987). Inactive ovaries in high-yielding dairy cows before service: aetiology and effect on conception. *Vet Rec* 121:149-153.
60. Mateus L, Lopez da Costa L, Bernardo F, Robalo Silva J. (2002). Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reprod Domest Anim* 37:31-35.
61. McDougall S. (2001). Reproductive performance of anovulatory anoestrous postpartum dairy cows following treatment with two progesterone and oestradiol benzoate-based protocols, with or without resynchrony. *NZ Vet J* 49:187-194.
62. McDougall S, Cullum AA, Anniss FM, Rhodes FM. (2001). Treatment of anovulatory anoestrous postpartum dairy cows with a gonadotrophin-releasing hormone (GnRH), prostaglandin F2 $\alpha$ , GnRH regimen or with progesterone and oestradiol benzoate. *NZ Vet J* 49:168-172.
63. McDougall S, Loeffler SH. (2004). Resynchrony of postpartum dairy cows previously treated for anestrus. *Theriogenology* 61:239-253.
64. McDougall S, Compton C. (2005). Reproductive performance of anestrus dairy cows treated with progesterone and estradiol benzoate. *J Dairy Sci* 88:2388-2400.
65. McDougall S, Compton CWR, Hanlon DW, Davidson PJ, Sullivan DJ, Gore AH, Anniss FM (2005). Reproductive performance in anestrus dairy cows following treatment with two protocols and two doses of progesterone. *Theriogenology* 63:1529-1548.
66. Melendez P, McHale J, Bartolome J, Archbald LF, Donovan GA. (2004). Uterine involution and fertility of Holstein cows subsequent to early postpartum PGF2 $\alpha$  treatment for acute puerperal metritis. *J Dairy Sci* 87:3238-3246.
67. Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. (2001). Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 84:1646-1659.
68. Morrow DA, Roberts SJ, McEntee K. (1969). Postpartum ovarian activity and involution of the uterus and cervix in dairy cattle. II. Involution of uterus and cervix. *Cornell Vet* 59:190-198.
69. Odde KG. (1990). A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J Anim Sci* 68: 817-830.
70. Opsomer G, Grohn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, de Kruif A. (2000). Risk factors for postpartum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* 53:841-857.
71. Ozturk OA, Cirit U, Baran A, Ak K. (2010). Is Doublesynch protocol a new alternative for timed artificial insemination in anestrus dairy cows. *Theriogenology* 73:568-576.
72. Peter AT, Vos PLAM, Ambrose DJ. (2009). Postpartum anestrus in dairy cattle. *Theriogenology* 71:1333-1342.
73. Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cattle using GnRH and PG. *Theriogenology* 44:915-923.
74. Rajamahendram R, Taylor C. (1990). Characterization of ovarian activity in postpartum dairy cows using ultrasound imaging and progesterone profiles. *Anim Reprod Sci* 22:171-180.
75. Randel RD, Lammoglia MA, Lewis AW, Neuendorff DA, Guthrie MJ. (1996). Exogenous PGF2 $\alpha$  enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. *Theriogenology* 45:643-654.
76. Rhodes FM, McDougall S, Morgan SR, Verkerk GA. (2001). Supplementing treated anoestrous dairy cows with progesterone does not increase conception rates. *NZ Vet J* 49:8-12.
77. Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL. (2003). Invited review: treatment of cows with an extended postpartum anestrus interval. *J Dairy Sci* 86:1876-1918.
78. Roche JF. (2006). The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci* 96:282-296.

79. Ross P, Aller J, Butler H, Callejas S, Albeiro R. (2004). Estradiol benzoate given 0 or 24 h after the end of a progestagen treatment in postpartum suckled beef cows. *Theriogenology* 62:265-273.
80. Rostami B, Niasari-Naslaji A, Vojgani M, Nikjou D, Amanlou H, Gerami A. (2011). Effect of eCG on early resumption of ovarian activity in postpartum dairy cows. *Anim Reprod Sci* 128:100-106.
81. Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM, Wiltbank MC. (2004). Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci* 87:905-920.
82. Sheldon M, Claire Wathes D, Dobson H. (2006). The management of bovine reproduction in elite herds. *The Veterinary J* 171:70-78.
83. Shepard RW. (2005). A comparison of performance of the Ovsynch treatment program between cycling and noncycling cows within seasonally-calving dairy herds. *Aust Vet J* 83:751-757.
84. Souza AH, Viechnieski S, Lima F, Silva FF, Araújo R, Bó GA, Wiltbank MC, Baruselli PS. (2009). Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* 72:10-21.
85. Sterry RA, Welle ML, Fricke PM. (2006). Treatment with gonadotropin-releasing hormone after first timed artificial insemination improves fertility in noncycling lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 89:4237-4245.
86. Stevenson JS, Tiffany SM, Lucy MC. (2004). Use of estradiol cypionate as a substitute for GnRH in protocols for synchronizing ovulation in dairy cattle. *J Dairy Sci* 87:3298-3305.
87. Stevenson JS, Tenhouse DE, Krisher RL, Lamb GC, Larson JE, Dahlen CR, Pursley JR, Bello NM, Fricke PM, Wiltbank MC, Brusveen DJ, Burkhart M, Youngquist RS, Garverick HA. (2008). Detection of anovulation by heatmount detectors and transrectal ultrasonography before treatment with progesterone in a timed insemination protocol. *J Dairy Sci* 91:2901-2915.
88. Tanaka T, Arai M, Ohtani S, Uemura S, Kuroiwa T, Kim S, Kamomae H. (2008). Influence of parity on follicular dynamics and resumption of ovarian cycle in postpartum dairy cows. *Anim Reprod Sci* 108:134-143.
89. Thatcher WW, Patterson DJ, Moreira I, Pancarci M, Jordan ER. (2001). Current concepts for estrus synchronization and timed insemination. *Proc AABP* 34:95-105.
90. Thatcher WW, Moreira F, Pancarci SM, Bartolome JA, Santos JEP. (2002). Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domest Anim Endocrinol* 23:243-254.
91. Thundathil J, Kastelic JP, Mapletoft RJ. (1997). The effect of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular development and ovulation in dairy cattle. *Can J Vet Res* 61:314-316.
92. Twagiramungu H, Guilbault LA, Proulx J, Dufour JJ. (1992a). Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of buserelin and prostaglandin. *Theriogenology* 38:1131-1144.
93. Twagiramungu H, Guilbault LA, Proulx J, Villeneuve P, Dufour JJ. (1992b). Influence of an agonist of gonadotropin-releasing hormone (buserelin) on estrus synchronization and fertility in beef cows. *J Anim Sci* 70:1904-1910.
94. Uslenghi G, Chayer R, Callejas S. (2010). Reproducción en vacas. *Rev vet* 21:55-58.
95. Veneranda G, Filippi L, Racca D, Cutaia L, Bó GA. (2008). Pregnancy rates in dairy cows treated with intravaginal progesterone devices and GnRH or estradiol benzoate and eCG. *Reprod Fertil Dev* 20:91-91.
96. Walsh R, Walton J, Leslie K, LeBlanc S. (2005). Prevalence and risk factors for postpartum anestrus in dairy cattle. *J Dairy Sci* 90:315-324.
97. Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim. Reprod Sci* 123:127-138.
98. Wathes DC, Bourne N, Cheng Z, Mann GE, Taylor VJ, Coffey MP. (2007). Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *J Dairy Sci* 90:1310-1325.
99. Wiltbank MC, Gumen A, Sartori R. (2002). Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57:21-52.
100. Wiltbank MC, Gumen A, Lopez H, Sartorio R. (2007). Manejo y tratamiento de vacas de leche no cíclicas o con quistes foliculares. VII Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, pp. 114-130.
101. Xu ZZ, Burton LJ, Macmillan KL. (1997). Treatment of postpartum anoestrous dairy cows with progesterone, oestradiol and equine chorionic gonadotrophin. *NZ Vet J* 45:205-207.
102. Xu ZZ, Burton LJ. (2000). Estrus synchronization of lactating dairy cows with GnRH, progesterone, and prostaglandin F2 alpha. *J Dairy Sci* 83:417-476.
103. Xu ZZ, Burton LJ, McDougall S, Jolly PD. (2000). Treatment of Noncyclic Lactating Dairy Cows with Progesterone and Estradiol or with Progesterone, GnRH, Prostaglandin F2α and Estradiol. *J Dairy Sci* 83:464-470.
104. Zhang J, Deng LX, Zhang HL, Hua GH, Zhu Y, Meng XJ, Yang LG. (2010). Effects of parity on uterine involution and resumption of ovarian activities in postpartum Chinese Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 93:1979-1986.
105. Yaniz JL, Murugavel K, López-Gatius F. (2004). Recent developments in oestrous synchronization of post-partum dairy cows with or without ovarian disorders. *Reprod Domest Anim* 39:86-93.



# Reporte de un caso de actinobacilosis enzoótica en vaquillonas Holando en sistema pastoril\*



## Case Report of Enzootic Cutaneous Actinobacillosis in Dairy Heifers in a Pasture-based Production System

Albornoz L.<sup>1</sup>; Sali G.<sup>2</sup>

### RESUMEN

Se describe por primera vez un caso de Actinobacilosis Cutánea Enzoótica (ACE) en el Uruguay. El diagnóstico se realizó en un establecimiento lechero ubicado en el Departamento de San José, paraje Belastiquí. Los animales afectados ocupaban una superficie de 280 Hectáreas, potreros de costa con flora nativa (*Acacia caven* (Espinillo), *Celtis espinosa* (Tala) y *Scutia buxifolia* (Coronilla). Los animales afectados eran 42 (14,5%) de un total de 290 vaquillonas de la raza Holando entre 14 y 18 meses de edad, sin reportarse mortalidad. La sintomatología que presentaban los animales se caracterizaba por un engrosamiento de la piel que posteriormente da forma a un granuloma ulcerado, fistulado y supurante en todos los casos ubicado en la zona submandibular y cervical; el diagnóstico se confirmó por histopatología y la identificación por aislamiento y métodos standard. Se realizaron cuatro tratamientos en base a yoduro de sodio, enrofloxacin, ceftiofur y cirugía todos con buen resultado. Ante la imposibilidad de retirar los animales de la pastura se recomendaron medidas preventivas (disminuir la dotación de animales por hectárea, mejorar la higiene ambiental) y tratamiento precoz en los animales enfermos.

**Palabras clave:** Actinobacilosis, granuloma, bovino de leche

### SUMMARY

We describe for the first time in Uruguay a case of enzootic cutaneous actinobacillosis is described, without the precedence of notified disease in Uruguay. The diagnosis was done in a dairy farm located in Belastiquí, San Jose, Uruguay. The affected animals grazed an area of 280 hectares, in a river side field with native flora *Acacia caven* (Espinillo), *Celtis espinosa* (Tala) and *Cutia buxifolia* (Coronilla). Affected animals were 42 (14.5%) of a herd of 290 Holstein heifers, with an age of 14 to 18 months, without reports of mortality. The symptomatology presented by the animals was characterized by the thickening of the skin that later on transformed into an ulcerated, fistulised and suppurate granuloma, in all cases in the submandibular and cervical area. The diagnosis was confirmed by histopathology and the identification was achieved by isolation and standard methods. Four treatments based on sodium iodide, enrofloxacin, ceftiofur and surgery were utilized, all resulting in positive responses. In the impossibility of removing the cattle from the pasture it was recommended to take preventive measures (decrease the amount of animals per ha, improve the environmental hygiene) and the early treatment of affected animals.

**Key words:** Cutaneous Actinobacillosis, granuloma, dairy cows

### INTRODUCCIÓN

La Actinobacilosis Cutánea Enzoótica (ACE) es causada por *Actinobacillus lignieresii*, que penetra por lesiones cutáneas, tiene curso crónico y se caracteriza por producir excrecencias granulomatosas, ulcerantes y fistuladas en vasos linfáticos y linfonódulos superficiales. La actinobacilosis pertenece a las patologías de tipo actinogranulomatoso como la actinomycosis, de la cual se diferencia además de por su etiología (*Actinomyces bovis*) porque en el caso de la actinobacilosis están interesados prevalentemente los tejidos blandos (piel y subcutáneo) y el origen de la infección es externa, por penetración del agente infeccioso (*Actinobacillus*) a través de lesiones cutáneas, mientras en la actinomycosis se encuentran interesados prevalentemente los tejidos duros (huesos) y es causada por alimentación con forrajes duros e irritantes que vehiculizan al agente infeccioso. En general el pronóstico es más favorable para la actinobacilosis que para la actinomycosis.

El objetivo de este trabajo es la presentación del caso clínico, su diagnóstico clínico y etiológico y el ensayo de varios tratamien-

tos. Reviste un interés particular ya que esta enfermedad no ha sido descrita en el país.

### PRESENTACIÓN DEL CASO CLÍNICO

Se consultó por el caso clínico durante el mes de noviembre de 2011 en un establecimiento lechero ubicado en el departamento de San José, paraje Belastiquí. Los animales ocupaban una superficie de 280 hectáreas, potreros de costa sobre el río Santa Lucía con abundante flora nativa, *Acacia caven* (Espinillo), *Celtis espinosa* (Tala) y *Scutia buxifolia* (Coronilla). Los animales afectados fueron 42 vaquillonas de un total de 290 animales Holando entre 14 a 18 meses de edad. La morbilidad alcanzó un 14,5% y no se reportaron casos de mortalidad.

### Patogenia

El agente etiológico está distribuido como saprófito en el medio ambiente pero puede colonizar heridas en la piel y convertirse en patógeno. Las lesiones cutáneas se ubican preferentemente en cabeza y cuello aunque también se describe en la parte distal

\*El presente trabajo ha estado aceptado como comunicación corta al XLIV Congreso Nacional de la Sociedad Italiana de Buiatria en Piacenza (20-21 Abril 2012).

<sup>1</sup>DV, MSc, Ejercicio liberal, Uruguay.

<sup>2</sup>Centro Studi «Clinica Veterinaria San Francesco», San Nicolò, Trentino (PC), Italia.

Recibido: 18/6/12 Aprobado: 26/9/12

de los miembros. Pueden ser de naturaleza puramente casual (enfermedad individual) o, cuando se encuentra en determinadas localizaciones del cuerpo, pueden ser causadas por condiciones de manejo; en este último caso referidas a una enfermedad de tipo colectivo. La bibliografía consultada cita como ejemplo cuando los animales, por defecto de las instalaciones, sufren traumas repetidos por comer o beber en los mismos sitios, padecen idénticas lesiones al chocar o raspar con sitios comunes como bebederos o comederos. Todo esto favorece la distribución del germen por el estrecho contacto de los animales enfermos con los sanos.

En el caso clínico que nos ocupa la situación no es exactamente la que describe la bibliografía, en este caso los animales pastoreaban en un potrero de costa con abundante flora nativa y en consecuencia abundantes espinas. Nuestra hipótesis es que el microorganismo penetró en la piel por lesiones cutáneas producidas por las espinas de los árboles (Figura 1).



**Figura 1.** Vegetación espinosa constituida esencialmente por *Acacia caven*, *Celtis espinosa* y *Scuta boxifolia*.

### Síntomas

En la puerta de entrada de la infección se desarrolla al principio un engrosamiento duro de la piel y subcutáneo que generalmente pasa inadvertido, luego este se absceda y se abre bajo la forma de un granuloma ulcerado y fistulado, supurante en su superficie y de fácil sangrado. A continuación el linfonódulo se agranda permaneciendo frío e insensible, se fistula y supura, el pus, excretado en muy pequeños volúmenes, es espeso, gris amarillento e inodoro. La totalidad de las lesiones se encuentran en la zona submandibular y cervical (Figura 2).

### Curso

Es de curso crónico y paulatinamente va invadiendo otros linfonódulos superficiales según la bibliografía consultada también puede colonizar órganos internos (músculos vecinos, lengua, linfonódulos mediastínicos, pulmones, linfonódulos mesentéricos, hígado, etc.) en estos casos el desmejoramiento del estado general puede llevar al animal a la muerte.



**Figura 2.** Tumefacciones subcutáneas prevalentemente no ulceradas situadas entre el cuello y la cabeza

### Diagnóstico

El cuadro clínico permite realizar un diagnóstico presuntivo el cual debe confirmarse mediante el examen histológico y el aislamiento microbiológico. En nuestro caso en el examen histológico se observa, según el informe del Servicio de Diagnóstico Patológico Integral del DILAVE, múltiples granulomas con una zona central constituida por una formación hialina homogénea y amorfa, en cuya periferia se observa una disposición radiada, característica de los actinogranulomas. Rodeando estas formaciones se observa abundante exudado compuesto principalmente de neutrófilos y escasas células epitelioides gigantes y tejido fibroso. En cuanto al resultado bacteriológico, también realizado en el DILAVE, se aísla *Actinobacillus lignieresii*, la identificación se realiza por aislamiento y métodos estándar, según Cini-cal Vet. Microb. Quinn, Carter, Markey, Carter, cap 21.

Se procede a la realización de antibiograma siendo su resultado:

**Sensible a:** Fluorfenicol, Amoxicilina, Enrofloxacina y Cefalexina

**Resistente a:** Gentamicina, Trimetoprim-sulfamida, Ampicilina, Penicilina, Estreptomina y Oxitetraciclina

### Pronóstico

Las lesiones actinobacilares superficiales y pequeñas pueden curar totalmente, sobretodo bajo correcto tratamiento médico o quirúrgico, pero muchas veces los animales no se tratan debido a la falta de un diagnóstico preciso. La actinobacilosis cutánea extensa y de larga duración tiende a extenderse mediante metástasis en el mismo animal, el cual permanece como portador y representa un peligro para todo el rodeo.

### Tratamiento

En el caso de que los nódulos actinobacilares resulten accesibles a la cirugía se recomienda realizar la extirpación (Figura 3).



Figura 3. Procedimiento quirúrgico para extirpación del nódulo.

Como tratamiento sistémico único o adicional al anterior se puede aplicar yoduro de sodio o antibióticos. A fines de investigación utilizamos cuatro tratamientos diferentes: en base a yoduro de sodio, enrofloxacina, ceftiofur y cirugía en todos los animales tratados se logró muy buen resultado (Cuadro 1).

### Profilaxis

La bibliografía cita la eliminación o aislamiento estricto de los animales enfermos. Limpieza o desinfección de las instalaciones o herramientas que puedan considerarse como punto de partida de la enfermedad y cuidar la no introducción de animales enfermos. En nuestro caso, y ante la imposibilidad de retirar los animales del pasto, recomendamos algunas medidas preventivas como: disminuir la dotación de animales por hectárea, mejorar la higiene ambiental y tratamiento precoz en los animales enfermos.

### DISCUSIÓN

La importancia de este caso radica que es el primer diagnóstico clínico y etiológico de la enfermedad en el país. Se ensayaron cuatro tratamientos los cuales resultaron exitosos. Se realiza una hipótesis sobre la ocurrencia de la enfermedad y se plantean posibles medidas de prevención.

### CONCLUSIÓN

Creemos necesario llamar la atención de los colegas ante el caso de esta enfermedad que es de fácil tratamiento y su diagnóstico a tiempo puede mejorar la salud del animal y evitar pérdidas económicas. Respecto a las pérdidas económicas no son fáciles de evaluar, podemos indicar que esas vaquillonas de buen mérito genético se pensaban vender cosa que no se pudo realizar ya que la apariencia de los animales no era buena.

Cuadro 1. Primeros casos tratados después del diagnóstico y resultados obtenidos.

| Casos | Tratamiento            | Dosis                       | Positivo | Negativo |
|-------|------------------------|-----------------------------|----------|----------|
| 4     | Ioduro de Sodio i/v    | 30 g 1 vez                  | 4        | 0        |
| 4     | Enrofloxacina i/m      | 10 g c/24 h durante 3 días  | 4        | 0        |
| 4     | Ceftiofur i/m          | 0.5 g c/24 h durante 3 días | 4        | 0        |
| 3     | Extirpación quirúrgica |                             | 3        | 0        |

### BIBLIOGRAFÍA

1. Abdirahman OM. (1991). Gross and histopathological aspects of *Actinobacillus lignieresii* infection in cattle slaughtered in Somalia. Abstracts. Archivo Veterinario Italiano 42: 222-227
2. Cubeddu GM. (1989). ATTI Società Italiana di Buiatria vol XXI.
3. de Kruif A, Mijten P, Haesebrouck F, Hoorens J, Devriese L. (1992) Actinobacillosis in bovine cesarian sections. Vet Rec 131:414-415.
4. Dirksen G, Gruender HD, Stoeber M. (2.004). Medicina Interna e Chirurgia del Bovino. Giovanni Sali. Le Point veterinaire Italie.
5. Hofman B, *et all.* (1991). Ueber eine enzootisch auftretende Aktinobazillose beim Rind-Prakt. Tierarzt 72, Sondernummer Collegium veterinarium 4,7.
6. Milne M. (2001). Clinical recognition and treatment of bovine cutaneous actinobacillosis. Vet Rec 148:273-274.
7. Niederauer, R. *et all.* (1992) Determinacao da Etiologia de Granulomas Actinomicoides em Bovinos no Rio Grande do Sul a traves da Histoquímica, PesqVet Bras. 12:71-76.
8. Radostits OM, Gay C, Blood DC, Hinchcliff K. (1999). Medicina Veterinaria, Vol. II. 9a Ed McGaw-Hill. Interamericana pp 1107-1109.
9. Sali G, Bernizzoni R. (1995). Actinomicosi bovina: contributo patogenetico in un focolaio enzootico. Atti Società Italiana di Buiatria, pp 387-390.





Veterinaria (Montevideo) tiene un sistema de arbitraje externo (peer review) ciego simple. Todos los trabajos recibidos son enviados a dos árbitros de reconocida experiencia en el tema.

Los trabajos recibidos que incluyan experimentación animal, deberán detallar claramente su ajuste a las normas internacionales de ética, así como una declaración que el mismo ha sido elaborado respetando las recomendaciones internacionales sobre investigación clínica (declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, revisión 1996) o, si fuera el caso, sobre investigación con animales de laboratorio.

## NORMAS GENERALES

Los trabajos se enviarán **exclusivamente** por correo electrónico a: [revistavet@yahoo.com](mailto:revistavet@yahoo.com)

Se aceptan artículos en portugués o inglés, los cuales deben incluir un resumen en inglés y español. El texto debe ser en formato «DOC» o «RTF» y no deberá exceder de 25 páginas tamaño A4 (incluidas referencias), con margen de 2,5 cm a cada lado, de preferencia en letra Times New Roman y con caracteres de 12 puntos, con interlineado doble y numeración continua de líneas.

Los cuadros (se recomienda usar la palabra cuadro y no tabla) y figuras (se recomienda usar la palabra figura y no gráfica) deben ir al final del manuscrito (cada una en hoja aparte). Las leyendas de los cuadros van arriba de los mismos y deben ser autoexplicativas. Las leyendas de las figuras también deben ser autoexplicativas y van aparte de las mismas, en una hoja a continuación de la bibliografía y antes de los cuadros y figuras. Los cuadros deben ser simples, con líneas horizontales de color negro. En las figuras (cuando corresponda) utilizar tramas en blanco y negro y no en colores.

Se incluirán fotografías o impresiones pueden ser en color o en blanco y negro (con 300 dpi de resolución como mínimo), en un máximo de cinco que serán adjuntadas al original, con leyenda en hoja aparte.

El autor principal o de correspondencia deberá enviar una nota firmada por él y los demás autores por correo electrónico o por fax (2409 9458) indicando dirección postal completa, teléfono, fax y correo electrónico, dejando establecido que se responsabilizan del contenido del trabajo y que el mismo no se ha publicado ni se ha remitido simultáneamente a ninguna otra publicación periódica. También deberá indicar el tipo de trabajo (Científico o Técnico). Se aceptarán trabajos que hubieran sido publicados como resúmenes en congresos, simposios o jornadas.

Los trabajos recibidos serán leídos por el Editor Jefe, quien designará dos árbitros para su evaluación, pudiendo darle los destinos siguientes: aceptarlos, devolverlos a los autores para su adecuación o rechazarlos.

Sin perjuicio de la solicitud del autor, el Editor Jefe clasificará los manuscritos recibidos en:

1. Trabajo Científico: artículo original, comunicación corta (reporte o caso clínico), revisión.

2. Trabajo Técnico o de Difusión o Nota Técnica (práctica veterinaria, diagnóstico, tecnológico, conferencia).

3. Comunicaciones cortas; no deberán exceder las 12 páginas.

4. Reportes de casos clínicos; no deberán exceder las 10 páginas.

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. Una vez publicados, los autores recibirán 10 separatas.

## 1. Trabajos Científicos

Es una publicación 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 especialistas en el tema, nacionales y/o internacionales y que tengan una trayectoria reconocida, dada por sus antecedentes de publicaciones en revistas arbitradas de primer nivel. Las revisiones que tengan un análisis crítico por parte del autor e incluyen experiencia propia se consideran trabajos científicos.

## 2. Trabajos Técnicos

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 Editor Jefe evaluará el trabajo y lo clasificará según su contenido en: Prácticas Veterinarias, Caso Clínico, Diagnóstico, Tecnológico, Conferencia, Educación, u otro según corresponda. Estos trabajos serán evaluados por dos árbitros con reconocida experiencia en el tema.

## NORMAS DE REDACCIÓN PARA ARTÍCULOS ORIGINALES

Contendrán los siguientes elementos:

**Título:** Será breve y claro, reflejando exactamente lo que el trabajo contiene. Escrito en minúsculas. Se debe incluir el título en inglés a continuación del título en español.

**Nombre de Autores:** Apellido Inicial del nombre, otro/s nombres ejemplo: Vidal L.<sup>1</sup>, Gómez, J.<sup>2\*</sup>

**Dirección:** (en pie de página): ejemplo: <sup>1</sup>Departamento de Bovinos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Suipacha 698, Buenos Aires, Argentina; <sup>2</sup> Departamento de Bovinos, Facultad de Veterinaria, UdelaR. Se detallará solamente la dirección postal completa del autor responsable o de correspondencia, para los demás autores solamente el nombre de la institución. \*Autor para correspondencia (incluir correo electrónico).

### Resumen

Dará una idea clara y precisa del contenido del artículo, conteniendo: objetivos, metodología, resultados, conclusión. No debe exceder las 250 palabras, escrito en español y en un sólo párrafo luego del encabezado del título y los autores. Debe estar escrito en tiempo pasado. A continuación se incluyen las Palabras clave (máximo cinco).

### Summary

Es la traducción al Inglés del Resumen. Incluir keywords.

### Resumo

Para artículos en portugués. Incluir Palavras-chave

### Introducción

Debe ser concisa, pero 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 internacional y nacional, eligiendo las informaciones más recientes y más relevantes. Se recomienda evitar una revisión excesivamente detallada de la literatura o un mero resumen de los resultados obtenidos por otros autores. En lugar de esto, se deben dar los fundamentos científicos del estudio y definir claramente las hipótesis de trabajo, a fin de justificar la importancia del artículo. En el último párrafo deben precisarse los objetivos del trabajo.

### Materiales y métodos

Los autores deben dar suficientes detalles para que otro investigador pueda repetir los experimentos. Debe estar escrito en tiempo pasado y en tercera persona del singular o plural según corresponda. Describir claramente el diseño experimental así como los animales

da. Describir claramente el diseño experimental así como los animales utilizados, su número, especie, género, raza, edad. Mencionar los reactivos, drogas o medicamentos por su nombre genérico o químico o por marcas comerciales patentadas. Los métodos y procedimientos deben ser bibliográficamente referenciados detallando las posibles modificaciones de las técnicas. Deben precisarse con claridad, tiempos, temperaturas, etc. En caso de procedimientos con animales, se debe mencionar si los mismos fueron realizados de acuerdo a las normas de la autoridad competente (CHEA, etc.). Los métodos de los análisis estadísticos deben plantearse claramente, incluyendo los efectos considerados, las observaciones y unidad/es experimental/es. Se sugiere incluir los modelos utilizados. Deberán indicarse los niveles de probabilidad utilizados para declarar diferencias significativas y/o tendencias.

### Resultados

La descripción de los resultados obtenidos debe presentarse con claridad y en la forma más concisa posible. Primeramente hacer una descripción general de los mismos y luego pueden describirse en cuadros o figuras los datos de los experimentos. No deben presentarse datos repetidos o demasiado extensos. Deben usarse medidas del sistema métrico decimal u otras medidas convencionales. En todos los resultados debe señalarse el nivel de significación. Debe estar escrito en tiempo pasado y en tercera persona del singular o plural según corresponda.

### Discusión

La discusión consiste en la búsqueda de una explicación de los resultados obtenidos, para lo cual se recurre a la comparación con datos de la literatura. Debe evitarse la repetición de los resultados en este ítem. 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

Las conclusiones deben ser claras, concisas y precisas y deben reflejar los datos presentados en función de las hipótesis y los objetivos planteados. Se deben resumir y globalizar las conclusiones parciales que se obtuvieron de diferentes resultados del trabajo. Evitar las conclusiones demasiado generales. Debe existir una total coherencia entre los objetivos, los resultados y las conclusiones, pudiendo incluirse en este ítem recomendaciones o implicancias del trabajo.

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

### Bibliografía

En el **texto**: El autor o autores (si son dos), el apellido de cada uno separados por «y», seguido de coma y el año de publicación (Ejemplo: González y Rodríguez, 2005). Si son más de tres autores se usará la forma «y col.», seguida del año de publicación (Ejemplo: Riet-Correa y col., 1984). En los casos en que se referencie más de una cita, se ordenarán alfabéticamente y se separarán por punto y coma. Las citas que se utilicen como respaldo no deberían ser más de cuatro para cada contenido.

En la **Bibliografía** debe ponerse especial atención al texto de las referencias bibliográficas, no se aceptarán trabajos mal referen-

ciados. 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 un espacio y luego la(s) inicial(es) seguida(s) de coma. Ej.: González R. Si hubiera varios autores deben separarse entre sí por una 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 (sin punto en las abreviaturas), seguido por el volumen y los números de páginas precedidos por dos puntos. Ejemplo: Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JL. (2002). Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. J Small Anim Pract 43:240-246.

En el caso de la cita de libros, se indicará Autores (Año) Título, número de edición (salvo la primera), ciudad 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, En: 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.

**Cuadros** Los cuadros deben tener un número de identificación correlativo que figurará en el texto y contendrán un texto de título en la parte superior. La leyenda debe situarse encima del cuadro y debe ser autoexplicativa. Los cuadros deben ser simples, sin líneas verticales y líneas horizontales separando título de las columnas de datos y en color negro. Las referencias o símbolos de los cuadros se presentarán al pie del mismo en letra 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** Las figuras deben tener un número de identificación correlativo que corresponda con el texto y contener un texto de definición del contenido, con leyendas y definición de los símbolos utilizados. Las leyendas deben ser autoexplicativas y se situarán en hoja aparte de las figuras, a continuación de la bibliografía y antes de cuadros y figuras. En histogramas o gráficas de líneas usar sólo el blanco y negro y diferenciar barras con diferentes tramas y líneas punteadas, sólidas, etc. Si la figura no es original, citar la fuente (Autor y año) en pie de página.

Los cuadros y figuras deben ser enviados en blanco y negro. En lo posible en formato Openoffice o MSOffice o RTF.

**Fotos** Las fotografías deben limitarse al mínimo indispensable y deben contener una escala de referencia. Deben tener un número 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. La SMVU podrá cobrar a los autores por la inclusión de material fotográfico.