

Anales de Veterinaria de Murcia

Volumen 34 (2018)

Anales de Veterinaria de Murcia

Volumen 34 (2018)

ANALES DE VETERINARIA

COMITÉ DE REDACCIÓN:

Editora: Fuensanta Hernández Ruipérez. Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia

Secretario: Antonio J. Buendía Marín. Departamento Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas. Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia.

COMITÉ EDITORIAL:

MIEMBROS NACIONALES

María Paz Carrasco Jiménez, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada.

Francisco Fernández Belda, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Murcia.

Maria del Carmen Frontela Saseta, Departamento Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Ciencias Sociosanitarias, Universidad de Murcia, Murcia.

Juan Diego García Martínez, Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Murcia.

María Magdalena Garijo Toledo García, Departamento de Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria, Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad CEU Cardenal Herrera, Valencia.

Isabel Acosta García, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Córdoba.

Fernando Henao Dávila, Bioquímica y Biología Molecular y Genética, , Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Cáceres.

Andrés Luis Martínez Marín, Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Córdoba.

María Dolores Megias Rivas, Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Murcia.

MIEMBROS EXTRANJEROS

Luis Delucchi, Departamento de Patología y Clínica de Pequeños Animales, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República de Uruguay, Montevideo.

ÍNDICE - CONTENTS

ARTÍCULOS ORIGINALES

ALCÁZAR, E. et al.: Desafíos para la salud de las vacas durante el periodo de transición. Uso de monensina.....	7
LOZANO-PICAZO, C. et al.: Especies reactivas de oxígeno y su implicación en biomedicina	17
CANDEL-PÉREZ, C. et al.: Evaluación del efecto antimicrobiano de una mezcla de probióticos frente a <i>Cronobacter sakazakii</i> y <i>Salmonella enterica</i> en preparados reconstituidos para lactantes	27
ALONSO DE VEGA, F.D. et al.: Helmintos gastrointestinales en liebres (<i>Lepus granatensis</i>) del sureste de la península ibérica	39
PELLEGRINO, F.C.: Presunta parálisis periódica hipercalémica con miotonía en perros Shi-Tzú y Pastor Alemán	49
RESÚMENES TRABAJOS FIN DE GRADO 2017-2018.....	67

DESAFÍOS PARA LA SALUD DE LAS VACAS DURANTE EL PERIODO DE TRANSICIÓN. USO DE MONENSINA

Monensin in transition dairy cows

Alcázar, E.*; Martínez, S.; Madrid, J.; Larrosa, P.; Hernández, F.

Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria. Campus de Espinardo, Universidad de Murcia, 30100, Murcia. España.

* **Autor para correspondencia:** Alcázar Triviño, Estefanía. Tel: 630455982. Email: estefania.alcazar@elbarranquillo.es

Historial del artículo:

Recibido: 14 de mayo, 2018

Aceptado: 11 de noviembre, 2018

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión de los efectos derivados del uso de monensina como alternativa para afrontar con mayor éxito el periodo de transición en vacas lecheras. En las vacas de leche, la transición de la preñez al inicio de la lactación es un periodo crítico que se caracteriza por presentar una mayor incidencia de enfermedades. En este periodo, el riesgo de que se presenten trastornos metabólicos y enfermedades está relacionado con el balance energético negativo en el que se encuentra la vaca, hecho que conlleva una movilización de nutrientes desde las reservas tisulares. Una de las posibles soluciones para mejorar el balance de nutrientes durante el periodo de transición consiste en administrar ionóforos como la monensina que actúan modificando la población microbiana del rumen. Los efectos beneficiosos de la monensina se han asociado a la producción de precursores gluconeogénicos a nivel ruminal, lo que originaría mayor disponibilidad de glucosa y la consiguiente mejora del estatus energético. Con el uso de monensina, a nivel sanguíneo se ha observado un descenso de β -hidroxibutirato, y ácidos grasos no esterificados. También han sido atribuidos efectos beneficiosos sobre la funcionalidad hepática, la absorción de ciertos minerales, la función inmune y la excreción de metano.

En definitiva, el efecto positivo de la MON sobre el balance energético y la utilización de nutrientes reduciría la movilización de reservas tisulares, minimizando el riesgo de desórdenes metabólicos, mejorando la salud y por tanto el rendimiento de la vaca lechera.

Palabras clave: ionóforos, metabolismo ruminal, vacas de leche.

ABSTRACT

The aim of this research was to carry out a review of the use of monensin in dairy cows as a choice to approach more successfully the transition period. In dairy cows, the transition for the pregnancy to the beginning of lactation is a critical period which is characterized by display a higher incidence of diseases. The risk of metabolic disorders and other diseases during this time is allied to the state of negative energy balance in which the cow is, fact that involves a mobilization of nutrients from the tissue reserves. One of the possible solutions to improve the nutrient balance during the transition period is based on dispense ionophores such as monensin who modify the microbial population of the rumen. The beneficial effects of monensin have been associated with the production of gluconeogenic precursors at the ruminal level which would lead to greater availability of glucose and the consequent improvement of the energetic status. At the blood level it has been noted a decrease of β -hydroxybutyrate and non-esterified fatty acids. Beneficial effects have also been attributed to liver function, absorption of certain minerals and immune function.

In brief, the positive effect of monensin on the energy balance and the use of nutrients would reduce the mobilization of tissue reserves, playing down the risk of metabolic disorders, improving the health and therefore the performance of the dairy cow.

Key words: ionophores, ruminal metabolism, dairy cow.

INTRODUCCIÓN

El sector lácteo europeo y nacional, se encuentra actualmente en una difícil situación, consecuencia del desequilibrio del mercado y de la caída de los precios pagados a los productores. Desde el 1 de abril de 2015, con el final de la cuota láctea, la producción se encuentra liberalizada, no existiendo una restricción de la producción en los estados miembros de la Unión Europea que corrija el desequilibrio existente entre la oferta y la demanda de leche. Por tanto, el sector lácteo tiene que hacer frente a una gran volatilidad del precio de la leche, además del impacto de la variabilidad del precio de la energía y de las materias primas (MARM, 2016). Así, los productores necesitan abordar estrategias que mejoren su competitividad. En este sentido, la salud de las vacas es crucial para la rentabilidad de una explotación, ya que va a determinar su producción y su longevidad, y por tanto el periodo en el que el ganadero podrá amortizar su inversión.

DESAFÍOS METABÓLICOS DURANTE EL PERIODO DE TRANSICIÓN

Uno de los momentos más críticos en el ciclo productivo de la vaca lechera es el periodo de transición, definido como el periodo entre las tres semanas previas al parto y las tres semanas posteriores (Grummer, 1995). En el periodo de transición se combinan condiciones que comprometen la salud de la vaca, como son: una disminución de la ingesta de alimento que coincide con un aumento de los requerimientos de nutrientes (Ingvarsen & Andersen, 2000); un aumento en la demanda de calcio con el inicio de la lactación (Horst, 1986); el estrés asociado al parto y cambios del lote; cambios endocrinos asociados al inicio del parto, lactogénesis y reanudación de la ciclicidad ovárica; y cambios en la dieta y en el comportamiento asociado al consumo de alimento (Kessel, Strohel, Meyer, Hiss, Sauerwein, Schwarz & Bruckmeyer, 2008).

La importancia de este periodo se ha reconocido en numerosos artículos, ya que es donde

se presenta una mayor incidencia de enfermedades (mastitis, cetosis, trastornos digestivos, cojeras, etc.) (Ingvarlsen, Dewhurst & Friggens, 2003). Además, los problemas de salud de la vaca normalmente no son eventos aislados, sino que un trastorno primario de salud suele desencadenar una secuencia de trastornos en cascada. Por ejemplo, las vacas con excesiva condición corporal en el periodo seco tienen más probabilidad de desarrollar hígado graso (Bobe, Young & Beitz, 2004) o de sufrir hipocalcemia (Houe, Ostergaard, Thilsing-Hansen, Jorgensen, Larsen, Sorensen, Agger & Bloom, 2001; Ostergaard, Sorensen & Houe, 2003). A su vez, la hipocalcemia exacerba la inmunosupresión (Ducousin, Uzuka, Satoh, Otani, Nishimura, Tanabe & Sarashina, 2003; Kimura, Reinhardt & Goff, 2006), y puede afectar a la eficiencia reproductiva, ya que las vacas que experimentan hipocalcemia presentan un mayor riesgo de enfermedad uterina y un retraso en la primera ovulación postparto (Witthoford & Sheldon, 2005).

Por tanto, el éxito con el que la vaca atraviese el periodo de transición va a condicionar su productividad durante la lactación. Sin embargo, dicha productividad no solo se debe al descenso de la producción sino también a la eliminación de animales a causa de la presentación de enfermedades durante este periodo tan crítico. Por otro lado, para lograr el objetivo económico de preñez dentro de los 120 días tras el parto, se debe restablecer un ciclo estral regular, el cual es el resultado de un complejo de interacciones y de señalizaciones endocrinas entre cerebro, hígado, ovarios y útero (Wathes, Fenwick, Cheng, Bourne, Llewellyn, Morris, Kenny, Murphy & Fitzpatrick, 2007). Por ello, los trastornos que tienen lugar en el periodo de transición tienen consecuencias sobre la rentabilidad del productor mucho después de que esta fase finalice.

Durante la lactación temprana, la glándula mamaria exige un requerimiento de nutrientes superior al que es capaz de obtener a través de la ingestión de alimento, originando una si-

tuación de balance energético negativo. Como consecuencia, la deficiencia de nutrientes se satisface mediante la movilización de reservas corporales (lípidos, proteínas, glucógeno y minerales) (Sovani, Heuer, Van Straalen & Noordhuizen, 2000). Actualmente, existe una fuerte selección genética en las vacas de leche a favor de su capacidad para aumentar su producción convirtiéndolas en verdaderas “atletas metabólicas”, como las denominan Chalupa y Harrison (1996).

Según la curva de producción de leche estándar en la vaca (Figura 1), tras el parto, se espera que la producción aumente hasta alcanzar el pico de máxima producción, momento a partir del cual comienza a descender. Por ello, la condición corporal (CC) va disminuyendo durante los primeros 2-3 meses, hasta el punto en que la vaca empieza a consumir suficiente para la producción y la CC comienza a recuperarse (Coffey, Simm, Hill & Brotherstone, 2003).

La repercusión del balance energético negativo puede verse reflejado en las concentraciones circulantes de ácidos grasos no esterificados (NEFA) y β -hidroxibutirato (BHB) (LeBlanc, 2010). La concentración de NEFA refleja la magnitud de movilización de grasa desde los depósitos corporales y el nivel de ingesta de alimento (Adewuyi, Gruys & Van Eerdenburg, 2005). Los cuerpos cetónicos (BHB, acetona y acetoacetato) son los metabolitos intermedios de la oxidación de ácidos grasos a acetyl CoA; así, el BHB refleja en qué grado se completa la oxidación de grasa en el hígado (LeBlanc, 2010). Conforme el aporte de NEFA al hígado supera la capacidad del hígado para oxidar completamente los ácidos grasos para aportar energía, la producción de cuerpos cetónicos aumenta (LeBlanc, 2010).

La dificultad en la adaptación al balance energético negativo puede predisponer a una variedad de enfermedades (Herdt, 2000), a una reducción de la eficiencia reproductiva (Buckley, O’Sullivan, Mee, Evans & Dillon, 2003; Leroy, Vanholder, Mateusen, Christopher, Op-

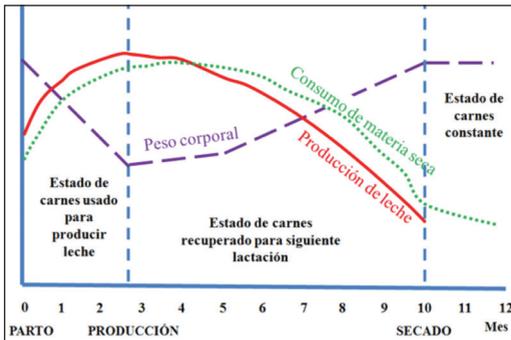


Figura 1. Variación en el consumo de materia seca, producción de leche y peso vivo durante la lactación de una vaca. (Adaptado de Chamberlain y Wilkinson, 2002)

somer, De Kruif, Genicot & Van Soom, 2005; Leblanc, 2008), y a una exacerbación de la inmunosupresión en el periparto (Van Knegsel, De Vriesreilnigh, Meulenberg, Van Den Brand, Dijkstra, Kemp & Parmentier, 2007). Así, según LeBlanc (2010), la cetosis subclínica (considerada cuando la concentración sérica de BHB es mayor a $1200 \mu\text{mol/l}$) en la primera o segunda semana después del parto está asociada con: un incremento de 3 a 8 veces el riesgo de desplazamiento de abomaso a la izquierda (Oetzel, 2004); un riesgo 3 veces mayor de metritis y de 4 a 6 veces mayor de cetosis clínica (Duffield, Lissemore, McBride & Leslie, 2009); una mayor probabilidad de endometritis subclínica (Hammon, Evjen, Dhiman, Goff & Walters, 2006); y una duración y severidad incrementadas de mastitis (Suriyasathaporn, Heuer, Noordhuizen-Stassen & Schukken, 2000).

Por otro lado, en cuanto al efecto de la cetosis subclínica sobre la eficiencia reproductiva, Walsh, Kelton, Duffield, Leslie, Walston y Leblanc (2006) observaban que vacas con niveles de BHB en leche mayores a $1000 \mu\text{mol/l}$ en la primera semana posparto tenían 1,5 veces más probabilidades de ser anovulatorias a las 9 semanas posparto. Estos mismos investigadores posteriormente, mostraban como vacas con

cetosis en la primera o segunda semana posparto aumentaban el intervalo medio hasta quedar gestantes, e incluso podía alargarse más (hasta 130 días) en vacas que tuvieron cetosis subclínica tanto en la primera como en la segunda semana de lactación (Walsh, Leslie, Leblanc, Kelton, Walton & Duffield, 2007).

UTILIZACIÓN DE MONENSINA PARA MEJORAR LA EFICIENCIA PRODUCTIVA EN VACAS DE LECHE

Una manera de ayudar a aliviar el balance energético negativo de la vaca en el periodo de transición es mediante el uso de ionóforos, que actúan modificando la población microbiana del rumen (Bergen & Bates, 1984). Los ionóforos como la lasalocida y la monensina (poliéteres carboxílicos) se han usado como aditivo alimentario en vacuno desde la década de 1970 para mejorar la eficiencia alimentaria (Jerez, Chihuailaf, Gai, Noro & Wittwer, 2014), entre ellos, la monensina (MON) producida por una cepa natural de *Streptomyces cinnamonensis* es el más comúnmente utilizado (Duffield, Rabiee & Lean, 2008). Sin embargo, con la entrada en vigor del Reglamento 1831/2003 de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal, su uso como aditivo promotor del crecimiento en pienso quedó prohibido partir del 1 de enero de 2006. Actualmente la MON es catalogada como sustancia antiinfecciosos/antibióticos y su uso está aprobado por la Comisión Europea para su utilización en vacas (Reglamento 37/2010 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal). Debido a sus propiedades físico-químicas, la MON no se transfiere a la leche, por lo que a las dosis recomendadas de utilización, no es detectada en la misma (Jerez et al., 2014).

La MON inhibe selectivamente el crecimiento de bacterias mediante la alteración de la transferencia de iones a través de la membrana

celular, siendo las bacterias Gram positivas más sensibles que las Gram negativas. De esta forma provoca una disminución de la microflora productora de acetato y butirato, y un incremento de la microflora que produce propionato, un precursor gluconeogénico, resultando en un incremento de la gluconeogénesis hepática. Así, el mayor suministro de glucosa se asume como el principal beneficio de la suplementación con MON (Mullins, Mamedova, Brouk, Moore, Green, Perfield, Smith, Harner & Bradford., 2012). De hecho, en vacas tratadas con MON se ha observado un aumento de la eficiencia del propionato para producir glucosa y un disminución de la oxidación de glucosa en los tejidos corporales (Markantonatos & Varga, 2017). Este efecto es importante en las vacas de leche en el periodo de transición, ya que experimentan un incremento en la demanda de glucosa y un descenso de su disponibilidad (Pettersson-Wolfe, Leslie, Osborne, McBride, Bagg & Vessie, 2007). Por otro lado, observaciones de algunos estudios han sugerido que los efectos beneficiosos de la MON pueden ser independiente a los cambios en la gluconeogénesis (Mullins et al., 2012). Así, Markantonatos, Aharoni, Richardson & Varga (2009) observaron que la MON no afectaba la producción de propionato en el rumen al medir su cinética durante el periodo del parto.

Otros efectos atribuidos a la MON han sido la menor digestión de la proteína en el rumen con el consiguiente incremento de la disponibilidad de la proteína alimentaría en el intestino delgado (McGuffey, Richardson & Wilkinson, 2001), aunque se ha sugerido que estos efectos pueden verse más o menos limitados en función del tipo de dieta (Tedeschi, Fox & Tylutki, 2003). También se ha observado una influencia de la MON sobre las concentraciones séricas de urea, produciendo un aumento en sus niveles séricos (Duffield, Sandals, Leslie, Lissemore, McBride Lumsden, Dick & Bagg, 1998) y se sugiere que está relacionado con su potencial de incrementar la absorción de aminoácidos en el intestino para su metabolismo hepático

(Plaizier, Martin, Duffield, Bagg, Dick & McBride, 2000), aunque otra hipótesis es que la MON podría tener efectos beneficiosos sobre la funcionalidad hepática y por tanto mejorar la habilidad del hígado para la producción de urea (Pettersson-Wolfe et al., 2007).

Otras investigaciones sobre la vaca de transición indican un efecto beneficioso de la MON en la curva de ingesta de materia seca (IMS) posparto (Shah, Schroeder, Strang & Green, 2008), lo que también contribuiría a mejorar la salud, ya que el balance energético negativo en las vacas en lactación temprana con IMS más elevadas no es tan severo como en las vacas con IMS inferiores (Bertics, Grumme, Cadorniga-Valino & Stoddard, 1992). Sin embargo, Duffield et al. (2008) tras la realización de un meta análisis sobre los efectos de la MON concluyen que el tratamiento de MON en vacas lecheras disminuye la ingestión de materia seca, y Peterson-Wolfe, Leslie, Osborne, McBride, Bagg, Vessie, Dick & Duffield (2007) no encontraron diferencias en la ingestión de materia seca entre vacas tratadas con MON y sin tratar, por lo que el efecto de la MON sobre la ingestión no es muy claro.

Según Spears, Schrick y Burns (1989), el tratamiento con MON también puede incrementar la absorción de Ca desde el intestino, así como la absorción de Se (Costa, Gleed, Sanson, Symonds & Allen, 1985) y Cu (Van Ryssen, 1991); estos minerales tienen un papel importante en los mecanismos de acción antioxidantes. Deficiencias en selenio se han asociado con un incremento en la incidencia de infección uterina (Harrison, Hancock, Pierre, Conrad & Harvey, 1986), por lo que una mayor disponibilidad de estos minerales podría modificar el riesgo de enfermedad en el parto.

Diferentes estudios han indicado efectos beneficiosos del tratamiento con MON sobre metabolitos sanguíneos, y parámetros productivos y reproductivos de la vaca en periodo de transición, aunque los resultados entre estudios son variables, dependiendo, entre otros factores, de

la forma o el momento de administración. Por ejemplo, la MON puede aportarse en forma de premezcla, que se añade directamente al alimento, o en forma de una cápsula de liberación continua (CLC) como dispositivo intrarruminal que se administra 3-4 semanas antes del parto. Se ha especulado que la forma de premezcla no pueda proporcionar los mismos beneficios que la CLC, debido a la fluctuación en la cantidad de principio activo en el rumen al disminuir el consumo de alimento en torno al parto (Pettersson-Wolfe et al., 2007). El dispositivo intrarruminal libera lentamente el principio activo en el rumen durante aproximadamente 100 días (McGuffey et al., 2001), influyendo en el metabolismo ruminal de la vaca durante la fase de preparto y posparto.

En el caso de la MON suministrada en forma de CLC, los estudios que se han llevado a cabo para evaluar sus efectos sobre metabolitos sanguíneos, concluyen principalmente que produce una reducción en las concentraciones séricas de BHB y NEFA (Duffield, Leblanc, Bagg, Leslie, Ten Hag & Dick., 2003a; Peterson-Wolfe et al., 2007; Mullins et al., 2012), mientras que los resultados acerca de otros metabolitos como glucosa, urea, y bilirrubina no son tan consistentes (Duffield et al., 2008). También existen diferentes estudios que indican que el uso de MON en forma de premezcla reduce las concentraciones séricas de BHB y NEFA (Thomas, Poe, McGuffey, Mowrey & Allrich, 1993; Heuer, Schukken, Jonker, Wilkinson & Noordhuizen, 2001; Vallimont, Varga, Arieli, Cassidy & Cummins, 2001) y mejora la disponibilidad de glucosa (Arieli, Vallimont, Aharoni & Varga, 2001).

El efecto positivo de la MON sobre el balance energético y la utilización de nutrientes reduciría la movilización de reservas tisulares, minimizando el riesgo de desórdenes metabólicos, mejorando la salud y por tanto el rendimiento de la vaca. Por ello, diferentes autores han indicado que el tratamiento con MON tiene el potencial de reducir el riesgo de enfermedad posparto y aumentar la producción

de leche (Duffield et al., 2008; Arieli, Dicken, Dagoni, Spierer & Zamwel, 2008). Si bien, en otros estudios se han encontrado una asociación negativa entre la utilización de MON y algunos componentes de la leche como el porcentaje de grasa (Duffield, Bagg, Kelton, Dick & Wilson, 2003b).

Algunos ensayos atribuyen un efecto beneficioso de la MON sobre el sistema inmune, al encontrar mayor tasa de anticuerpos específicos de la diarrea vírica bovina en vacas vacunadas y tratadas con MON frente a las no tratadas (Drong, Meyer, von Soosten, Frahm, Rehage, Schirrmeier, Beer & Danicke, 2016). Recientemente, en estudios realizados *in vitro* sobre la fermentación ruminal, Capelari, Johnson, Latack, Roth & Powers (2018) observaban una disminución de la producción de metano al incorporar MON a la dieta de vacas lecheras.

A pesar de los posibles beneficios del uso de MON, existen otros estudios en los que no se han encontrado estos efectos beneficiosos del tratamiento con MON, sobre parámetros productivos o reproductivos (Salar, Çalisici, Çalisici, Bastan & Bastan, 2017), ni sobre excreción y utilización de nitrógeno, fósforo ni azufre (Morris, Kim, & Lee, 2018). Esta discordancia entre resultados puede atribuirse a la heterogeneidad de las condiciones en las que se llevan a cabo los estudios y a la influencia de numerosos factores, como la dieta, el manejo, o la genética, entre otros.

En conclusión, aunque el tratamiento con MON parece ser beneficioso para el sector vacuno lechero, la variación de resultados entre algunos de estudios realizados, hace necesario ampliar el número de ensayos y el tamaño de la población estudiada para poder evaluar eficazmente la influencia de tratamientos con MON autorizadas que puedan resultar de gran interés para los productores, ya que un exitoso periodo de transición es fundamental para un adecuado desarrollo del potencial productivo de la vaca de leche y por tanto condiciona en gran medida su rentabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Adewuyi, A., Gruys, E., y Van Eerdenburg, F.C.M. (2005). Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Vet Q.* 27: 117-116.
- Arieli, A., Vallimont, J.E., Aharoni, Y., y Varga, G.A., (2001). Monensin and growth hormone effects on glucose metabolism in the prepartum cow. *J. Dairy Sci.* 84:2770-2776.
- Arieli, A., Dicken, U., Dagon, I., Spirer, Y., y Zamwel, S., (2008). Production and Health of Cows Given Monensin Prepartum and a High-Energy Diet Postpartum. *J. Dairy Sci.* 91:1845-1851.
- Bergen, W., y Bates, D.B. (1984). Ionophores: Their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.* 58:1528-1539
- Bertics, S.J., Grumme, R.R., CadornigA-Valino, C., y Stoddard, E.E., (1992). Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation. *J. Dairy Sci.* 75:1914-1922.
- Bobe, G., Young, J.W., y Beitz, D.C. (2004). Pathology, etiology, prevention and treatment of fatty liver in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:3105-3124.
- Buckley, F., O'Sullivan, K., Mee, J.F., Evans, R.D., y Dillon, P. (2003). Relationships among milk yield, body condition, cow weight and reproduction in Spring-Calved Holstein-Friesians. *J. Dairy Sci.* 86:2308-2319.
- Capelari, M., Johnson, K.A., Latack, B., Roth, J., y Powers, W. (2018). The effect of encapsulated nitrate and monensin on ruminal fermentation using a semi-continuous culture system. *J. Anim. Sci.* 96 (8):3446-3459.
- Chalupa, W.Y., y Harrison, J.H. (1996). Feeding Strategies for the Fresh Cow. The Penn Annual Conference Center for Animal Health and Productivity. University of Pennsylvania. Consultado *on line* el 15/02/2017 en: <http://research.vet.upenn.edu/DairyPoultrySwine/DairyCattle/PennConf1996/FeedingStrategiesfortheFreshCow/tabid/1728/Default.aspx>
- Chamberlain, A.T., y Wilkinson, J.M., (2002). Feeding and dairy cows. Edición en lengua española. Editorial Acribia. 318 pp.
- Coffey, M.P., Simm, G., Hill, W.G., y Brotherton, S., (2003). Genetic Evaluations of Dairy Bulls for Daughter Energy Balance Profiles Using Linear Type Scores and Body Condition Score Analyzed Using Random Regression. *J. Dairy Sci.* 86 (6): 2205-12.
- Costa, N.D., Gleed, P.T., Sanson, B.F., Symonds, H.W., y Allen W.M. (1985). Monensin and narasin increase selenium and zinc absorption in steers. Page 472 in Trace Element Metabolism in Man and Animals. C. F. Mills, I. Bremner, and J. K. Chesters, ed. Commonw. Agric. Bur., Slough, England.
- Drong, C., Meyer, U., von Soosten, D., Frahm, J., Rehage, J., Schirrmeier, H., Beer, M., y S. Danicke (2016). Effects of monensin and essential oils on immunological, haematological and biochemical parameters of cows during the transition period. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 100 (3):537-51.
- Ducusin, R.J., Uzuka, Y., Satoh, E., Otani, M., Nishimura, M., Tanabe, S., y Sarashina, T. (2003). Effects of extracellular Ca²⁺ on phagocytosis and intracellular Ca²⁺ concentrations in polymorphonuclear leukocytes of postpartum dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 75:27-32.
- Duffield, T.F., Sandals, D., Leslie, K.E., Lissimore, K., McBride Lumsden, B.W., Dick, J.H., y Bagg, R. (1998). Efficacy of monensin for the prevention of subclinical ketosis in lactating dairy cows. *J. J. Dairy Sci.* 81:2866-2873.
- Duffield, T.F., Leblanc, S., Bagg, R., Leslie, K., Ten Hag, J., y Dick, P. (2003a). Effect of a Monensin Controlled Release Capsule on Metabolic Parameters in Transition Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 86:1171-1176.
- Duffield, T.F., Bagg, R., Kelton, D., Dick, P y Wilson, J. (2003b). A Field Study of Di-

- etary Interactions with Monensin on Milk Fat Percentage in Lactating Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 86:4161–4166.
- Duffield, T.F., Rabiee, A.R., y Lean, I.J. (2008). A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 1. Metabolic effects *J. Dairy Sci.* 91:1334–1346.
- Duffield, T.F., Lissemore, K.D., McBride, B.W., y Leslie, K.E. (2009). Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *J. Dairy Sci.* 92: 571-580.
- Grummer, R.R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition cow. *J. Anim. Sci.* 73:2820-2833.
- Hammon, D.S., Evjen, I.M., Dhiman, T.R., Goff, J.P., y Walters, J.L. (2006). Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113:21-29.
- Harrison, J.H., Hancock, D.D., Pierre, N., Conrad, H.R., y Harvey, W.R. (1986). Effect of prepartum selenium treatment on uterine involution in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 69:1421.
- Herd, T.H. (2000). Ruminant adaptation to negative energy balance. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16: 215-230.
- Heuer, C., Schukken, Y.H., Jonker, L.J., Wilkinson, J.I., y Noordhuizen, J.P. (2001). Effect of monensin on blood ketone bodies, incidence and recurrence of disease and fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84:1085-1097.
- Horst, R.L. (1986). Regulation of calcium and phosphorus homeostasis in the dairy cows. *J. Dairy Sci.* 69:604.
- Hou, H., Ostergaard, S., Thilising-Hansen, T., Jorgensen, R.J., Larsen, T., Sorensen, J.T., Agger, J. F., y Bloom, J.Y. (2001). Milk fever and subclinical hypocalcaemia – an evaluation of parameters on incidence risk, diagnosis, risk factors and biological effects as input for a decision support system for disease control. *Acta Vet. Scand.* 42:1-29.
- Ingvartsen, K.L., y Andersen, J.B. (2000). Integration of metabolism and intake regulation: A review focusing on periparturient animals. *J. Dairy Sci.* 83:1573–1597.
- Ingvartsen, K.L., Dewhurst, R.J., y Friggens, N.C. (2003). On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livest. Prod. Sci.* 83:277-308.
- Jerez, A., Chihuailaf, R., Gai, M., Noro, M., y Wittwer, F. (2014). Detection of lasalocid and monensin in raw milk samples from supplemented dairy cows. *Arch. Med. Vet.* 46: 445-449.
- Kessel, S., Strohel, M., Meyer, H.H.D., Hiss, S., Sauerwein, H., Schwarz, F.J., y Bruckmeyer, R.M. (2008). Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions. *J. Anim. Sci.* T. 86. P. 2903–2912
- Kimura, K., Reinhardt, T.A., y Goff, J.P. (2006). Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89:2588-2595.
- Leblanc, S.J. (2008). Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Vet J.* 176: 102-114.
- Leblanc, S. (2010). Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J. Reprod. Dev.* 56(S), S29-S35.
- Leroy, J.L., Vanholder, T., Mateusen, B., Christopher, A., Opsomer, G., De Kruif, A., Genicot, G., y Van Soom, A. (2005). Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 130: 485-495.
- Markantonatos, X., Aharoni, Y., Richardson, L.F., y Varga, G.A. (2009). Effects of monensin on volatile fatty acid metabolism in periparturient dairy cows using compartmental analysis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 153:11-27.
- Markantonatos, X., y Varga, G.A. (2017). Effects of monensin on glucose metabolism

- in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:9020–9035.
- MARM (Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente), Gobierno de España. (2016). Accedido el 01/02/2017 en: <http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/vacuno-lechero/default.aspx>
- Mcguffey, R.K., Richardson, L.F., y Wilkinson, J.I.D. (2001). Ionophores for dairy cattle: Current status and future outlook. *J. Dairy Sci.* 84:194-203.
- Morris, D., L. Kim, S. H. y Lee, C. (2018). Effects of corn feeding reduced-fat distillers grains with or without monensin on nitrogen, phosphorus, and sulfur utilization and excretion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:7106–7116.
- Mullins, C.R., Mamedova, L.K., Brouk, M.J., Moore, C.E., Green, H. B., Perfield, K.L., Smith J.F., Harner, J.P., y Bradford, B.J. (2012). Effects of monensin on metabolic parameters, feeding behavior, and productivity of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:1323-1336.
- Oetzel, G.R. (2004). Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Vet. Clin N Amer. Food Anim.* 20: 651-674.
- Ostergaard, S., Sorensen, J.T., y Houe, H. (2003). A stochastic model simulating milk fever in a dairy herd. *Prev. Vet. Med.* 58:125-143.
- Petersson-Wolfe, C.S., Leslie K.E., Osborne, T., McBride, B.W., Bagg R., y Vessie, G. (2007). Effect of monensin delivery method on dry matter intake, body condition score, and metabolic parameters in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1870–1879.
- Plaizier, J.C., Martin, A., Duffield, T., Bagg, R., Dick, P., y McBride, B.W. (2000). Effect of a prepartum administration of monensin in a controlled-release capsule on apparent digestibilities and nitrogen utilization in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:2918–2925.
- REGLAMENTO (CE) No 1831/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal. *Diario Oficial de la Unión Europea.* L 268/29.
- REGLAMENTO (UE) No 37/2010 DE LA COMISIÓN de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea.* L 15/1.
- Salar, S., Çalisici, O., Çalisici, D., Bastan, I., y Bastan, A. (2017). Effect of utilization of a controlled-release intraruminal monensin device on dry matter intake, milk yield, and some reproductive parameters in dairy cows. *Turk J Vet. Anim. Sci.* 41: 621-626.
- Shah, M.A., Schroeder, G., Strang, B.D., y Green, H.B. (2008.) Effect of monensin concentration on dry matter intake during the transition period of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91 (E Suppl. 1): 268-269.
- Sovani, S., Heuer, C., Van Straalen, W.M., y Noordhuizen, J.P.T.M. (2000). Disease in high producing dairy cows following post parturient negative energy balance. Pages 33-50 in *Soc. Vet. Epid. Prev. Proc. Edinburgh, UK, March 29-31, 2000.* Soc. Vet. Epidemiol. Prev. Med., UK.
- Spears, J.W., Schrick, B.R.R., y Burns, J.C. (1989). Influence of lysocellin and monensin on mineral metabolism of steers fed forage-based diets. *J. Anim. Sci.* 67:2140.
- Suriyasathaporn, W., Heuer, C., Noordhuizen-Stassen, E.N., y Schukken, Y.H. (2000). Hyperketonemia and udder defense: a review. *Vet Res;* 31: 397-412.
- Tedeschi, L.O., Fox, D.G., y Tylutki, T.P. (2003). Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. *J. Environ. Qual.* 32:1591-1602.
- Thomas, E.E., Poe, S.E., Mcguffey, R.K., Mowrey, D.H., y Allrich, R.D. (1993). Effect of feeding monensin to dairy cows on

- milk production and serum metabolites during early lactation. *J. Dairy Sci.* 76 (Suppl. 1):280. (Abstr.).
- Vallimont, J.E., Varga, G.A., Arieli, A., Cassidy, T.W., y Cummins, K.A. (2001). Effects of prepartum somatotropin and monensin on metabolism and production of periparturient Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84:2607-2621.
- Van KnegseL, A.T.M., DE Vriesreilnigh, G., Meulenberg. S., Van Den Brand, H., Dijkstra, J., Kemp B., y Parmentier, H.K. (2007). Natural antibodies related to energy balance in early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:5490-5498.
- Van Ryssen, J.B.J. (1991). Effect of monensin and its metabolites in broiler litter on sheep consuming the broiler litter. *J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.* 62:94.
- Walsh, R.B., Kelton, D.F., Duffield, T., Leslie K.E., Walston J.S., y Leblanc S.J. (2006). Prevalence and risk factors for postpartum anovulatory condition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:315-324.
- Walsh, R., Leslie, K., Leblanc, S., Kelton, D., Walton, J., y Duffield, T. (2007). The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 2788-2796.
- Wathes, D.C., Fenwick, M., Cheng, Z., Bourne, N., LLewellyn, S., Morris, D.G, Kenny, D., Murphy, J., y Fitzpatrick, R. (2007). Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology*, 68: S232-S241.
- Whiteford, L.C., y Sheldon, I.M. (2005). Association between clinical hypocalcaemia and postpartum endometritis. *Vet. Rec.* 157:202-204.

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y SU IMPLICACIÓN EN BIOMEDICINA¹

Reactive oxygen species and the implication in Biomedicine

Lozano-Picazo, C.; Fernández-Belda, F.*

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. 30071 Campus de Espinardo, Murcia, España.

***Autor para correspondencia:** Francisco Fernández-Belda, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30071 Campus de Espinardo, Murcia, España. Tel: +34 868 884 763, Email: fbelda@um.es

Historial del artículo:

Recibido: 28 de mayo, 2018

Aceptado: 30 de enero, 2019

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) actúan como regulador intracelular cuando se generan de forma controlada en puntos concretos de la célula. Modifican la función de proteínas mediante la oxidación reversible de cisteínas. Hay quinasas y fosfatasas de proteínas, factores de transcripción y canales iónicos que están regulados por ROS. Estrés oxidativo y daño celular aparecen cuando los mecanismos antioxidantes de protección son incapaces de mantener bajo el nivel intracelular de ROS. En estas condiciones, ROS inducen pérdida de viabilidad celular en patologías degenerativas de corazón y cerebro y promueven proliferación celular ilimitada en procesos tumorales. La alteración de la función mitocondrial juega un papel clave en la generación del estrés oxidativo y por tanto es una diana terapéutica preferente para evitar o aminorar los daños oxidativos producidos por ROS.

Palabras clave: regulación redox, estrés oxidativo, miocardiopatías, cáncer, neurodegeneración.

¹ Esta revisión es un resumen de información básica sobre ROS y un esbozo de su implicación en las patologías que se describen. El conocimiento actual es todavía muy incompleto.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) act as intracellular regulator when they are generated under control in specific cell spots. They modify proteins function by cysteine reversible oxidation. There are protein kinases and phosphatases, transcription factors and ionic channels that are regulated by ROS. Oxidative stress and cell damage arise when the protection antioxidant mechanisms are unable to keep low the intracellular ROS level. Under these conditions, ROS induce cell viability loss in heart and brain degenerative pathologies and promote unlimited cell proliferation in tumor processes. Alteration of the mitochondrial function is a key player in the oxidative stress generation and therefore it is preferential therapeutic target for prevention or attenuation of the ROS-induced oxidative damage.

Key words: redox regulation, oxidative stress, cardiomyopathies, cancer, neurodegeneration.

INTRODUCCIÓN

Moses Gomberg (1898) descubre la formación del radical trifenilmetilo y se considera el padre de la química de los radicales libres. Rebeca Gerschman (1954) propone que los radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxilo ($\bullet OH$) son responsables del mecanismo de toxicidad por oxígeno. Denham Harman (1956) postula la teoría del envejecimiento basada en la toxicidad de los radicales libres. Joe McCord e Irwin Fridovich (1969) descubren la enzima superóxido dismutasa (SOD). Chandra Mittal y Ferid Murad (1977) prueban que $O_2^{\bullet-}$ induce activación de la enzima guanilato ciclasa y se forma monofosfato de guanosina cíclica. Helmut Sies (1985) acuña el concepto de “estrés oxidativo” como el desequilibrio producido por el aumento de especies oxidantes o la disminución de sistemas antioxidantes. A principios del siglo XXI se comprueba que hay especies reactivas de oxígeno (ROS) que intervienen en mecanismos fisiológicos (Buetler *et al.*, 2004; Rhee, 2006). El interés por los temas relacionados con ROS ha ido en aumento durante los últimos años dada la importancia que tienen en diversos campos relacionados con la Biomedicina.

RADICALES LIBRES Y ROS

Un radical libre es una especie química que posee un electrón (e^-) desapareado en la capa de valencia de alguno de sus átomos. Esto le otor-

ga una configuración electrónica inestable que lo hace muy reactivo porque tiende a reaccionar con otras especies para estabilizarse. Tienen una vida media corta (microsegundos) y actúan en un sitio cercano al que se forman. Los radicales libres de mayor interés biológico son derivados de oxígeno o nitrógeno que poseen una estructura de Lewis con número impar de e^- . El acrónimo ROS se utiliza para referirse tanto a radicales libres que contienen oxígeno como a derivados que sin ser radicales libres son muy reactivos como ellos. Es el caso de: anión peróxido ($O_2^=$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y anión hidroxilo (OH^-) (Figura 1).

La producción de pequeñas cantidades de ROS forma parte del metabolismo celular que actúa como regulador de procesos activados por hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y otros estímulos. Sin embargo, la producción incontrolada de ROS altera o destruye componentes celulares y modifica la expresión de genes (Dröge, 2002; Lushchak, 2014; Schieber y Chandel, 2014).

PAPEL DEL O_2 COMO FUENTE DE ROS

Los organismos superiores utilizan O_2 para obtener la mayor parte de la energía que precisan aunque esa necesidad de O_2 es potencialmente tóxica. La alta reactividad del O_2 , que le permite formar ROS, se debe a su estado triplete (3O_2) cuya configuración electrónica es la de un birradical ($\bullet O-O\bullet$ ó bien

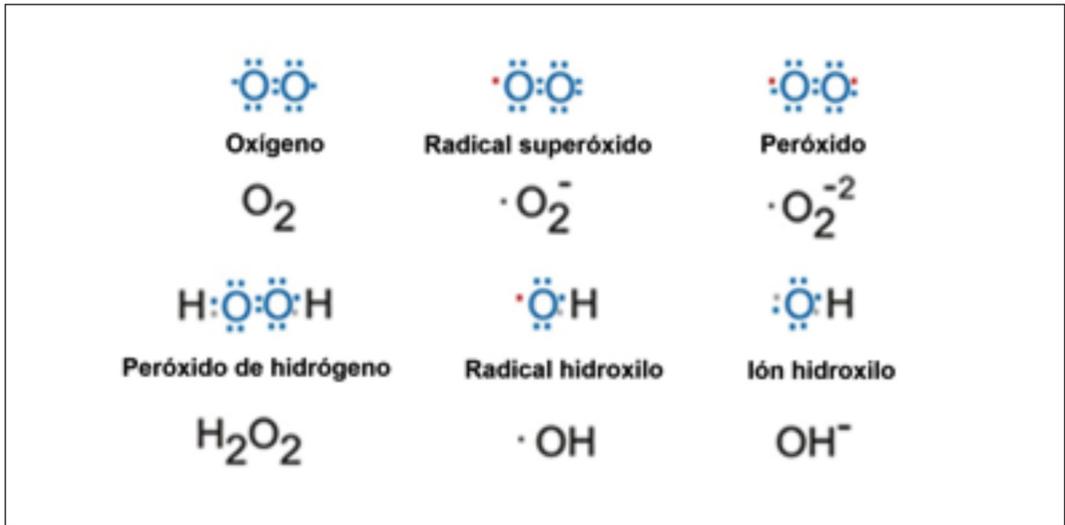


Figura 1. Principales ROS de interés biológico. El O_2 en estado triplete tiene 2 e^- desapareados en la capa de valencia. La reducción secuencial por la adición de e^- da lugar a: radical superóxido, anión peróxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y anión hidroxilo. (tomado de: Held, 2015).

O_2^-) con capacidad para aceptar e^- . El O_2 en estado singlete (1O_2) es menos reactivo porque no tiene e^- desapareados en la capa de valencia ($O=O$). La situación habitual en los procesos de oxidación-reducción (redox) es la transferencia de $2e^-$ del donador (reducido) al aceptor (oxidado). Cuando el donador solo cede $1e^-$ al aceptor O_2^- se forma el radical $O_2^{\bullet-}$ que es muy inestable y tiende a reaccionar. Si reacciona con óxido nítrico se forma anión peroxinitrito que es otra especie muy reactiva. Si $O_2^{\bullet-}$ cede $1e^-$ a otro radical $O_2^{\bullet-}$ se forma O_2 y $O_2^=$ que en presencia de $2H^+$ genera H_2O_2 . Hay una reacción tóxica de descomposición de H_2O_2 que se produce cuando hay niveles elevados. H_2O_2 recibe $1e^-$ de Fe^{2+} a través de la reacción de Fenton: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \cdot OH + OH^- + Fe^{3+}$. Se genera $\cdot OH$ que es un radical muy reactivo con capacidad para oxidar proteínas, lípidos y material genético de forma indiscriminada (Lushchak, 2014).

REGULACIÓN O ESTRÉS

Los efectos producidos por ROS dependen de la intensidad, la duración y el microentorno. Un pequeño aumento transitorio en un punto concreto de la célula sirve como regulador intracelular para activar alguna función biológica. Sin embargo, una elevación transitoria o crónica de mayor entidad desencadena una respuesta oxidativa que es propia de estados patológicos. Por eso, las células disponen de eficientes mecanismos antioxidantes que protegen de la potencial toxicidad de ROS. Un antioxidante es una molécula que impide la acumulación de ROS en cantidades perjudiciales o estimula mecanismos endógenos para su eliminación. Cuando el equilibrio entre ROS y los sistemas antioxidantes se desplaza a favor de las sustancias oxidantes aparece el estrés oxidativo. El daño oxidativo es el efecto que se observa cuando los sistemas antioxidantes de la célula son insuficientes para

neutralizar la elevación de ROS (Winterbourn y Hampton, 2008; Lushchak, 2014).

FUENTES ENDÓGENAS DE ROS

Los mecanismos de producción de ROS en los seres vivos se basan en la transferencia de e^- y están fundamentalmente asociados al metabolismo celular del O_2 .

NADPH oxidasa (NOX)

Es un complejo enzimático cuya función es producir radical $O_2^{\bullet-}$ a través de la reacción: $NADPH + 2O_2^- \rightarrow NADP^+ + 2O_2^{\bullet-} + H^+$. El producto de reacción $O_2^{\bullet-}$ se transforma rápidamente en H_2O_2 que es más estable y es la especie que actúa en la mayoría de casos. La activación de NOX puede inducirse por diversos estímulos incluyendo: angiotensina II, endotelina-1, interleuquina-1, factor α de necrosis tumoral, factor β transformante del crecimiento, factor de crecimiento del endotelio vascular, alteraciones metabólicas, hipoxia-reoxigenación y estímulos mecánicos. Las características bioquímicas de NOX y su presencia en casi todo tipo de células sugieren que es la principal fuente productora de ROS cuando éstas intervienen en procesos de regulación redox (Dworakowski *et al.*, 2006). NOX en mamíferos constituye una familia de 7 proteínas cuya expresión depende del tipo de célula y de la localización subcelular. NOX2 fue la primera isoforma descubierta, se identificó en leucocitos y es responsable de la respuesta microbicida de las células fagocíticas. En algunos tipos de células hay co-expresión de isoformas, así células de músculo liso vascular co-expresan NOX1 y NOX4 mientras que cardiomiocitos y células endoteliales co-expresan NOX2 y NOX4 (Bedard y Krause, 2007).

Cadena respiratoria mitocondrial

Un pequeño % del O_2 que entra en la mitocondria para producir energía forma ROS como

producto no deseado. El poder reductor procedente de la oxidación de glucosa fluye en forma de e^- a través de la cadena respiratoria siendo los complejos I y III los mayores productores de ROS. El primer radical que se forma es $O_2^{\bullet-}$ y se genera cuando O_2^- recibe $1e^-$ del donador lo que supone una reducción incompleta: $O_2^- + 1e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$. La inestabilidad de $O_2^{\bullet-}$ permite la posterior formación de H_2O_2 , $\bullet OH$ y OH^- (Lushchak, 2014).

Otras fuentes secundarias de producción de ROS incluyen: xantina oxidasa, monoamino oxidasa, óxido nítrico sintasa desacoplada, citocromo P450 oxidasa, ciclooxigenasa y lipooxigenasa.

FUENTES EXÓGENAS DE ROS

La generación de ROS puede proceder de fuentes ajenas al metabolismo aerobio como son: humo de tabaco, alcohol, contaminación ambiental, radiación ultravioleta, radiaciones ionizantes, exposición a pesticidas, agentes químicos, algunos fármacos, etc.

DEFENSAS FRENTE A ROS

Las células cuentan con mecanismos antioxidantes tanto enzimáticos, que actúan directamente sobre la especie tóxica, como no enzimáticos que reaccionan para dar otra especie más estable que se metaboliza o excreta. También se les conoce como atrapadores (*scavengers* en inglés).

Eliminación de $O_2^{\bullet-}$

SOD está presente en citosol (Cu/Zn-SOD) y matriz mitocondrial (Mn-SOD) de las células de todos los organismos animales y vegetales que viven en condiciones aerobias. Cataliza la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ a través de la reacción: $2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. El coenzima Q_{10} ($CoQH_2$) de la cadena respiratoria también elimina $O_2^{\bullet-}$ a través de la reacción: $CoQH_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow CoQ^{\bullet-} + H_2O_2$.

Eliminación de H₂O₂

Glutación peroxidasa cataliza la descomposición de H₂O₂ cuando la concentración es baja. Requiere la presencia del tripéptido glutatión (GSH) que se transforma en glutatión oxidado (GSSG) a través de la reacción: $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$. Cuando la concentración de H₂O₂ es alta interviene catalasa mediante la reacción: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Peroxirredoxina también descompone H₂O₂ en H₂O estando su actividad regulada por cambios en la fosforilación y el estado redox del enzima. Es responsable de los aumentos transitorios y locales de H₂O₂ (señales de H₂O₂) que actúan como regulador redox.

Eliminación de •OH y peróxilo (ROO•)

Se consigue a través del antioxidante hidrosoluble vitamina C (ácido ascórbico) cuando se oxida a ácido deshidroascórbico. La especie activa es el radical ascorbilo que es un intermedio de la reacción reversible de oxidación. La eliminación a través del antioxidante liposoluble vitamina E (tocoferoles) conlleva la donación de H y la pérdida irreversible de moléculas de vitamina. CoQH₂ también impide la peroxidación de lípidos de membrana y de lipoproteínas.

Tiorredoxina/tiorredoxina reductasa, glutatión/glutatión reductasa y glutarredoxina son necesarias para mantener el equilibrio redox de la célula.

IMPLICACIÓN EN REGULACIÓN REDOX

El efecto regulador de ROS suele producirse a través de H₂O₂ y se basa en la capacidad para oxidar alguna cisteína de proteínas diana. Hay cisteínas (Cys-SH) en determinadas proteínas que se oxidan con facilidad porque el grupo tiol a pH fisiológico está como anión tiolato (Cys-S⁻). Niveles bajos de H₂O₂

transforman reversiblemente Cys-S⁻ en grupo sulfénico (Cys-SOH) que es inestable y provoca la formación de puentes disulfuro intere e intramoleculares. En condiciones de estrés oxidativo, Cys-SOH evoluciona a sulfínico (Cys-SO₂H) y sulfónico (Cys-SO₃H) en un proceso irreversible que provoca modificaciones y daños permanentes. Hay un mecanismo indirecto que utiliza sensores redox que son proteínas que se oxidan por ROS y al reducirse permiten la oxidación de proteínas diana. Cambios en la función de proteínas asociados a la oxidación reversible de Cys-S⁻ constituyen un mecanismo fisiológico de regulación redox. La fuente productora de H₂O₂ suele estar junto a la proteína diana para que la acción sea rápida y eficaz. Por otro lado, la acumulación de H₂O₂ es transitoria porque se produce cuando peroxirredoxina está momentáneamente inactiva por oxidación o fosforilación. El efecto oxidativo sobre la proteína diana es igualmente transitorio y desaparece por mecanismos enzimáticos de reducción que recuperan los residuos Cys-S⁻. El mecanismo de regulación redox más conocido es la inhibición de fosfatasa de proteínas con tirosinas fosforiladas que regulan numerosas rutas de transducción de señales. Las fosfatasa tienen una secuencia conservada en el centro activo con Cys-S⁻ que cuando se oxida origina pérdida de la actividad enzimática. La inhibición reversible de la actividad fosfatasa por oxidación de Cys-S⁻ eleva el nivel de la quinasa correspondiente y por tanto activa de forma indirecta la ruta de transducción. También puede darse activación directa de una quinasa por oxidación de Cys-S⁻ como ocurre en la quinasa Src, la actividad quinasa del receptor de insulina o las quinasas A, G y C de proteínas. Otros ejemplos incluyen el efecto directo o indirecto sobre factores de transcripción como: HIF-1, Nrf2, NF-κB, AP-1, STAT y la regulación de canales iónicos (Winterbourn y Hampton, 2008; Finkel, 2011; Schieber y Chandel, 2014).

IMPLICACIÓN EN MIOCARDIOPATÍAS

Es un hecho constatable que la elevación de ROS indicativa de estrés oxidativo está implicada en el desarrollo de algunas patologías graves del miocardio.

Efectos de ROS en isquemia-reperusión

La consecuencia más grave de la isquemia es la inducción de muerte celular que es inevitable e inmediata en el núcleo isquémico. La región en riesgo que rodea al núcleo queda en situación de hipoxia y es más resistente. Sin embargo, las maniobras de reperusión para mejorar la función cardíaca generan una sobreproducción de ROS en las mitocondrias de los cardiomiocitos que es nociva. El origen está en la activación de NOX y el mal funcionamiento de la cadena respiratoria que provoca la isquemia y se potencian al reintroducir O₂ en la reperusión. El estrés oxidativo produce daños directos en los cardiomiocitos tales como: modificaciones irreversibles de componentes celulares y activación de enzimas proteolíticas. También induce la apertura irreversible del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria que da lugar a muerte celular por apoptosis y necroptosis. La reperusión aumenta la respuesta inflamatoria de la isquemia activando la formación de mediadores proinflamatorios y moléculas de adhesión que contribuyen a la activación e infiltración de leucocitos para generar más estrés oxidativo. La propia alteración redox activa factores de transcripción que tienen efecto cardioprotector. Uno de ellos es el factor de hipoxia HIF-1 que en presencia de ROS activa la transcripción de genes que protegen de daños causados por la isquemia-reperusión. El factor Nrf2 también protege del estrés oxidativo que crea la isquemia-reperusión activando la transcripción de genes relacionados con el equilibrio redox de la célula. Los niveles bajos de ROS que se generan después de la reperusión tienen una función protectora activando facto-

res de crecimiento que inducen proliferación, diferenciación y migración celular. Hay procesos de reparación que producen angiogénesis y mejoran la función del órgano pero hay otros que activan la formación de tejido fibrótico y dependiendo de su extensión pueden originar pérdida de contractilidad. El preacondicionamiento cardíaco es un mecanismo experimental de cardioprotección a través del cual períodos breves de isquemia-reperusión previos a una isquemia prolongada proporcionan protección. El efecto se atribuye a la apertura del canal mitocondrial de K⁺ sensible a ATP que permite la entrada de K⁺ a la mitocondria y disminuye el potencial de membrana mitocondrial. Resultados experimentales de protección frente a la isquemia-reperusión al tratar con antioxidantes dirigidos a las mitocondrias y el propio mecanismo protector del preacondicionamiento sitúan a la mitocondria como diana terapéutica preferente para evitar o aminorar los daños de la isquemia-reperusión (Kalogeris *et al.*, 2014; Cadenas, 2018).

Efectos de ROS en hipertrofia e insuficiencia

La hipertrofia patológica es una respuesta compensatoria dinámica para normalizar la función cardíaca. Acompaña a otras cardiopatías y puede activarse por isquemia-reperusión. Hay estímulos crónicos de tipo neurohormonal (angiotensina II, endotelina-1, catecolaminas), inflamatorio (citoquinas) o estiramiento mecánico que activan rutas de transducción de señales y elevan los niveles de ROS. La producción de ROS implica principalmente a la actividad NOX2 que está en la membrana plasmática y NOX4 que está en mitocondrias. Estas isoformas desempeñan funciones distintas en los procesos de hipertrofia y fibrosis que están sin caracterizar. El estrés oxidativo crónico que crea ROS afecta a múltiples dianas moleculares. Se activan factores de transcripción como: NF-κB, NFAT, GATA4 y MEF2 que estimulan la hipertrofia. Se produce reprogramación ge-

nética con la expresión de genes fetales que modifican estructuras y funciones celulares. Se activan quinasas de proteínas con acción pro-apoptótica (ASK1, JNK y p38MAPK) y se alteran otras quinasas con acción anti-apoptótica (PI3K, Akt, ERK1/2). Se produce estrés mitocondrial que induce muerte celular por apoptosis. Los efectos de ROS alcanzan a componentes del ciclo de excitación-contracción, así activan por oxidación a las quinasas A y CaMKII que ejercen función reguladora. También oxidan al receptor de rianodina/canal de Ca^{2+} que lo mantienen en estado abierto y provoca la descarga del Ca^{2+} que almacena el retículo sarcoplásmico. La ATPasa dependiente de Ca^{2+} que bombea Ca^{2+} al interior del retículo sarcoplásmico se inactiva por niveles altos de ROS. Transportadores de la membrana plasmática como el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, canales de Ca^{2+} de tipo L y canales de Na^+ y proteínas de la maquinaria contráctil también se afectan por el estrés oxidativo. El proceso apoptótico lento que disminuye la viabilidad celular y las alteraciones de la maquinaria contráctil hacen que la función del miocardio empeore progresivamente. Los estímulos hipertróficos antes descritos también contribuyen a la respuesta adaptativa del miocardio provocando hipertrofia de cardiomiocitos y modificación de la matriz extracelular que da lugar a fibrosis. Cuando los mecanismos de compensación se prolongan, la fibrosis llega a producir disfunción ventricular que es típica del remodelado cardíaco y que en última instancia conduce a la insuficiencia cardíaca (Maejima *et al.*, 2011; Sag *et al.*, 2014).

IMPLICACIÓN EN CÁNCER

Las células tumorales muestran un metabolismo hiperactivo y mantienen niveles elevados de ROS. Sin embargo, el papel de ROS en la carcinogénesis y metástasis está todavía por concretar. La sobreproducción de ROS origina daños oxidativos directos. Concreta-

mente, alteraciones de distinta naturaleza en el material genético (ruptura de cadenas, alteración de bases, mutaciones, deleciones) pueden iniciar o contribuir al desarrollo de un tumor. Una característica de muchos tumores es su estado de hipoxia debido a que la velocidad de proliferación es mayor que la de angiogénesis. La adaptación a la hipoxia implica la activación del factor HIF-1 que activa genes de la ruta glucolítica. Las células tumorales utilizan glucosa para formar lactato en presencia de O_2 un fenómeno conocido como efecto Warburg. Esta modificación metabólica permite la adaptación a la hipoxia y aumenta la resistencia al tratamiento. Hay tumores que mantienen activo el factor HIF-1 incluso en condiciones de normoxia (Lennicke *et al.*, 2015; DeBerardinis y Chandel, 2016). Otra alteración habitual inducible por ROS es la activación de oncogenes y señales oncogénicas que actúan en las distintas etapas de desarrollo del tumor. Incluye la activación permanente de las proteínas Ras, Bcr-ab y c-Myc implicadas en proliferación celular, inactivación de genes supresores de tumores, angiogénesis y disfunción mitocondrial. La activación constitutiva de Ras y de factores de crecimiento por H_2O_2 promueven la ruta anti-apoptótica PI3K-Akt-mTOR que también se activa por inhibición de la fosfatasa de proteínas PTEN. La activación de c-Myc a través de la ruta Wnt/b-catenina aumenta la capacidad de metástasis (Kumari *et al.*, 2018). Otras dianas de ROS implicadas en progresión del tumor y metástasis son la quinasa Src, la proteína RhoA y los factores de transcripción NF- κ B y STAT-3 (Yang *et al.*, 2014). Los niveles de los antioxidantes SOD, catalasa, GSH, glutatión peroxidasa y NADPH son mayores en células tumorales que en células sanas para evitar la activación de quinasas relacionadas con apoptosis (JNK, p38MAPK) y reacciones indiscriminadas de oxidación. A ello contribuye el factor Nrf2 que potencia la respuesta antioxidante. La expresión de Nrf2 está reprimida en ausencia de estrés oxidativo

por unión a la proteína citosólica Keap1 que induce su degradación. El estrés oxidativo oxida a Keap1 liberando Nrf2 que entra al núcleo y se une al elemento de respuesta antioxidante, un potenciador de genes que activa respuestas antioxidantes y antiinflamatorias. Las metaloproteinasas de matriz son enzimas que degradan proteínas de la matriz extracelular y son necesarias para la curación de heridas, la angiogénesis y el remodelado fisiológico tisular en general. Su activación facilita la invasión y metástasis de las células tumorales en un proceso relacionado con la transición epitelio-mesénquima y que se inhibe por N-acetilcisteína que es un atrapador de ROS. Las células tumorales disponen de entornos específicos en las mitocondrias con niveles altos de ROS que activan por proximidad la ruta PI3K-Akt-mTOR, oncogenes y factores de transcripción (HIF-1, NF- κ B) necesarios para la formación y desarrollo del tumor. Al mismo tiempo tienen niveles altos de antioxidantes para mantener el equilibrio redox y evitar la activación de la respuesta apoptótica. Esto es una prueba de que la señal redox de H₂O₂ está compartimentalizada (DeBerardinis y Chandel, 2016). La observación de que células tumorales tienen mayor nivel de ROS y de antioxidantes que células sanas y que células tumorales con mayor nivel de ROS tienen más capacidad para desarrollar metástasis ofrece dos posibles alternativas de tratamiento. Disminuir la producción de ROS aumentando la capacidad antioxidante debería impedir la activación de la respuesta anti-apoptótica. Sin embargo, los tratamientos experimentales y ensayos clínicos con antioxidantes no han proporcionado efectos beneficiosos e incluso podrían ser perjudiciales. Hay que tener en cuenta que los antioxidantes intracelulares no son los mismos en todos los tipos de cáncer ni coinciden con los de las células sanas. En cuanto al aumento de la producción de ROS debería inducir la muerte selectiva de células tumorales aunque existe el riesgo de que activaran más la proliferación. Por tanto,

el tratamiento efectivo requeriría antioxidantes específicos para cada tipo de cáncer o el uso de agentes pro-oxidantes dirigidos a los entornos mitocondriales donde se genera ROS (Schieber y Chandel, 2014).

IMPLICACIÓN EN NEURODEGENERACIÓN

La elevación intracelular de ROS es un factor fundamental en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas aunque el conocimiento actual sobre su papel es por el momento insuficiente. La mayor vulnerabilidad de las neuronas al daño oxidativo se debe a que consumen mucho O₂ y tienen una menor capacidad antioxidante. La principal fuente de producción de ROS en células del tejido nervioso es la mitocondria siendo la cadena respiratoria y la actividad NOX los mecanismos responsables. Se admite que el mal funcionamiento de las mitocondrias es una característica asociada al envejecimiento y a las enfermedades neurodegenerativas. La alteración de la cadena respiratoria mitocondrial que produce estrés oxidativo y muerte celular por apoptosis es la causa más evidente. Inflamación y edad son factores que favorecen la aparición de estrés oxidativo. Mutaciones en el material genético mitocondrial o la interacción de proteínas mutadas con mitocondrias son otros factores que alteran la función mitocondrial. La abundancia de insaturaciones en los fosfolípidos de las membranas es un condicionante desfavorable para las neuronas porque ROS generan productos de peroxidación lipídica que contribuyen a las alteraciones neurodegenerativas. También lo es la acumulación de cationes metálicos de transición que intervienen en procesos redox y permiten la formación de radical \bullet OH a través de la reacción de Fenton. La escasa capacidad de regeneración de las neuronas de organismos adultos hace que distintos efectores del estrés oxidativo activen procesos de muerte celular que conducen a la

pérdida de tejido nervioso (Lin y Beal, 2006; Kim *et al.*, 2015).

Efectos de ROS en enfermedad de Alzheimer (EA)

La acumulación extracelular de depósitos de amiloide- β (Ab) y de ovillos de proteína tau dentro de la neurona son alteraciones características de la EA. Tiene una clara relación con el mal funcionamiento de las mitocondrias. De hecho, el estrés oxidativo que se observa desde el comienzo de la enfermedad activa la formación de depósitos de Ab y la fosforilación de tau. También se ha visto que la acumulación de depósitos de Ab aumenta el estrés oxidativo lo que podría constituir un círculo vicioso. Se sabe que Ab también se acumula en mitocondrias alterando el metabolismo energético. La disfunción mitocondrial inducida por Ab se ha relacionado con la liberación de citocromo c y otras proteínas mitocondriales pro-apoptóticas. Por otra parte, la formación de placas de Ab libera citoquinas que inician la respuesta inflamatoria y son una fuente generadora de ROS que produce estrés oxidativo y daño neuronal. Además, las placas de Ab retienen cationes de hierro y cobre que potencian el estrés oxidativo al intervenir en la producción del radical $\bullet\text{OH}$. La elevación de ROS puede activar la ruta de transducción de JNK para inducir apoptosis. El efecto patológico de tau también parece guardar relación con el estrés oxidativo porque la sobreexpresión de tau aumenta la sensibilidad de las neuronas al estrés oxidativo. En la EA se ha observado descenso en la capacidad antioxidante de las neuronas que coincide con la elevación intracelular de ROS. El origen de la alteración mitocondrial en la EA está también sin aclarar. Se ha atribuido a alteraciones en complejos enzimáticos relacionados con el ciclo de Krebs, en los complejos I, III y IV de la cadena respiratoria y en el mecanismo de fosforilación oxidativa (Lin y Beal, 2006; Kim *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017).

Efectos de ROS en enfermedad de Parkinson (EP)

El estrés oxidativo y el mal funcionamiento de las mitocondrias guardan relación directa con la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra del cerebro que caracteriza a la EP. Una alteración esencial que produce estrés oxidativo y activa la ruta apoptótica es el descenso en la actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. La alteración puede estar ligada a alguna mutación en el material genético mitocondrial o a la acumulación y agregación de la proteína α -sinucleína en mitocondrias. En este sentido, la exposición a determinados tóxicos ambientales, entre ellos los pesticidas, parece que aumentan el riesgo de sufrir la EP. Mutaciones genéticas en proteínas como PINK1, DJ-1, α -sinucleína, parkina y LRRK2 alteran la funcionalidad de las mitocondrias y son características de la EP. Otras alteraciones observadas en pacientes con EP son: aumento en la acumulación de catión hierro por las neuronas, que es un factor potencialmente muy tóxico, presencia de subproductos de la peroxidación lipídica y descenso en el contenido de antioxidantes que es especialmente significativo en el caso de GSH. Otra diana del estrés oxidativo que ve deteriorada su función es el proteasoma lo que provoca la acumulación de agregados de proteínas mal plegadas cosa que también ocurre en la EA (Lin y Beal, 2006; Kim *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017).

CONCLUSIÓN

El efecto intracelular de ROS (concretamente H_2O_2) es ambivalente. Puede ser regulador redox o agente patológico dependiendo de la concentración local, duración y contexto celular. Además, el efecto patológico de H_2O_2 puede inducir respuestas contrarias como son proliferación y muerte celular. Este comportamiento demuestra la complejidad de la regulación por ROS y explica los decepcionantes resultados

de los tratamientos antioxidantes. El conocimiento de la acción de ROS a nivel molecular es esencial para entender su papel en procesos patológicos de tipo cardiovascular, tumoral y neurológico y es la garantía para encontrar tratamientos más efectivos.

BIBLIOGRAFÍA

- BEDARD K, KRAUSE KH. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87: 245-313.
- BUETLER TM, KRAUSKOPF A, RUEGG UT. 2004. Role of superoxide as a signaling molecule. *News Physiol. Sci.* 19: 120-123.
- CADENAS S. 2018. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection. *Free Radic. Biol. Med.* 117: 76-89.
- DEBERARDINIS JR, CHANDEL NS. 2016. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* 2: e1600200.
- DRÖGE W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95.
- DWORAKOWSKI R, ANILKUMAR N, ZHANG M, SHAH AM. 2006. Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochem. Soc. Trans.* 34: 960-964.
- FINKEL T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* 194: 7-15.
- HELD P. 2015. An introduction to reactive oxygen species. Measurement of ROS in cells. https://www.biotek.com/assets/tech_resources/ROS%20White%20Paper_2015.pdf
- KALOGERIS T, BAO Y, KORTHUIS RJ. 2014. Mitochondrial reactive oxygen species: A double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol.* 2: 702-714.
- KIM GH, KIM JE, RHIE SJ, YOON S. 2015. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Exp. Neurobiol.* 24: 325-340.
- KUMARI S, BADANA AK, G MM, G S, MALLA R. 2018. Reactive oxygen species: A key constituent in cancer survival. *Biomark. Insights* 13: 1-9.
- LENNICKE C, RAHN J, LICHTENFELS R, WESSJOHANN LA, SELIGER B. 2015. Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun. Signal.* 13-39.
- LIN MT, BEAL F. 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443: 787-795.
- LIU Z, ZHOU T, ZIEGLER AC, DIMITRION P, ZUO L. 2017. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017: 2525967.
- LUSHCHAK VI. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* 224: 164-175.
- MAEJIMA Y, KURODA J, MATSUSHIMA S, AGO T, SADOSHIMA J. 2011. Regulation of myocardial growth and death by NADPH oxidase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 50: 408-416.
- RHEE SG. 2006. A necessary evil for cell signaling. *Science* 312: 1882-1883.
- SAG CM, SANTOS CX, SHAH AJ. 2014. Redox regulation of cardiac hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 73: 103-109.
- SCHIEBER M, CHANDEL NS. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* 24: R453-R462.
- WINTERBOURN CC, HAMPTON MB. 2008. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 45: 549-561.
- YANG W, ZOU L, HUANG C, LEI Y. 2014. Redox regulation of cancer metastasis: molecular signaling and therapeutic opportunities. *Drug Dev. Res.* 75: 331-341.

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE UNA MEZCLA DE PROBIÓTICOS FRENTE A *CRONOBACTER SAKAZAKII* Y *SALMONELLA ENTERICA* EN PREPARADOS RECONSTITUIDOS PARA LACTANTES

Evaluation of the antimicrobial effect of a probiotic mixture against *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* in infant formulas

Candel-Pérez, C.; García-Iborra R.; García-Alonso, J.; Martínez-Graciá, C.*

Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Campus de Excelencia Regional Mare Nostrum, Universidad de Murcia, España

*Autor de correspondencia: Carmen Martínez Graciá. Universidad de Murcia, Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Campus Espinardo, Murcia 30100, España.
E-mail: mamen@um.es

Historial del artículo:

Enviado: 12 de diciembre, 2019

Aceptado: 5 de marzo, 2020

RESUMEN

Cronobacter sakazakii y *Salmonella enterica* son considerados patógenos capaces de causar sepsis y meningitis en lactantes. Se han descrito casos de infección por estos patógenos asociados al consumo de preparados para lactantes contaminados. La inclusión de probióticos en los preparados, además de su papel en la modulación de la microbiota intestinal, podría ser útil para contrarrestar la contaminación de microorganismos patógenos de estos productos una vez reconstituidos y, por lo tanto, reducir el riesgo de infección. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto antimicrobiano de una mezcla de probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium infantis*) frente a *Cronobacter sakazakii* y *Salmonella enterica* en preparados reconstituidos para lactantes. Las muestras (con o sin probióticos) se inocularon con *C. sakazakii* o *S. enterica* y se incubaron a 30 o 40°C durante 72 horas. Los resultados muestran que la presencia de probióticos en los preparados lácteos no tiene un marcado efecto en el crecimiento de los patógenos. Sin embargo sí se ve potenciado su efecto inhibitorio frente a *C. sakazakii* por la interacción entre la temperatura de incubación y los probióticos. Los probióticos empleados fueron viables durante todo el período de incubación, por lo que el agotamiento de los nutrientes se descartó como posible mecanismo de inhibición. La disminución del pH en los preparados lácteos inoculados no explica de manera

satisfactoria un comportamiento tan diferente entre ambos patógenos. Por lo tanto, se sugiere como posible mecanismo inhibitorio la liberación de bacteriocinas específicas con acción contra *C. sakazakii* pero sin efecto contra *Salmonella*. Se deben realizar estudios adicionales para probar esta hipótesis.

Palabras clave: Preparados para lactantes, *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella enterica*, bacteriocinas, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus rhamnosus*

ABSTRACT

Cronobacter sakazakii and *Salmonella enterica* have been implicated in outbreaks causing sepsis and meningitis in infants. Several infection cases have been associated with the consumption of contaminated powdered infant formulae. Besides its role in modulating gut microbiota, the inclusion of probiotics in infant formulae may be useful to counteract pathogen contamination in these products and thus to reduce the risk of infection. The aim of this research was to evaluate the antimicrobial effect of a mixture of the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium infantis* against *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella enterica* in reconstituted follow-on formulae. For that, infant formulae (with or without probiotics) were inoculated with either *C. sakazakii* or *S. enterica* and incubated at 30 or 40°C for 72 hours. Overall, the results showed the presence of probiotics inhibiting the growth of *C. sakazakii* together with incubation temperature (interaction between both factors). Probiotics were viable throughout the incubation period so that nutrient exhaustion could be ruled out as the mechanism of *C. sakazakii* inhibition. Thus, the acidification of media observed during the study was hypothesized to be responsible for pathogen growth inhibition. However, since in the case of formulae inoculated with *Salmonella* the behavior of probiotics and pH values was similar to *C. sakazakii*, the decrease of pH does not satisfactorily explain such a different behavior. So, it is suggested that the production of specific bacteriocins by probiotics against *C. sakazakii* but not against *Salmonella* could be the underlying inhibitory mechanism. Further studies should be carried out to test this hypothesis.

Keywords: Follow-on infant formula, *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella enterica*, bacteriocinas, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus rhamnosus*

1. INTRODUCCIÓN

Los preparados para lactantes de continuación son alimentos destinados a lactantes de entre 5 meses y 3 años que se introducen en la alimentación complementaria y constituyen el principal elemento líquido en una dieta progresivamente diversificada (Comisión Europea, 2016). Con objeto de simular algunos de los aspectos beneficiosos de la leche materna, existen fórmulas de continuación suplementadas con simbióticos -una mezcla de probióticos y prebióticos- capaces de beneficiar al huésped, al mejorar la supervivencia y la implantación de los probióticos en el tracto gastrointestinal (Braegger et al., 2011). La mayoría de los probióticos empleados son bacterias ácido lácticas (BAL) pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, que presentan excelen-

tes propiedades preventivas frente a diversas patologías (Kopp-Hoolihan, 2001). Varias evidencias demuestran que la suplementación de preparados para lactantes con una mezcla de diferentes prebióticos induce una modificación significativa en la composición de la microbiota intestinal de recién nacidos y prematuros, aumentando el número de bacterias ácido lácticas en el colon (Markowiak and Ślizewska, 2017).

Las fórmulas en polvo no son un producto estéril y pueden estar intrínsecamente contaminadas con microorganismos patógenos. Expertos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud concluyeron que los microorganismos de mayor preocupación en los preparados para lactantes en polvo son *Cronobacter sakazakii* y *Salmonella enterica* (FAO/WHO, 2006), ya que se ha demostrado

de manera convincente que estos alimentos contaminadas con dichos patógenos son fuente y vehículo de infección para los lactantes. De hecho, *C. sakazakii* y *Salmonella enterica*, y otros bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, se han visto implicados en casos de meningitis, encefalitis, septicemia y enterocolitis necrotizante en lactantes (Usera et al., 1996; Drudy et al., 2006; Park and Soo-Hwan, 2007; Simón et al., 2010; Salimiyan et al., 2019).

Las posibles rutas por las que *C. sakazakii* y *Salmonella* pueden estar presentes en los preparados y llegar al lactante, puede ser a través de los ingredientes utilizados para prepararlos o por contaminación cruzada durante su reconstitución o almacenamiento. Los principales factores contribuyentes al riesgo de infección son la inadecuada temperatura utilizada durante la reconstitución del preparado en polvo (<70 °C) y el prolongado período de conservación de los biberones a temperaturas superiores a la mínima de crecimiento (5,5 °C) de los patógenos, antes de su utilización (EFSA, 2004; WHO/FAO, 2007).

La termo-resistencia de *C. sakazakii* y *Salmonella*, combinada con la capacidad de persistir en ambientes secos, permite su supervivencia y crecimiento en estos alimentos (Park and Soo-Hwan, 2007; Dancer, 2009; Bai et al., 2019; Kingsbury et al., 2019). Además, *C. sakazakii* y *Salmonella* son capaces de multiplicarse rápidamente en el producto reconstituido a temperatura ambiente, incluso si se almacenan a más de 5 °C durante el tiempo suficiente (FAO/WHO, 2006). Por tanto, un nivel bajo de contaminación podría verse incrementado en función de las condiciones higiénicas adoptadas durante la reconstitución, así como por la duración y la temperatura de almacenamiento (Iversen et al., 2004; Hurrell et al., 2009; Al-Nabulsi et al., 2011; Ghassem et al., 2011).

Aunque la capacidad de *C. sakazakii* y *Salmonella* para crecer en preparados para lactantes en polvo y reconstituidos ha sido estudia-

da por diversos autores (Iversen et al., 2004; Kandhai et al., 2006; Lenati et al., 2008), su comportamiento en preparados con probióticos, y a diferentes temperaturas de conservación tras su reconstitución, no se ha estudiado completamente. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto antimicrobiano de una mezcla de probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium infantis*) frente a *Cronobacter sakazakii* y *Salmonella enterica* en preparados de continuación reconstituidos para lactantes.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Preparados de continuación para lactantes

Se prepararon cuatro muestras reconstituidas de 170 mL, en botellas de vidrio estériles, suplementadas con probióticos a partir de un preparado comercial para lactantes compuesto por una mezcla de 2.0×10^9 UFC /100 g *Lactobacillus rhamnosus* y 2.7×10^8 UFC /100 g *Bifidobacterium infantis*. Como control, se prepararon otras cuatro muestras reconstituidas de 170 mL con el mismo preparado comercial de continuación sin probióticos (también disponible de forma comercial). Ambos tipos de muestras, adquiridas en una farmacia local, se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante (20 g por 150 ml de agua) utilizando agua destilada estéril calentada a 40°C en un baño de agua.

2.2. Medios de cultivo y microorganismos

Se prepararon los siguientes medios de cultivo, de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes: agua de peptona (BPW) (Oxoid, Reino Unido); agar Man Rogosa Sharpe (MRS) (Oxoid, Reino Unido) suplementado con 0,25% de L-cisteína (Sigma-Aldrich, EE. UU.); agar VRBGA (Oxoid, Reino Unido); agar TSA (Oxoid, Reino Unido); solución salina tamporada con fosfato (PBS) pH 7.4 (Sigma-Aldrich, St. USA); caldo BHI (Scharlau, Scharlab, S.L., Italy). Se adquirieron los siguientes medios de

cultivo listos para utilizar: agar *E. sakazakii* (ESIA) (AES Laboratoire), caldo selectivo de *E. sakazakii* (ESSB) (AES Laboratoire), Agar *Salmonella*-*Shigella* (SS) (BioMérieux, Francia) y caldo selenito (Difco, España).

La cepa de *Enterobacter sakazakii* CECT 858, suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (lote 05-10-2006), se reconstituyó en caldo ESSB para posteriormente aislarse en agar ESIA. *Salmonella enterica* serotipo D, fue cedida por el Laboratorio de Microbiología del hospital Virgen de la Arrixaca, aislándose en agar SS a partir de una muestra de heces.

2.3. Diseño experimental

Se realizaron cuatro ensayos para estudiar el crecimiento y la supervivencia de *Salmonella* y *C. sakazakii* a dos temperaturas de incubación diferentes. La Figura 1 muestra cómo los preparados reconstituidos para lactantes (con o sin probióticos) se inocularon con *C. sakazakii* o con *Salmonella enterica*, y se incubaron a 30 o 40°C durante 72 h.

Los inóculos se prepararon transfiriendo una colonia bacteriana de *C. sakazakii* o *Salmonella enterica* a 2 mL de solución salina estéril. Esta suspensión se ajustó a la escala McFarland de 0,5 puntos con un nefelómetro (600 nm) (Densimat®, BioMérieux, Francia), equivalente a una concentración de aproximadamente 10^8 UFC / mL y se diluyó con agua de peptona estéril hasta obtener una concentración de 10^5 UFC/mL. Las muestras reconstituidas (170 mL) se inocularon con 1,7 mL de esta suspensión. El nivel inicial de *C. sakazakii* y *Salmonella enterica* en la preparación reconstituida fue de aproximadamente 10^3 UFC/mL.

Se tomaron alícuotas de cada muestra reconstituida a las 0, 4, 16, 24, 48 y 72 horas de incubación a 30 y 40°C. Una alícuota de 1 mL se empleó para realizar diluciones seriadas 1:10 en PBS hasta 10^{-9} . De cada dilución se sembraron 0,1 mL en agar TSA, VRBG y MRS mediante la técnica de extensión en superficie. Las placas

de TSA y VRBG se incubaron 24 horas a 37 °C, mientras que las placas de MRS se incubaron durante 48 horas a 37°C en una jarra hermética que contenía un sobre de anaerobiosis (Oxoid, Reino Unido). Transcurrida la incubación, se realizó visualmente el recuento bacteriano de enterobacterias en VRBG y de los probióticos en MRS. El agar TSA se empleó para descartar la contaminación extrínseca de las muestras reconstituidas durante el estudio. Además, una alícuota de 100 μ L de los preparados se sembró en ESIA o SS para confirmar el crecimiento de *C. sakazakii* o *Salmonella*, respectivamente, en el reconstituido (límite de detección de 10 UFC/mL). Para completar los ensayos, otra alícuota de las muestras (10 mL) se empleó para realizar una medida de pH (microPH 2000, Crison Instruments S.A., Barcelona, España). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

2.4. Identificación bacteriana

Las colonias azuladas en agar ESIA, susceptibles de ser *C. sakazakii*, y las colonias negras en SS, potencialmente de *Salmonella* spp., se identificaron por su perfil bioquímico con una galería API20E (bioMérieux Reino Unido), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Mediante la base de datos apiweb™ (versión 4.0) se identificaron las presuntas colonias de *Cronobacter* al nivel de especie como *Enterobacter sakazakii* con identificación “buena-excelente” (98.4%), y se identificó *Salmonella* con identificación “buena-excelente” (99.9 %). La confirmación serológica de *Salmonella* se llevó a cabo mediante aglutinación en portaobjetos con antisueros de agrupamiento de *Salmonella* D (Difco *Salmonella* O Antiserum Factor 9, Becton Dickinson, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La identificación fenotípica de los probióticos se basó en las características macroscópicas de las colonias en el medio MRS y por su morfología microscópica tras realizar la tinción de Gram.

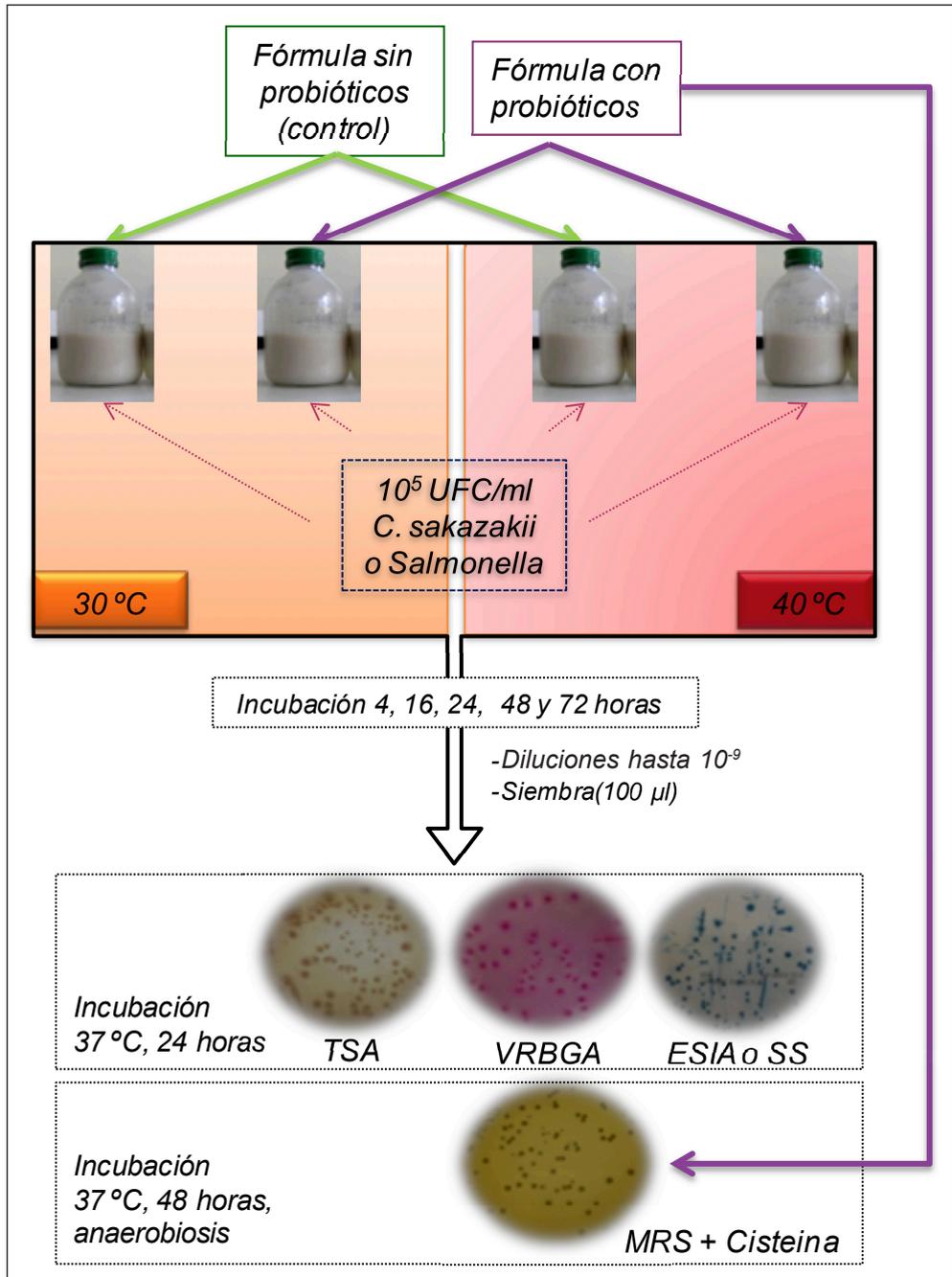


Figura 1. Diseño experimental: los preparados para lactantes (con o sin probióticos) se inocularon con *C. sakazakii* o con *Salmonella enterica*, y se incubaron a 30 o 40°C durante 72 h

2.5. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS (versión 15.0) para Windows. Para estudiar el efecto de la presencia de probióticos, el tiempo de incubación y la temperatura de incubación sobre el crecimiento de los patógenos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el modelo lineal general (GLM), considerando $P < 0,05$ como el nivel de significancia estadística.

3. RESULTADOS

La Tabla 1 y 2 muestran los valores de pH y recuentos de *C. sakazakii* y probióticos obtenidos a partir de los preparados reconstituidos almacenados a 30 y 40 °C respectivamente. Los recuentos de *C. sakazakii* sufrieron variaciones en función a las condiciones de estudio. En las muestras con probióticos, tras la incubación a 30 °C durante 72 horas, la concentración de *C. sakazakii* fue de 3.3 log UFC/mL ($p < 0,05$)

Tabla 1. Valores de pH y recuentos de *Cronobacter sakazakii* y probióticos de los preparados reconstituidos para lactantes y almacenadas a 30 °C

Tiempo de incubación (horas)	Preparados sin probióticos		Preparados con probióticos		
	pH	<i>C. sakazakii</i> (log UFC/mL)	pH	Probióticos(log UFC/mL)	<i>C. sakazakii</i> (log UFC/mL)
0	6.87	2.70	6.64	7.00	2.45
4	6.79	4.00	6.63	7.04	4.00
16	5.51	7.86	5.42	7.09	8.60
24	5.26	8.78	5.26	7.48	9.20
48	4.48	9.18	4.84	7.91	8.41
72	4.33	9.30	4.46	9.18	5.90

Tabla 2. Valores de pH y recuentos de *Cronobacter sakazakii* y probióticos en los preparados reconstituidos para lactantes y almacenadas a 40 °C

Tiempo de incubación (horas)	Fórmula sin probióticos		Fórmula con probióticos		
	pH	<i>C. sakazakii</i> (log UFC/mL)	pH	Probióticos(log UFC/mL)	<i>C. sakazakii</i> (log UFC/mL)
0	6.81	2.15	6.67	7.00	2.62
4	6.83	4.00	6.71	7.20	4.00
16	4.98	8.78	4.74	7.56	7.69
24	4.50	7.86	4.37	7.71	7.41
48	4.35	6.00	3.88	8.13	nd
72	4.29	nd	3.84	8.79	nd

nd: no detectado

menor que en la muestra sin probióticos. Esto supone una disminución del 36.5 % en los recuentos de *C. sakazakii*, sugiriendo el posible efecto antimicrobiano de los probióticos frente a *C. sakazakii* a 30 °C a partir de las 48 horas. Los recuentos de *C. sakazakii* no se recuperaron en las muestras con probióticos a las 48 horas de incubación a 40 °C, mientras que si se aisló la bacteria en ausencia de las bacterias lácticas. Por tanto, el efecto inhibitorio de los probióticos frente *C. sakazakii* se ve potenciado por la temperatura de incubación. Tal y como se observa en la Tabla 1 y 2, los valores de pH de los preparados de continuación disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) durante la incubación, con independencia de las condiciones de estudio.

La Tabla 3 y 4 muestran los valores de pH y recuentos de *Salmonella* y probióticos obtenidos a partir de las muestras reconstituidas almacenadas a 30 y 40 °C respectivamente. Los recuentos bacterianos de *Salmonella* no disminuyeron durante las 72 horas de incubación, independientemente de las condiciones de estudio. Al igual que *C. sakazakii*, los valores de pH de los preparados para lactantes disminuyeron significativamente ($p < 0,05$) durante la incubación a 30 y 40 °C.

La Figura 2 ilustra la evolución del crecimiento de la mezcla de probióticos presente en las muestras reconstituidas. Durante las 72 horas de incubación, se observa un aumento constante de la población de las bacterias lácticas

Tabla 3. Valores de pH y recuentos *Salmonella enterica* y probióticos de los preparados reconstituidos para lactantes y almacenadas a 30 °C

Tiempo de incubación (horas)	Preparados sin probióticos		Preparados con probióticos		
	pH	<i>Salmonella</i> (log UFC/mL)	pH	Probióticos (log UFC/mL)	<i>Salmonella</i> (log UFC/mL)
0	6.82	1.65	6.62	7.00	2.08
4	6.79	2.00	6.67	7.08	5.00
16	5.54	8.86	5.45	7.12	8.45
24	5.08	8.78	5.14	7.11	8.60
48	4.48	10.30	4.52	7.59	8.00
72	4.29	6.04	4.39	8.92	8.65

Tabla 4. Valores de pH y recuentos *Salmonella enterica* y probióticos de los preparados reconstituidos para lactantes y almacenados a 40 °C

Tiempo de incubación (horas)	Preparados sin probióticos		Preparados con probióticos		
	pH	<i>Salmonella</i> (log UFC/mL)	pH	Probióticos (log UFC/mL)	<i>Salmonella</i> (log UFC/mL)
0	6.80	2.04	6.65	7.00	1.90
4	6.78	2.00	6.58	7.26	2.70
16	5.16	8.39	5.06	7.46	8.41
24	4.71	8.60	4.52	7.49	8.13
48	4.49	7.30	3.71	8.20	8.91
72	4.35	nd	3.70	9.94	nd

nd: no detectado

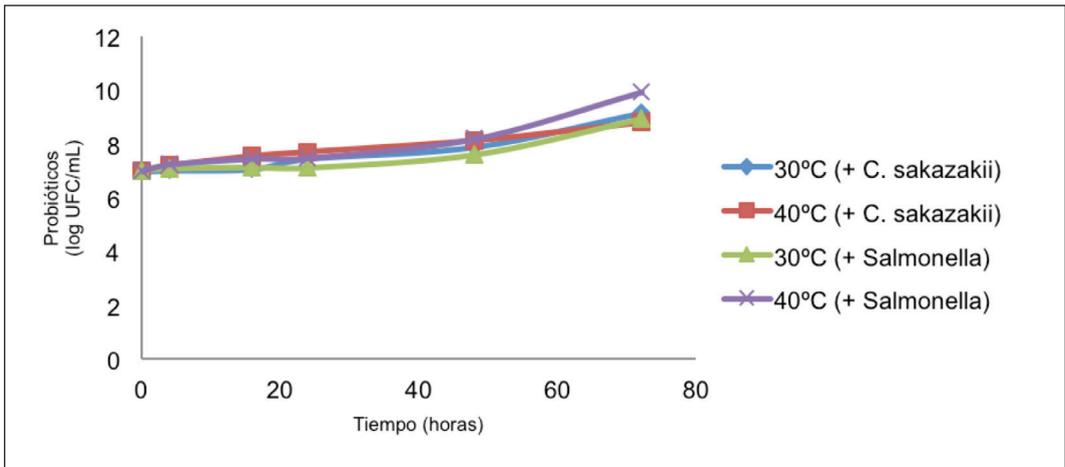


Figura 2. Evolución del crecimiento de la mezcla de probióticos presente en los preparados para lactantes reconstituidas bajo las condiciones de estudio

del preparado, con independencia de la temperatura de incubación y de las variaciones de pH.

4. DISCUSIÓN

Nuestros hallazgos sugieren que la mezcla de probióticos presente en el preparado para lactantes fue capaz de inhibir el crecimiento de *C. sakazakii*, efecto que se vio incrementado por la temperatura de incubación. Al igual que en este experimento, Shaker et al. (2008) informaron de la inhibición de *C. sakazakii* durante el procesamiento y almacenamiento de yogur natural con *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. La competencia por los nutrientes en la matriz alimentaria podría contribuir a la disminución de la población de *C. Sakazakii*. Sin embargo, los probióticos continuaron creciendo a lo largo del período de incubación, por lo que el agotamiento de nutrientes se descarta como mecanismo de inhibición del crecimiento de *C. sakazakii*. En nuestro estudio los valores de pH más bajos se observaron a las 48 y 72 h, coincidiendo con los recuentos más bajos de *C. sakazakii*, sugiriendo

que la acidificación del medio por la producción de ácidos orgánicos u otros metabolitos -peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono y diacetilo-, derivados del crecimiento de las bacterias acidolácticas, podría desempeñar un papel clave en la inhibición de *C. sakazakii*.

Por otra parte, la síntesis de péptidos con actividad antimicrobiana -nisina, lactobrevina, acidofilina- por parte de los probióticos puede inhibir el crecimiento de una amplia gama de patógenos transmitidos por los alimentos, dependiendo de su especificidad (Mishra and Lambert, 1996; O'Connor et al., 2020). *L. acidophilus* DPC 6026 produce sustancias proteicas derivadas de la caseína capaces de inhibir el crecimiento de bacterias como *E. coli* y *E. sakazakii* (Hayes et al., 2006, 2009). Igualmente, otros autores han demostrado el potencial inhibitorio de diversas cepas de BAL sobre el crecimiento de *C. sakazakii* (Kim et al., 2018; Campana et al., 2019; Jamwal et al., 2019), aunque otros estudios han demostrado resultados contradictorios (Al-Holy et al., 2009). La actividad antibacteriana del probiótico *L. acidophilus* ha sido examinada y los resultados

han demostrado que este probiótico no ha sido efectivo para inhibir *C. sakazakii* en preparados para lactantes en polvo o reconstituidas. Del mismo modo, otro estudio mostró que el probiótico *Bifidobacterium breve* no redujo la concentración de *C. sakazakii* en fórmulas infantiles reconstituidas a más de 30 °C, incluso fue capaz de estimular el crecimiento del patógeno tras 2 horas de incubación a 37 °C (Osaili et al., 2008). Estos hallazgos concuerdan con los resultados de nuestro estudio en los que la presencia de probióticos en los preparados reconstituidos para lactantes no tiene efecto inhibitorio sobre el patógeno *Salmonella* en las condiciones probadas. Por tanto, las posibles bacteriocinas secretadas por los probióticos durante su crecimiento podrían explicar el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *C. sakazakii* pero no frente a *Salmonella*. Sin embargo, la posibilidad de que, frente a pH más ácidos, *C. sakazakii* sea más sensible que *Salmonella* no debería descartarse, requiriéndose más estudios para corroborar estas hipótesis.

Los probióticos mantuvieron su viabilidad en las muestras reconstituidas durante las 72 horas de estudio. Este dato es de interés ya que proporciona información sobre la estabilidad de los componentes funcionales de los preparados para lactantes durante su vida útil. Esta supervivencia de los probióticos puede ser muy útil frente a la posible contaminación con microorganismos patógenos, aunque la actividad antimicrobiana del probiótico -o acción simbiótica de pre y probióticos- se espera que se produzca principalmente en el tracto gastrointestinal.

Las condiciones utilizadas en nuestro estudio son improbables siempre y cuando se apliquen las recomendaciones en la reconstitución de preparados para lactantes (EFSA, 2004; WHO/FAO, 2007) PIF can become contaminated with harmful bacteria, such as *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella enterica*. This is because, using current manufacturing technology, it is not feasible to produce sterile PIF. During the preparation of PIF, inappropriate handling

practices can exacerbate the problem. Recognizing the need to address such hazards in PIF, Codex Alimentarius decided to revise the Recommended International Code of Hygienic Practice for Foods for Infants and Children. In doing so it requested specific scientific advice from the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). El enfoque experimental utilizado en este estudio sirve para crear un hipotético ambiente en el cual se puede revelar el posible efecto antimicrobiano de los probióticos frente a *C. sakazakii* y *Salmonella enterica*.

5. CONCLUSIONES

Este estudio demuestra la estabilidad de los probióticos de los preparados para lactantes suplementados durante su vida útil. La presencia de probióticos no mostró ninguna actividad inhibitoria frente a *Salmonella*, mientras que la actividad inhibitoria contra *C. sakazakii* puede deberse a la producción de bacteriocinas específicas contra este enteropatógeno que actúan en función de la temperatura.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la Universidad de Murcia y el Campus Regional de Excelencia Internacional Campus Mare Nostrum.

REFERENCIAS

- Al-Holy, M.A., Lin, M., Abu-Ghoush, M.M., Al-Qadiri, H.M., Rasco, B.A., 2009. Thermal Resistance, Survival and Inactivation of *Enterobacter Sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in Powdered and Reconstituted Infant Formula. *J. Food Saf.* 29, 287–301. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2009.00157.x>
- Al-Nabulsi, A.A., Osaili, T.M., Elabedeen, N.A.Z., Jaradat, Z.W., Shaker, R.R., Kheiralah, K.A., Tarazi, Y.H., Holley, R.A., 2011. Impact of environmental stress desiccation,

- acidity, alkalinity, heat or cold on antibiotic susceptibility of *Cronobacter sakazakii*. Int. J. Food Microbiol. 146, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.013>
- Bai, Y., Yu, H., Du, G., Fei, S., Shi, C., 2019. Survival and Environmental Stress Resistance of *Cronobacter sakazakii* Exposed to Vacuum or Air Packaging and Stored at Different Temperatures. Frontiers in Microbiology, 10, 303
- Braegger, C., Chmielewska, A., Decsi, T., Kolacek, S., Mihatsch, W., Moreno, L., Pieścik, M., Puntis, J., Shamir, R., Szajewska, H., Turck, D., Van Goudoever, J., 2011. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: A systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 52, 238–250. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181fb9e80>
- Campana, R., Federici, S., Ciandrini, E., Mantì, A., Baffone, W. 2019. *Lactobacillus* spp. inhibit the growth of *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 by altering its membrane integrity. J Food Sci Technol 56, 3962–3967.
- Comisión Europea, 2016. REGLAMENTO DELEGADO (UE) 2016/127 DE LA COMISIÓN de 25 de septiembre de 2015. D. Of. la Unión Eur. 1–25. <https://doi.org/10.1166/apm.2014.1068>
- Dancer, G.I., 2009. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae. Lett. Appl. Microbiol. 10, 173. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02601.x>
- Drudy, D., Mullane, N.R., Quinn, T., Wall, P.G., Fanning, S., 2006. *Enterobacter sakazakii*: An Emerging Pathogen in Powdered Infant Formula. Clin. Infect. Dis. 42, 996–1002. <https://doi.org/10.1086/501019>
- EFSA, 2004. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to the microbiological risks in infant formulae and Adopted on 9 th September 2004. EFSA J. 113, 1–35. [https://doi.org/10.1016/0368-2048\(73\)80049-0](https://doi.org/10.1016/0368-2048(73)80049-0)
- FAO/WHO, 2006. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: meeting report. Microbiological Risk Assessment.
- Ghassem, M., Babji, A.S., Forsythe, S.J., Norrakhiah, A.S., 2011. Growth and survival of *Cronobacter* species as measured by media performance. Int. Food Res. J. 18, 367–372.
- Hayes, M., Barrett, E., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Stanton, C., 2009. Evaluation of an Antimicrobial Ingredient Prepared from a *Lactobacillus acidophilus* Casein Fermentate against *Enterobacter sakazakii*. J. Food Prot. 72, 340–346. <https://doi.org/10.1182/blood.V100.1.22>
- Hayes, M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Stanton, C., 2006. Casein-Derived Antimicrobial Peptides Generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. Appl. Environ. Microbiol. 72, 2260–2264. <https://doi.org/10.1097/00019501-199501000-00002>
- Hurrell, E., Kucerova, E., Loughlin, M., Cautilla-Barron, J., Forsythe, S.J., 2009. Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other *Enterobacteriaceae*. Int. J. Food Microbiol. 136, 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.007>
- Iversen, C., Lane, M., Forsythe, S.J., 2004. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. Lett. Appl. Microbiol. 38, 378–382. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01507.x>
- Jamwal, A., Sharma, K., Chauhan, R., Bansal, S., Goel, G., 2019. Evaluation of commercial probiotic lactic cultures against biofilm formation by *Cronobacter sakazakii*. Intest Res.17(2), 192-201
- Kandhai, M.C., Reij, M.W., Grogno, C., Van Schothorst, M., Gorris, L.G.M., Zwietering, M.H., 2006. Effects of preculturing conditions on lag time and specific growth rate

- of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted powdered infant formula. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2721–2729. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2721-2729.2006>
- Kim, D.H., Jeong, D., Song, K.Y., Kang, I.B., Kim, H., Seo, K.H., 2018. Culture supernatant produced by *Lactobacillus kefir* from kefir inhibits the growth of *Cronobacter sakazakii*. *J Dairy Res*, 85, 98-103.
- Kingsbury, J.M., Thom, K., Soboleva, T., 2019. Effect of Storage Temperature on the Survival of New Zealand Egg-Associated *Salmonella* Isolates in and on Eggs. *J Food Prot.* 82 (12), 2161–2168.
- Kopp-Hoolihan, L., 2001. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review. *J. Am. Diet. Assoc.* [https://doi.org/10.1016/S0002-8223\(01\)00060-8](https://doi.org/10.1016/S0002-8223(01)00060-8)
- Lenati, R.F., O'Connor, D.L., Hébert, K.C., Farber, J.M., Pagotto, F.J., 2008. Growth and survival of *Enterobacter sakazakii* in human breast milk with and without fortifiers as compared to powdered infant formula. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.084>
- Markowiak, P., Ślizewska, K., 2017. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients* 9. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Mishra, C., Lambert, J., 1996. Production of anti-microbial substances by probiotics. *Asia Pacific J. Clin. Nat.* 5, 20–24.
- O'Connor, P.M., Kuniyoshi, T.M., Oliveira, R.P., Hill, C., Ross, R.P., Cotter, P.D., 2020. Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 61:160–167.
- Osaili, T.M., Shaker, R.R., Ayyash, M.M., Holley, R.A., 2008. Effect of *Bifidobacterium breve* on the survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant milk formula. *J. Food Prot.* 28, 36–46.
- Park, J., Soo-Hwan, K., 2007. Thermal Resistance and Inactivation of Rehydration of Powdered Infant Formula. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 364–368.
- Salimiyan, R.K., Ghazvini K., Farsiani H., 2019. Clinical and pathogenesis overview of *Enterobacter* infections. *Rev Clin Med.* 6(4), 146-154.
- Shaker, R.S., Osaili, T.M., Ayyash, M., 2008. Effect of thermophilic lactic acid bacteria on the fate of *Enterobacter sakazakii* during processing and storage of plain yogurt. *J. Food Saf.* 170–182. <https://doi.org/10.3109/08958378.2012.757400>
- Simón, M. De, Sabaté, S., Cristina Osanz, A., Bartolomé, R., Dolores Ferrer, M., 2010. Investigación de un caso de infección neonatal por *Enterobacter sakazakii* asociada a un preparado en polvo para lactantes. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28, 713–715. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.04.009>
- Usera, M.A., Echeita, A., Aladuena, A., Blanco, M.C., Reymundo, R., Prieto, M.I., Tello, O., Cano, R., Herrera, D., Martínez-Navarro, F., 1996. Interregional foodborne salmonellosis outbreak due to powdered infant formula contaminated with lactose-fermenting *Salmonella* Virchow. *Eur. J. Epidemiol.* 12, 377–381. <https://doi.org/10.1007/BF00145301>
- WHO/FAO, 2007. Storage and handling of powdered infant formula: guidelines.

HELMINTOS GASTROINTESTINALES EN LIEBRES (*LEPUS GRANATENSIS*) DEL SURESTE DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

Gastrointestinal helminths in hares (*Lepus granatensis*) in the southeast of the iberian peninsula

Alonso de Vega, F.D.; González, M.; Martínez-Carrasco, C.; Gambín, P.; Ruiz de Ybáñez, R.*

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Campus Regional de Excelencia Internacional “Campus Mare Nostrum”, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, España.

***Autor de correspondencia:** Rocío Ruíz de Ybáñez. E-mail: rocio@um.es

Historial del artículo:

Recibido: 6 de enero, 2019

Aceptado: 25 septiembre, 2019

RESUMEN

La liebre ibérica (*Lepus granatensis*) es un mamífero ubicuo en la península ibérica con importantes implicaciones ecológicas y económicas. Para conocer el estatus sanitario de esta especie, se han estudiado la cavidad abdominal y órganos del aparato digestivo de 85 liebres ibéricas procedentes del Altiplano de la Región de Murcia (sureste de España). La prevalencia total de helmintos hallada fue del 87,7%, siendo la prevalencia de nematodos del 82,2%, la de metacestodos del 44,7% y, en el caso de las formas adultas de cestodos, del 5,9%. Las especies de nematodos encontradas fueron *Nematodiroides zembrae* (78.8%), *Passalurus ambiguus* (9.4%) y *Trichostrongylus retortaeformis* (2.4%), en tanto que las especies de cestodos detectadas fueron *Cittotaenia denticulata* (5.9%) y *Cysticercus pisiformis* (44.7%). Los resultados obtenidos demuestran la existencia de una relación positiva entre la intensidad de parasitación de *N. zembrae* y la presencia de *C. pisiformis*.

Palabras clave: Lagomorfo, nematodos, cestodos, Murcia, España.

ABSTRACT

The abdominal cavity and digestive organs of 85 Iberian hares (*Lepus granatensis*) from the Altiplano of the Region of Murcia (southeastern Spain) were studied. The overall prevalence of helminths was 87.7%, including nematodes (82.2% of prevalence), metacestodes (44.7%) and adult cestodes (5.9%). Three nematode species were found: *Nematodiroides zembrae* (78.8%), *Passalurus ambiguus* (9.4%) and *Trichostron-*

gylus retortaeformis (2.4%), while two cestode species were detected: *Cittotaenia denticulata* (5.9%) and *Cysticercus pisiformis* (44.7%). Our results show a positive relationship between *N. zembrae* intensity and the presence of *C. pisiformis*.

Key words: Lagomorph, nematodes, cestodes, Murcia, Spain.

INTRODUCCIÓN

La liebre ibérica (*Lepus granatensis*) es un mamífero autóctono de la península ibérica. Es una de las especies cinegéticas más importantes desde un punto de vista económico en España (Sánchez-García, Alonso, Bartolomé, Pérez, Larsen & Gaudioso, 2012). De hecho, la media anual de liebres cazadas en España supera el millón de animales, lo que supone un considerable recurso como carne de caza (Fernández-Aguilar, Alzaga, Villanúa, Cabezón, García-Bocanegra, Dubey y Almería, 2013). Además, la liebre ibérica tiene un papel relevante en la cadena trófica, ya que forma parte de la dieta de muchas especies depredadoras, tanto aves como mamíferos carnívoros (Gil-Sánchez, Molino, Valenzuela y Moleón, 2000; Moleón y Gil-Sánchez, 2003; Padial, Ávila y Sánchez, 2004; Gil-Sánchez, Ballesteros y Bueno-Segura, 2006).

Durante las últimas décadas se han realizado varios estudios acerca de la liebre ibérica, abarcando aspectos relacionados con la reproducción (Alves, Gonçalves, Santos y Rocha, 2002; Fernández, Soriguer, Castién y Carro, 2008; Fernández, Soriguer, Carro y Castién, 2010), la dinámica poblacional (Carro y Soriguer, 2002; Gortázar, Millán, Acevedo, Escudero, Marco y Fernández de Lucio, 2007) y la selección del hábitat (De la Calzada y Martínez, 1994; Farfán, Duarte, Vargas y Fa, 2011; Sánchez-García *et al.*, 2012). Sin embargo, existen muy pocos estudios referentes a los agentes infecciosos y parasitarios de esta especie de lagomorfo. Esta falta de conocimiento sobre los patógenos que afectan a la liebre ibérica provoca que, a la hora de hacer propuestas de gestión sanitaria de sus poblaciones, se tenga que recurrir a los estudios que

se han realizado sobre la liebre europea (*Lepus europaeus*) (Duarte, Vargas y Farfán, 2002).

La liebre ibérica comparte hábitat con la liebre europea y el conejo de campo (*Oryctolagus cuniculus*), con las implicaciones epidemiológicas que ello conlleva en la posible transmisión interespecífica del virus de la mixomatosis y de la enfermedad vírica hemorrágica (Lopes, Marques, Silva, Magalhães, Pinheiro, Alves, Le Pendu, Esteves, Thompson y Abrantes, 2014; Bertagnoli y Marchandeu, 2015). Por otra parte, se ha demostrado que las liebres pueden tener un papel relevante como reservorio de determinados agentes zoonóticos y, en consecuencia, con importancia desde un punto de vista de la salud pública, tal y como se ha confirmado en el caso de *Leishmania infantum* y *Toxoplasma gondii*, entre otros (Treml, Pikula, Bandouchova y Horakova, 2007; Molina, Jiménez, Cruz, Iriso, Martín-Martín, Sevillano, Melero, Bernal, 2012; Fernández-Aguilar *et al.*, 2013). También se han descrito otros agentes infectocontagiosos, entre los cuales destacan los helmintos, debido a que pueden provocar en los lagomorfos silvestres un efecto negativo sobre la condición corporal del hospedador (Newey, Shaw, Kirby, Montieth, Hudson y Thirgood, 2005; Eira, Torres, Miquel y Vingada, 2007; Alzaga, Vicente, Villanúa, Acevedo, Casas y Gortázar, 2008; Townsend, Newey, Thirgood y Haydon, 2011) y posiblemente sobre la dinámica de las poblaciones de liebre ibérica (Segovia, Vila, Vargas, Fuentes y Feliu, 2014).

Debido a la falta de información que se tiene sobre los parásitos que afectan a la liebre ibérica del sureste de la península ibérica, el objetivo del presente trabajo ha sido describir las comunidades parasitarias y analizar la asociación existente entre las especies parasitarias

halladas en liebres cazadas en la comarca del Altiplano de la Región de Murcia (SE España).

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante el período comprendido entre los años 2000 y 2004 se recibieron en el Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Murcia un total de 43 cadáveres de liebres ibéricas cazadas durante el período oficial de caza de cada temporada en distintos cotos de la comarca del Altiplano (noreste de la Región de Murcia, España). También se recibieron los paquetes gastrointestinales de otras 42 liebres, de la misma área de estudio, que fueron evisceradas por los propios cazadores inmediatamente después de ser abatidas. El área de estudio tiene una extensión aproximada de 1580 km² (38°30'N-38°45'N; 1°00'E-1°30'E), con una altitud que en la mayoría del territorio está comprendida entre 400 y 700 m sobre el nivel del mar. El clima es mediterráneo continental seco, con una temperatura media anual de 14,4-15,5°C, y una precipitación media anual de 300-350 mm (Conesa García, 2007).

De las 43 liebres a las que se les pudo realizar la necropsia, 13 eran machos y 30 hembras, todas ellas adultas. Cuando se contaba exclusivamente con el paquete gastrointestinal, la única información de la que se disponía era que los animales eran adultos, sin haberse determinado el sexo.

En el caso de los animales a los que se les hizo la necropsia, se extrajo el paquete gastrointestinal y se examinaron cuidadosamente todas sus serosas con el fin de detectar la presencia de cisticercos, los cuales fueron conservados en formalina al 10% para su posterior identificación. Cuando solo se disponía del paquete gastrointestinal, este se examinó de igual forma a la antes indicada, previamente a su procesado.

El tubo digestivo se abrió en su totalidad, procesando por separado el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso, con el obje-

tivo de filtrar el contenido de cada una de estas porciones a través de un tamiz de luz de malla de 150 µm. Tras el lavado con agua corriente, el filtrado fue depositado en una copa de sedimentación y, tras media hora en reposo, el sedimento fue examinado mediante un estereomicroscopio. Los parásitos recogidos fueron conservados en etanol al 70% hasta su identificación. Con el fin de detectar trematodos en el hígado, se examinó el contenido de la vesícula biliar, así como el parénquima mediante cortes del mismo que permitían visualizar los conductos biliares.

Para la identificación de los cestodos del tracto intestinal se utilizó la tinción de Carmín Ácido de Semichón, tras lo cual fueron montados en preparaciones permanentes con DPX. La identificación se realizó siguiendo las claves morfométricas de Euzéby (1966), Khalil, Jones y Bray (1994) y Schmidt (2000). En el caso de los nematodos, se procedió a su montaje en lactofenol de Amman (Pritchard y Kruse, 1982), y se identificaron en base a las claves de Danheim y Ackert (1929), Durette-Desset (1979) y Anderson (2000).

La prevalencia y la intensidad de parasitación de cada especie de helminto fue calculada siguiendo los criterios establecidos por Bush, Lafferty, Lotz y Shostak (1997). La normalidad de la distribución de los helmintos en las liebres parasitadas se estudió mediante la prueba de Shapiro-Wilks.

Para comprobar si existía una asociación entre el sexo del hospedador y la presencia de los parásitos más frecuentes se empleó la prueba de Chi-cuadrado corregida de Yates o, cuando era necesario, el test exacto de Fisher. Además, se comprobó la asociación entre la presencia de cisticercos en serosas abdominales y la intensidad de parasitación de las especies de nematodos más prevalentes mediante el test no paramétrico de Wilcoxon (Kirkwood y Sterne, 2003). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa estadístico R Studio versión 1.1.414 (R Studio Team, 2016), con un nivel de significación p-valor inferior a 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prevalencia total de helmintos hallada en nuestro estudio fue del 87,7% y, en concreto, con una prevalencia de nematodos del 82,2%, la de metacestodos del 44,7% y, en el caso de las formas adultas de cestodos, del 5,9%. No se encontró correlación entre ninguna de las especies parasitarias halladas y el sexo del hospedador.

Las especies de nematodos encontradas fueron *Nematodiroides zembrae* (78,8%), *Passalurus ambiguus* (9,4%) y *Trichostrongylus retortaeformis* (2,4%), en tanto que las especies de cestodos detectadas fueron *Cittotaenia denticulata* (5,9%) y *Cysticercus pisiformis* (44,7%). Esta riqueza parasitaria (5 especies de helmintos) coincide con la descrita por Molina-i-Figueras (1998) en liebres ibéricas de Navarra, y es menor a la encontrada por Segovia *et al.* (2014) quienes, en 487 liebres ibéricas cazadas en la provincia de Granada, identificaron seis especies de helmintos. En estudios realizados en liebres de otras zonas del centro y sur de la península ibérica, la riqueza detectada fue de siete (Moreno-Montáñez, Becerra-Martell y Navarrete López-Cozar, 1979) y ocho especies de helmintos (Martínez-Gómez, Hernández-Rodríguez, Rey, Moreno-Montáñez y Acosta, 1987; García-Romero, Corchero y Valcárcel, 2001). En todos estos

estudios, siempre han sido más numerosas las especies de nematodos que las de cestodos. Además, cabe destacar que ninguno de los animales examinados en nuestro estudio presentó trematodos hepáticos, lo que coincide con los resultados de casi todos los estudios previamente realizados en liebre ibérica, en los cuales no se detectó ninguna especie de trematodo (Moreno-Montáñez *et al.*, 1979; Martínez-Gómez *et al.*, 1987; Bordes, Langand, Feliu y Morand, 2007), salvo en el estudio de Molina-i-Figueras (1998), quienes encontraron *Dicrocoelium dendriticum* en liebres de Navarra.

La única especie de cestodo detectada en el intestino delgado de las liebres ibéricas del Altiplano de Murcia fue *Cittotaenia denticulata*, con una prevalencia del 5,9% (Tabla 1), que es similar a las halladas en otras áreas del sur peninsular, como Córdoba (4,4%) (Martínez-Gómez *et al.*, 1987), pero inferior a la detectada en liebres del centro de la península ibérica; en concreto, en animales procedentes de Toledo y Ciudad Real se encontró una prevalencia del 11,8% (García-Romero *et al.*, 2001) y del 16,4% (Alzaga *et al.*, 2008) respectivamente. Recientemente, se ha descrito una prevalencia de *Mosgovoyia pectinata* (17%) en liebres ibéricas de la provincia de Granada (Segovia *et al.*, 2014). Según se desprende de nuestros resultados, y coincidiendo con la opinión de los autores antes citados, la baja prevalencia

Tabla 1. Prevalencia (%) e intensidad de parasitación de las especies de helmintos en las liebres ibéricas del Altiplano de Murcia. La mediana y el rango están calculados a partir de las liebres parasitadas

Especie	<i>Nematodiroides zembrae</i>	<i>Trichostrongylus retortaeformis</i>	<i>Passalurus ambiguus</i>	<i>Cittotaenia denticulata</i>	<i>Cysticercus pisiformis</i>
Prevalencia	78.8% (67/85)	2.4% (2/85)	9.4% (8/85)	5.9% (5/85)	44.7% (38/85)
Intensidad media \pm SD	17.76 \pm 29.90	2 \pm 1	111.8 \pm 268.2	1 \pm 0.0	NC
Mediana (rango)	18 (1-128)	2 (1-3)	10 (2-821)	1 (1)	NC

SD: Desviación estándar; NC: no cuantificado.

de cestodos observada, así como la baja intensidad de parasitación y el buen estado corporal de las liebres a las que se les realizó la necropsia, indica que los cestodos posiblemente no supongan un riesgo sanitario importante para la liebre. No obstante, cabe mencionar que Eira *et al.* (2007), en un estudio realizado en conejos de campo de Portugal, detectaron que los animales con mayor intensidad de parasitación por *M. pectinata* presentaban una menor condición corporal.

En nuestro estudio, las fases larvianas de cestodos presentes en las serosas abdominales correspondieron a *C. pisiformis*, con una prevalencia del 44,7%. Este parásito ha sido descrito en varias especies de lagomorfos, entre los cuales está la liebre ibérica, pero con prevalencias mucho menores a la encontrada en el Altiplano de Murcia. En concreto, Moreno-Montáñez *et al.* (1979) encontraron una prevalencia del 2% en liebres de la provincia de Córdoba; García-Romero *et al.* (2001) y Alzaga *et al.* (2008), en áreas de Toledo y Ciudad Real, detectaron que el 2,9% y el 17,6% de las liebres presentaban cisticercosis visceral, respectivamente. Es decir, los resultados de nuestro estudio indican que las liebres del sureste de la península ibérica presentan la mayor prevalencia descrita hasta el momento en esta especie de lagomorfo. Según Alzaga *et al.* (2008), las liebres con mayor intensidad de parasitación de *C. pisiformis* tienen una menor condición corporal que aquellas que no están parasitadas y, por tanto, se incrementa el riesgo de que sean depredadas por perros o zorros. Este factor, unido al hecho de que en un estudio realizado en la misma área de estudio se detectó la presencia de zorros parasitados con *Taenia pisiformis*, indican que el ciclo biológico de este cestodo se mantiene en el Altiplano posiblemente con la participación del zorro rojo (*Vulpes vulpes*) como diseminador de huevos en el medio natural (Martínez-Carrasco, Ruiz de Ybáñez, Sagarminaga, Garijo, Moreno, Acosta, Hernández y

Alonso, 2007). Por otra parte, en nuestro estudio no se encontró relación estadísticamente significativa entre el sexo de las liebres y la presencia de cestodos, ya fuese en el estadio de metacestodo o en el de cestodo adulto. Este resultado está en consonancia con lo descrito en conejos de campo parasitados por los cestodos *Andrya cuniculi* y *Mosgovoyia ctenoides* (Mead-Briggs y Vaughan, 1973; Butler, 1994; Molina, Casanova y Feliu, 1999; Eira *et al.*, 2007).

Las liebres del Altiplano presentaron una elevada prevalencia del nematodo *N. zembrae* (78,8%), pero con moderadas intensidades de parasitación. Esta prevalencia es mucho mayor que las encontradas por Moreno-Montáñez *et al.* (1979), Martínez-Gómez *et al.* (1987) y Molina-i-Figueras (1998), que oscilan entre el 5 y el 28%, según la zona de estudio. Nuestros resultados están en consonancia con las prevalencias descritas por Bordes *et al.* (2007) en liebres ibéricas del sur de Francia (71%), por García-Romero *et al.* (2001) en liebres ibéricas del centro de la península ibérica (prevalencia del 65,1%), así como por Segovia *et al.* (2014) en liebres de la provincia de Granada (62%). Esta especie de nematodo del intestino delgado es endémica de lagomorfos de la península ibérica, habiéndose descrito también en el conejo de campo con prevalencias que, en algunos casos, pueden ser elevadas; en concreto, Molina *et al.* (1999) detectaron *N. zembrae* con prevalencias comprendidas entre el 59,4% y 71,4% en conejos, dependiendo de la edad de los individuos. Se trata por tanto, de un parásito bastante distribuido en la península ibérica.

La prevalencia que hemos encontrado de *P. ambiguus* (9,4%) es similar a la detectada por García-Romero *et al.* (2001) y Alzaga (2010) en liebres ibéricas del centro de la península ibérica, con valores de 11,1% y 8,6%, respectivamente. Sin embargo, Bordes *et al.* (2007) no encontraron esta especie de oxiuro en liebres del sur de Francia y, en liebres de la provincia de Granada,

Segovia *et al.* (2014) solo hallaron una prevalencia del 1%. *P. ambiguus* es un nematodo que se asienta en el ciego y colon de varias especies de lagomorfos, y aunque la intensidad de parasitación puede ser muy elevada en determinados individuos, tanto en liebres como en conejos (García-Romero *et al.*, 2001; Eira *et al.*, 2007), se considera que es un parásito poco patógeno para el hospedador. Este nematodo presenta un ciclo biológico directo en el que la forma infectiva es una larva que permanece dentro del huevo, el cual es depositado por la hembra del parásito en la zona perianal del hospedador, de manera que la transmisión ocurre durante el acicalamiento o la cecotrofia de los lagomorfos. Las bajas prevalencias de *P. ambiguus* en liebres pudieran estar relacionadas con el hecho de que es un parásito con una distribución discontinua a lo largo de las distintas áreas agro-climáticas (Segovia *et al.*, 2014), así como debido a que las liebres son menos sedentarias y con un carácter menos gregario que el conejo, en el cual las prevalencias son mayores (García-Romero *et al.*, 2001).

Las liebres del Altiplano han presentado una baja prevalencia de *T. retortaeformis* (2,4%), que contrasta con las descritas en otras zonas de la península ibérica, con prevalencias del 21,4% (Moreno *et al.*, 1979) y 15,9% (García-Romero *et al.*, 2001). Una razón que podría explicar la escasa prevalencia encontrada en nuestro estudio es que todas las liebres examinadas eran individuos adultos, ya que, según Boag, Lello, Fenton, Tompkins y Hudson (2001), la prevalencia e intensidad de *T. retortaeformis* se reducen con la edad del lagomorfo, debido a la instauración de una respuesta inmunitaria por parte del hospedador. Por otra parte, hay autores que han sugerido que los tricostronglidos pueden influir en la dinámica poblacional de varias especies del género *Lepus* (Newey *et al.*, 2005; Townsend *et al.*, 2011); en este sentido, la baja prevalencia de *T. retortaeformis* en liebres ibéricas de la provincia de Granada, según Segovia *et al.* (2014), podría ser una de las razones por las cuales es alta la abundancia de estos lagomorfos en el área estu-

diada. Estos mismos autores sugieren, además, que existe una interacción entre *T. retortaeformis* y *N. zembrae*, de manera que se reduce la intensidad de parasitación del primero de ellos con la presencia del segundo. Nuestros resultados, por tanto, son coherentes con esta última hipótesis.

Por último, nuestros resultados permiten proponer que la presencia de *C. pisiformis* en las liebres ibéricas del Altiplano está significativamente relacionada con la intensidad de parasitación de *N. zembrae*. En este sentido, se sabe que los agentes causantes de coinfecciones crean interacciones positivas o negativas entre ellos y el sistema inmunitario del hospedador, facilitando la presencia de estas relaciones parasitarias (Cattadori, Boag y Hudson, 2007; Pedersen y Fenton, 2007).

En definitiva, nuestro estudio aporta una novedosa información acerca de la helmintofauna gastrointestinal de la liebre ibérica en el sureste de la península ibérica, destacando la reducida riqueza parasitaria detectada, pero de manera notoria, la elevada prevalencia de *C. pisiformis*, un parásito que es de los que más impacto puede tener sobre la condición corporal de estos lagomorfos y, en consecuencia, de los patógenos que más debe preocupar a los gestores de esta especie cinegética.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio se pudo realizar gracias a la financiación de la Dirección General del Medio Natural (Comunidad Autónoma de la Región de Murcia).

REFERENCIAS

- Alves, P.C., Gonçalves, H., Santos, M., y Rocha, A. (2002). Reproductive biology of the Iberian hare, *Lepus granatensis*, in Portugal. *Mamm Biol*, 67, 358-371.
- Alzaga, V., Vicente, J., Villanúa, D., Acevedo, P., Casas, F., y Gortázar, C. (2008). Body condition and parasite intensity correlates

- with escape capacity in Iberian hares. *Behav Ecol Sociobiol*, 62(5), 769-775.
- Alzaga, V. (2010). *Ecología de la parasitación de las liebres (Lepus spp.) de la Península Ibérica*. (Tesis Doctoral). Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos. CSIC, UCLM- JCCM. Ciudad Real, España.
- Anderson, R.C. (2000). *Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission*. Wallingford, Oxon (Reino Unido). CABI Publishing.
- Bertagnoli, S., y Marchandeu, S. (2015). Myxomatosis. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 34(2), 549-556.
- Boag, B., Lello, J., Fenton, A., Tompkins, D.M., y Hudson, P.J. (2001). Patterns of parasite aggregation in the wild European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Int J Parasitol*, 31, 1421-1428.
- Bordes, F., Langand, J., Feliu, C., y Morand, S. (2007). Helminths communities of an introduced hare (*Lepus granatensis*) and a native hare (*Lepus europaeus*) in southern France. *J Wildl Dis*, 43(4), 747-751.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., y Shostak, A.W. (1997). Parasitology meets ecology on its own term: Margolis *et al.* revisited. *J Parasitol*, 83(4), 575-583.
- Butler, F.T. (1994). Arthropod and helminth parasites from rabbits *Oryctolagus cuniculus* in south-west Ireland. *Ir Nat J*, 24(10), 392-395.
- Carro, F., y Soriguer, R.C. (2002). *Lepus granatensis* Rosenhauer, 1856. En: Palomo J.L., Gisbert, J. (Eds.). *Atlas de los mamíferos terrestres de España* (pp 452-455). Madrid, España: Dirección General de Conservación de la Naturaleza. SECEM-SECEMU.
- Cattadori, I.M., Boag, B., y Hudson, P.J. (2007). Parasite co-infection and interaction as drivers of host heterogeneity. *Int J Parasitol*, 38, 371-380.
- Conesa García, C. (2007). *El medio físico de la Región de Murcia*. Murcia, España. Editum (Ediciones de la Universidad de Murcia).
- Danheim, B.L., y Ackert, J.E. (1929). On the anatomy of the nematode *Passalurus ambiguus* (Rudolphi). *T Am Microsc Soc*, 80-85.
- De la Calzada, E., y Martínez, F.J. (1994). Requerimientos y selección de hábitat de la liebre Mediterránea (*Lepus granatensis* Rosenhauer 1856) en un paisaje agrícola mesetario. *Ecología*, 8, 381-394.
- Duarte, J., Vargas, J.M., y Farfán, M.A. (2002). *Biología de la liebre ibérica (Lepus granatensis)*. Bases técnicas para la gestión cinegética. En: Lucio, A., Sáenz de Buruaga, M., Editores. *Aportaciones a la gestión sostenible de la caza*. Madrid, España: FEDENCA-EEC.
- Durette-Desset, M.C. (1979). Les Nematodirinae (Nematoda) chez les ruminants et chez les lagomorphes. *Ann Parasitol Hum Comp*, 54(3), 313-329.
- Eira, C., Torres, J., Miquel, J., Vingada, J. (2007). The helminth parasites of the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* and their effect on host condition in Dunas de Mira, Portugal. *J Helminthol*, 81, 239-246.
- Euzéby, J. (1966). *Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine. Tome 2. Maladies dues aux plathelminthes. Fascicule 1. Cestodes*. Paris, Francia, Editorial Vigot Freres.
- Farfán, M.A., Duarte, J., Vargas, J.M., y Fa, J.E. (2011). Effects of human induced land use changes on the distribution of the Iberian hare. *J Zool*, 286 (4), 258-265.
- Fernández, A., Soriguer, R., Castián, E., y Carro, F. (2008). Reproduction parameters of the Iberian hare *Lepus granatensis* at the edge of its range. *Wildl Biol*, 14, 434-443.
- Fernández, A., Soriguer, R., Carro, F., y Castián, E. (2010). Relation between physical condition and reproductive activity in a population of Iberian hares, *Lepus granatensis* in northern Iberian Peninsula. *Folia Zool*, 59(1), 1-8.
- Fernández-Aguilar, X., Alzaga, V., Villanúa, D., Cabezón, O., García-Bocanegra, I., Dubey,

- J.P., y Almería, S. (2013). Epidemiology and prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in the Iberian hare (*Lepus granatensis*). *Vet Parasitol*, 196(1-2), 194-198.
- García-Romero, C., Corchero, J., y Valcárcel, F. (2001). Prevalencia de las helmintosis digestivas y cisticercosis de la liebre ibérica *Lepus granatensis* en la zona central de España. *Ecología*, 15, 225-232.
- Gil-Sánchez, J.M., Ballesteros, E., y Bueno-Segura, J.F. (2006). Feeding of the Iberian *Lynx pardinus* in eastern Sierra Morena (Southern Spain). *Acta Theriol*, 51(1), 85-90.
- Gil-Sánchez, J.M., Molino, F., Valenzuela, G., y Moleón, M. (2000). Demografía y alimentación del águila-azor perdicera (*Hieraetus fasciatus*) en la provincia de Granada. *Ardeola*, 47, 69-75.
- Gortázar, C., Millán, J., Acevedo, P., Escudero, M.A., Marco, J., y Fernández de Lucio, D. (2007). A large-scale survey of brown hare *Lepus europaeus* and Iberian hare *L. granatensis* populations at the limit of their ranges. *Wildl Biol*, 13(3), 244-250.
- Khalil, L.F., Jones, A., y Bray, R.A. (1994). *Keys to the Cestode parasites of vertebrates*. Wallingford, Oxon (Reino Unido). CABI Publishing.
- Kirkwood, B.R., Sterne, J.A. (2003). *Essential medical statistics*, 2nd Edition. Oxford (Reino Unido). Blackwell Publishing, John Wiley & Sons.
- Lopes, A.M., Marques, S., Silva, E., Magalhães, M.J., Pinheiro, A., Alves, P.C., Le Pendu, J., Esteves, P.J., Thompson, G., y Abrantes, J. (2014). Detection of RHDV strains in the Iberian hare (*Lepus granatensis*): earliest evidence of rabbit lagovirus cross-species infection. *Vet Res*, 45, 94.
- Martínez-Carrasco, C., Ruiz de Ybáñez, M.R., Sagarminaga, J.L., Garijo, M.M., Moreno, F., Acosta, I., Hernández, S., Alonso, F.D. (2007). Parasites of the red fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in Murcia, southeast Spain. *Rev Med Vet (Toulouse)*, 158(7), 331-335.
- Martínez-Gómez, F., Hernández-Rodríguez, S., Rey, J.C., Moreno-Montañez, T., y Acosta, I. (1987). Parasitocoenosis of *Lepus capensis* in the south of Spain. *Erkrankg Zootiere*, 29: pp 347-352.
- Mead-Briggs, A.R., y Vaughan, J.A. (1973). The incidence of anoplocephaline cestodes in a population of rabbits in Surrey, England. *Parasitology*, 67(3), 351-364.
- Moleón, M., y Gil-Sánchez, J.M. (2003). Food habits of the wildcat (*Felis sylvestris*) in a peculiar habitat: the Mediterranean high mountain. *J Zool*, 260, 17-22.
- Molina, R., Jiménez, M.I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S., Bernal, J. (2012). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol*, 190(1-2), 268-271.
- Molina-i-Figueras, X. (1998). Estudio parasitocológico de las helmintofaunas de 171 leporidos (lagomorpha) en diferentes ecosistemas (peninsulares-insulares). (Tesis doctoral). Universitat de Barcelona, Barcelona, España.
- Molina, X., Casanova, J.C., y Feliu, C. (1999). Influence of host weight, sex and reproductive status on helminth parasites of the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, in Navarra, Spain. *J Helminthol*, 73, 221-225.
- Moreno-Montañez, T., Becerra-Martell, C., y Navarrete López-Cozar, I. (1979). Contribución al conocimiento de los parásitos de la liebre *Lepus capensis*. *Rev Iber Parasitol*, 39(1-4), 383-393.
- Newey, S., Shaw, D.J., Kirby, A., Montieth, P., Hudson, P.J., y Thirgood, S.J. (2005). Prevalence, intensity and aggregation of intestinal parasites in mountain hares and their potential impact on population dynamics. *Int J Parasitology*, 35(4), 367-373.
- Padial, J.M., Ávila, E., y Sánchez, J.M. (2004). Feeding habits and overlap among red fox

- (*Vulpes vulpes*) and stone marten (*Martes foina*) in two Mediterranean mountain habitats. *Mamm Biol*, 67(3), 137-146.
- Pedersen, A.B., y Fenton, A. (2007). Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends Ecol Evol*, 22(3), 133-139.
- Pritchard MH, Kruse GOW (1982). *The collection and preservation of animal parasites*. Lincoln, Nebraska (USA), University of Nebraska Press.
- RStudio Team (2016). *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, Inc., Boston (USA). Recuperado de <http://www.rstudio.com/> (11 junio 2018).
- Sánchez-García, C., Alonso, M.A., Bartolomé, D.J., Pérez, J.A., Larsen, T.R., y Gaudioso, V.R. (2012). Survival, home range patterns, probable causes of mortality, and den-site selection of the Iberian hare (*Lepus*, Leporidae, Mammalia) on arable farmland in north-west Spain. *Ital J Zool*, 79(4), 590-597.
- Schmidt G.D (2000) *Handbook of tapeworm identification*. Boca Raton, Florida (USA), CRC Press.
- Segovia, J., Vila, T., Vargas, J., Fuentes, M., y Feliu, C. (2014). The helminth community of the Iberian hare, *Lepus granatensis* (Lagomorpha: Leporidae), in the province of Granada, Spain. *Helminthologia*, 51(4), 281-287.
- Townsend, S.E., Newey, S., Thirgood, S.J., y Haydon, D.T. (2011). Dissecting the drivers of population cycles: Interactions between parasites and mountain hare demography. *Ecol Model*, 222(1), 48-56.
- Treml, F., Pikula, J., Bandouchova, H. y Horakova, J. (2007). European brown hare as a potential source of zoonotic agents. *Vet Med Czech*, 52 (10), 451-456.

PRESUNTA PARÁLISIS PERIÓDICA HIPERCALÉMICA CON MIOTONÍA EN PERROS SHI-TZÚ Y PASTOR ALEMÁN

Suspected hyperkalemic periodic paralysis with myotonia in Shi Tzu and German Shepherds dogs

Pellegrino, F.C.

Facultad de ciencias veterinarias. Universidad de Buenos Aires. Chorroarín 280 (1427) – Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

Autor para correspondencia: Fernando Pellegrino. fernando.pellegrino2@gmail.com.ar

Historial del artículo:

Recibido: 1 de febrero de 2019

Aceptado: 8 de enero de 2020

RESUMEN

En los humanos, las canalopatías del músculo esquelético son entidades de base genética y de incidencia muy baja. En relación al canal de sodio en particular, las diferentes mutaciones *SCN4A* pueden dar lugar a diversos fenotipos que van desde la parálisis muscular (parálisis periódica hipercalémica, parálisis periódica hipocalémica) a la hiperexcitabilidad muscular (paramiotonía congénita, miotonías agravadas por potasio), pasando por fenotipos combinados de las dos anteriores. Existe una estrecha interrelación entre la parálisis periódica hipercalémica y las miotonías; ambas características pueden coexistir en el mismo paciente.

Este trabajo describe un cuadro clínico que afectó a una camada de 7 cachorros Pastor Alemán y a una camada de 4 cachorros Shi-Tzú, con episodios caracterizados por un fenotipo clínico de parálisis muscular combinado con hiperexcitabilidad muscular.

De acuerdo a los hallazgos clínicos (fenomenología clínica, edad de aparición, recurrencia de los episodios, ausencia de signos clínicos entre los episodios) y de laboratorio (hipercalémia), y a los resultados del tratamiento con acetazolamida, el diagnóstico presuntivo fue parálisis periódica hipercalémica con miotonía/paramiotonía por una canalopatía *SCN4A*.

Destacamos la importancia del diagnóstico clínico para estas raras patologías. En ausencia de diagnóstico genético, los métodos de diagnóstico complementario tiene valor limitado debido al carácter funcional de estos trastornos.

Proponemos esta comunicación como la primera de este tipo en perros de raza Pastor Alemán y Shi-Tzú.

Palabras clave: Perros; Neurología; Canalopatías de Músculo Esquelético; Parálisis Periódica Hipercalémica; Miotonía/Paramiotonía.

SUMMARY

In humans, skeletal muscle channelopathies are genetic disease with very low incidence. Regarding the sodium channel in particular, the different *SCN4A* mutations can result in various phenotypes ranging from muscle paralysis (hyperkalemic periodic paralysis, hypokalemic periodic paralysis) to muscle hyperexcitability (congenit paramyotonia, myotonias aggravated by potassium), through combined phenotypes of the previous two. There is a close interrelation between hyperkalemic periodic paralysis and myotonias; both characteristics can coexist in the same patient.

This work describes a clinical picture affecting a litter of 7 German Shepherd puppies and a litter of 4 Shih-Tzu puppies with episodes characterized by a clinical phenotype of muscular paralysis combined with muscular hyperexcitability.

Based on clinical findings (clinical phenomenology, age of onset, episodic recurrence, absence of clinical signs in the period between episodes) and laboratory (hyperkalemia), and the results of treatment with acetazolamide, the presumptive diagnosis was hyperkalemic periodic paralysis with myotonia/paramyotonia due to *SCN4A* channelopathy.

We emphasize the importance of clinical diagnosis for these rare pathologies. In absence of genetic diagnosis, complementary diagnostic methods have limited value due to the functional nature of these disorders.

We proposed this description as the first communication of this type in German Shepherd and Shi-Tzu dogs.

Key words: Dogs; Neurology; Skeletal Muscle Channelopathies; Hyperkalemic Periodic Paralysis; Myotonia/Paramyotonia.

INTRODUCCIÓN

La Parálisis Periódica Hipercalemica (PPHiperC) es una canalopatía del músculo esquelético (CME), causada por alteraciones del canal de sodio. Aunque el signo cardinal lo constituyen los episodios de debilidad muscular con flacidez, puede adoptar 3 manifestaciones clínicas diferentes: a) sin miotonía; b) con miotonía clínica o electromiográfica; o c) con paramiotonía (Camacho 1984; Ricker *et al.* 1986; Wagner *et al.* 1997; Kim *et al.* 2001; Okuda *et al.* 2001; Renner y Ptacek 2001; Brancati *et al.* 2003; Jurkat-Rott y Lehmann-Horn 2010; Cannon 2015; 2018; Lowrie y Garosi 2017). En los humanos, los episodios comienzan en la primera década de vida y progresan hasta la pubertad, momento en el que el curso de la enfermedad se estabiliza. Posteriormente, a partir de los 40 años, la frecuencia y gravedad de los episodios disminuye sustancialmente (Zapata-Wainberg *et al.* 2015). En los pacientes que presentan mio-

tonía, los signos disminuyen con el ejercicio (Rüdel y Lehmann-Horn 1985), en oposición a aquellos con paramiotonía, en los que la rigidez muscular se incrementa con la actividad repetida (Cannon 2015).

De acuerdo a la clasificación de miotonías propuesta en medicina veterinaria, la PPHiperC se encuentra incluida en el grupo de las Miotonías No Distróficas (MND). Constituyen un conjunto heterogéneo de trastornos poco frecuentes, causados por canalopatías genéticas de sodio o de cloro. Las miotonías por mutaciones del canal de cloro incluyen la Miotonía Congénita (MC) del Schnauzer miniatura y de otras razas (Pastor Ganadero Australiano y Terrier de Jack Russel). Las miotonías por mutaciones del canal de sodio incluyen la Paramiotonía Congénita (PMC), la PPHiperC y las Miotonías Agravadas por Potasio (MAP) (Lowrie y Garosi 2017). Esta clasificación es la que utilizaremos en este artículo.

El complejo canal de sodio se expresa en las membranas plasmáticas del músculo esque-

lético, tanto en los túbulos transversos como en el sarcolema. Los canales se activan rápidamente (<1 mseg) en respuesta a la despolarización, y producen un gran influjo de sodio, que resulta en una rápida carrera ascendente del potencial de acción. El canal de sodio que predomina en el músculo esquelético es un heterodímero de la subunidad $\text{Na}_v1.4 \alpha$ formadora de poros (Trimmer *et al.* 1989) y la subunidad β_1 no-covalente asociada (Isom *et al.* 1992). La subunidad $\text{Na}_v1.4 \alpha$ está codificada por el gen *SCN4A* en el cromosoma 17q23 (George *et al.* 1992), y la subunidad β_1 por el gen *SCN1B* en el cromosoma 19q13.11 (McClatchey *et al.* 1992). Las mutaciones de la subunidad $\text{Na}_v1.4 \alpha$ producen una variedad de fenotipos clínicos musculoesqueléticos, en los que la excitabilidad muscular puede estar patológicamente aumentada o reducida (Cannon 2015; Lehmann-Horn *et al.* 2004). Las mutaciones *SCN4A* que incrementan la excitabilidad del sarcolema alteran la cinética del canal provocando un aumento de su función. De esta manera impiden la inactivación del canal de sodio y causan un influjo persistente de la corriente de este ion (Cannon 2018; Jurkat-Rott *et al.* 2015; Kim 2014; Statland *et al.* 2018). Una despolarización moderada permite a los canales de sodio normales oscilar entre la recuperación de la inactivación y la reactivación de los canales mutantes, lo que se traduce en disparos repetitivos de potenciales de acción que pueden llevar a miotonía (Jurkat-Rott y Lehmann-Horn 2010; Kim 2014; Jurkat-Rott *et al.* 2015; Zapata-Wainberg *et al.* 2015; Cannon 2018; Statland *et al.* 2018). La despolarización prolongada de la membrana incrementa la actividad de los canales de potasio dependientes de voltaje, lo que amplifica el eflujo de potasio desde la célula muscular e incrementa los niveles de potasio sérico provocando hipercalemia (Tricarico y Camerino 2011). La disminución de la excitabilidad muscular también ocurre por aumento de la función del canal en el segmento que actúa como sensor de voltaje

en las subunidades $\text{Na}_v1.4$ mutantes, creando un poro de activación patógeno a través del cual los cationes se filtran en estado de reposo. Estos poros se activan muy rápidamente y no poseen un mecanismo de inactivación específico, generando una corriente interna de sodio muy pequeña (corriente de poro de activación), que hace a las miofibras susceptibles de una despolarización aberrante en respuesta a niveles de potasio reducidos (Cannon 2015; 2018; Spillane *et al.* 2016). La despolarización hace a la membrana refractaria a producir potenciales de acción. La manifestación clínica son episodios de parálisis muscular flácida, en asociación con concentraciones séricas bajas de potasio. La causa más común es la PPHipoC, con ataques recurrentes de moderada a severa debilidad (Lehmann-Horn *et al.* 2004; Cannon 2015). La miotonía nunca ocurre en estos casos y es un criterio de exclusión para el diagnóstico (Cannon 2018).

Las mutaciones del gen *SCN4A* fueron identificadas como causales de enfermedad mediante cartografía genética (Ptacek *et al.* 1991a; 1993) y análisis mutacional (Ptacek *et al.* 1991b, 1993; Rojas *et al.* 1991) en familias humanas afectadas. Se han identificado más de 70 mutaciones $\text{Na}_v1.4$ en pacientes humanos con trastornos musculoesqueléticos (Huang *et al.* 2017). La mayoría de ellas son mutaciones de sentido erróneo que alteran la función del canal (Zaharieva *et al.* 2016). Entre las mutaciones que causan MND y CME, algunas son recurrentes y pueden ser utilizadas como herramienta molecular para el diagnóstico. Es el caso de las mutaciones del canal de sodio T704M y M1592V (Cannon 2002; Jurkat-Rott *et al.* 2002; Renner y Ptacek 2001), así como también R672H (Jurkat-Rott *et al.* 2000; Sternberg *et al.* 2001), que causan PPHiperC y PPHipoC, respectivamente. En adición a estas mutaciones clásicas, que están asociadas con fenotipos clínicos bien caracterizados (Rüdel *et al.* 1993; Miller *et al.* 2004), existen otras más raras y únicas para una familia en particular, que pue-

den causar tipos inusuales de canalopatías de sodio (Vicart 2004).

De acuerdo a las características de los canales mutantes, las canalopatías de sodio se manifiestan como un espectro de desórdenes que oscilan desde la miotonía hasta la parálisis flácida, con fenotipos clínicos que comparten ambas características en el mismo paciente. De este modo, se han descrito una variedad de subtipos estrechamente relacionados, todos ellos causados por mutaciones de los canales de sodio, cuyas características se superponen con PPHipoC y PPHiperC, incluyendo la PPnormocalémica (PPnormoC), la PMC y las MAP (miotonia fluctuante, miotonía permanente y miotonía sensible a la acetazolamida) (Okuda *et al.* 2001; Jurkat-Rott *et al.* 2015; Cannon 2018; Statland *et al.* 2018). Las manifestaciones clínicas varían desde síndromes miotónicos puros (MAP) a trastornos que cursan primariamente con miotonía y episodios de debilidad (por ej., PMC), o trastornos con debilidad episódica primaria con miotonía ocasional (PPHiperC y PPnormoC) (Cannon 2015,2018; Statland *et al.* 2018). Hay un gran solapamiento entre las distintas enfermedades, y determinar si se trata, por ejemplo, de PMC o PPHiperC depende fundamentalmente de los signos clínicos predominantes (Jurkat-Rott *et al.* 2002, 2015; Zapata-Wainberg *et al.* 2015; Statland *et al.* 2018).

Las opciones de tratamiento consisten en cambios del estilo de vida, minimizando los estímulos desencadenantes de las MND y, si es necesario, tratamiento sintomático de la miotonía. Los pacientes con PMC pueden aliviarse evitando la exposición al frío, y los pacientes con PPHiperC, PMC o MAP pueden hacerlo evitando las comidas ricas en potasio. La utilización de inhibidores de la anhidrasa carbónica (en particular acetazolamida y diclorfeniramina) es de primera elección en las PPHiperC o PPnormoC (Matthews *et al.* 2011; Tricarico y Camerino 2011; Cannon 2015), mientras que el mexiletine, propafenon o flecainida son los fár-

macos de primera elección en el tratamiento de los síndromes miotónicos puros (Mohammadi *et al.* 2005; Rayan *et al.* 2010; Statland *et al.* 2012; Hahn y Salajegheh 2016).

Las canalopatías musculoesqueléticas $Na_v1.4$ homólogas en las especies no humanas ocurren espontáneamente en caballos Cuarto de milla y sus cruza (Rudolph *et al.* 1992), y han sido diseñadas genéticamente en modelos biológicos de ratones (Hayward *et al.* 2008; Wu *et al.* 2011). La mutación equina ha sido rastreada hasta su origen e identificada en un animal fundador con un fenotipo clínico de miotonía y PPHiperC; la crianza selectiva en la industria equina resultó en la rápida diseminación del defecto, que actualmente afecta al 5% de la raza (Rudolph *et al.* 1992). En perros se han comunicado casos con una alta presunción clínica de PPHiperC en una hembra Pit bull de 7 meses de edad (Jezyk 1982). Se ha comunicado también un caso con un video en un perro, clínicamente similar a la PMC, probablemente debido a alteraciones de los canales de sodio (Lowrie y Garosi 2017). En gatos se comunicó un cuadro clínico caracterizado por episodios de rigidez agravados por la administración de potasio, muy similar a las MAP de los humanos (Kiesewetter *et al.* 2011).

El objetivo de este trabajo es la comunicación de una presunta PPHiperC con miotonía en una camada de perros Shi-Tzú y Pastor Alemán, razas en las que no se ha descrito este tipo de MND. Ante la carencia de los métodos complementarios para confirmar el diagnóstico, se destaca la importancia del examen físico y neurológico, que permitió elaborar un diagnóstico presuntivo clínico-terapéutico.

DESCRIPCIÓN DE LOS CASOS CLÍNICOS

Signos clínicos en perros Pastor Alemán

Uno de los cuadros clínicos se observó en una camada de 7 cachorros Pastor Alemán (3 hembras y 4 machos) con inicio de los signos en-

tre los 15 y los 20 días de edad. Los padres eran asintomáticos y era la primera vez que se apareaban entre ellos, aunque por separado ya lo habían hecho, sin antecedentes de enfermedad en las camadas resultantes. La familia había adquirido a la hembra a los 6 meses de edad, y al macho a los 8 meses de edad. Los cachorros nacieron en la casa, mediante parto normal. Vivían juntos en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, sitio en el que se realizó la interconsulta neurológica.

Los perros estaban la mayor parte del tiempo en jaulas grandes, de las cuales salían 4 veces al día. En esta situación, varios minutos después de iniciado el ejercicio, todos ellos presentaban severa rigidez muscular en los miembros pelvianos (miotonía paradójica o paramiotonía) (figura 1). La rigidez era tan intensa que provocaba la caída de los animales, que quedaban gimiendo en decúbito lateral o decúbito dorsal, sin alteraciones cognitivas (figura 2); luego de un rato lograban incorporarse y cesaba el gemitido, aunque permanecían apoyados sobre el es-

ternón y los miembros torácicos, con los miembros pelvianos rígidos en extensión, sin poder movilizarse (figura 3). La duración de los episodios era de unos segundos a pocos minutos; la frecuencia era de 4 veces en el día, siempre coincidente con la salida de la jaula para hacer ejercicio. Todos los cachorros estaban afectados, pero en los machos los signos clínicos eran más severos en intensidad, frecuencia y duración. Las manifestaciones clínicas comenzaron cuando empezaron a caminar, entre los 15 y los 20 días de vida.

Mediante la anamnesis se descartó la posibilidad de intoxicación o infección; los padres estaban correctamente vacunados y todos los cachorros estaban mamando normalmente desde su nacimiento, sin acceso a productos tóxicos.

El examen neurológico de todos los animales afectados fue normal en estado de reposo, y los signos clínicos fueron evaluados gracias a la presentación de videos caseros tomados por los propietarios. Si durante los episodios se tomaba



Figura 1. Varios minutos después de iniciado el ejercicio, todos los cachorros de la camada presentaban severa rigidez muscular en los miembros pelvianos (miotonía paradójica o paramiotonía).



Figura 2. La rigidez era tan intensa que provocaba la caída de los animales, que quedaban gimiendo en decúbito lateral o decúbito dorsal, sin alteraciones cognitivas



Figura 3. Luego de permanecer en decúbito lateral o dorsal unos instantes lograban incorporarse y cesaba el gemido, aunque permanecían apoyados sobre el esternón y los miembros torácicos, con los miembros pelvianos rígidos en extensión, sin poder moverse

en brazos a los cachorros, el gemido cesaba automáticamente; por este motivo se asumió que no se debía a la presencia de dolor, sino al miedo producido por un cuadro agudo de rigidez que imposibilitaba los movimientos con preservación del sensorio.

Ante un cuadro clínico de presentación aguda, con signos que aparecían minutos después de iniciado el ejercicio y desaparecían espontáneamente, y con un examen neurológico normal entre los episodios, los diagnósticos diferenciales que se contemplaron fueron: MND (PMC, MAP o PPHiperC con paramiotonía)

o discinesia paroxística (DP), ambas con base genética y herencia autosómica. No se consideró la presencia de una miotonía congénita por alteraciones del canal de cloro porque el signo cardinal era paramiotonía, y por la ausencia del fenotipo clínico característico (por ejemplo, hipertrofia muscular en los músculos proximales). Si bien no se descartó por completo que los episodios fueran crisis epilépticas, no se consideraron entre los principales diagnósticos diferenciales por la ausencia de signos autonómicos, la conservación de la conciencia y la frecuencia de presentación sin compromiso del estado neurológico en los períodos interictales. De haber sido crisis epilépticas, las causas probables hubieran sido anomalías del desarrollo o enfermedades infecciosas; en el primer caso deberían haberse observado signos clínicos entre los episodios, y en el segundo, signos multifocales y/o sistémicos. En relación a las MND, se descartó que fuera una MAP, que se caracteriza por miotonía aislada (y no por paramiotonía).

A todos los perros se les indicó un análisis de sangre completo, que incluía hemograma, bioquímica sanguínea, ionograma y perfil tiroideo (T4 libre específica y TSH); se propuso a los propietarios la realización de un estudio electromiográfico, pero no fue aceptado. Los resultados del ionograma mostraron hipercalemia en todos los animales (entre 6.8 y 7.2 mEq/L –valores de referencia 3.7-5.2 mEq/L–), y el perfil tiroideo fue normal. En base a estos resultados se descartó la posibilidad de DP, y se indicó una terapia considerando como causal una MND (PPHiperC o PMC). Teniendo en cuenta que la PMC no ha sido descrita en perros (Lowrie y Garosi 2017), se inició tratamiento con acetazolamida (Diamox®, Argentina) a dosis de 10 mg/kg cada 8 hs por vía oral. Los signos clínicos se resolvieron inmediatamente.

De acuerdo a los hallazgos clínicos y de laboratorio, y a los resultados del tratamiento con acetazolamida, el diagnóstico presuntivo fue PPHiperC con paramiotonía por una canalopatía del canal de sodio *SCN4A*.

Se pudo hacer el seguimiento de la camada completa hasta 2 meses después de iniciado el tratamiento. En ese momento los cachorros permanecían asintomáticos sin cambiar la dosis de la medicación, a pesar del aumento de peso. Pasados otros 4 meses, el seguimiento se pudo hacer en 4 de los 7 perros (3 machos y 1 hembra). Todos habían abandonado la medicación entre 2 y 3 meses atrás, y ninguno de ellos repitió signos clínicos.

Signos clínicos en perros Shi-Tzú

El otro de los cuadros clínicos, observado en una camada de 4 cachorros Shi-tzú (3 hembras y 1 macho), se caracterizó clínicamente por episodios combinados de parálisis episódica y rigidez muscular, de aparición aguda, con inicio de los signos entre los 45 y los 60 días de edad. Los perros vivían en diferentes lugares (2 de ellos en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, uno en Pinamar, ciudad situada en la costa Atlántica de la Provincia de Buenos Aires, y el restante en la ciudad de Mendoza) y con diferentes familias, y habían sido comprados en el mismo criadero. Todos ellos fueron revisados en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Los signos clínicos fueron variando con el tiempo y entre los hermanos: en 3 de los perros consistían inicialmente en episodios de debilidad, con flacidez de los miembros pelvianos que a los pocos días se extendió a los miembros torácicos, provocando incapacidad de corregir el decúbito esternal (figura 4). Los episodios comenzaban cuando los animales, estando en reposo, iniciaban el movimiento ante la llegada de los propietarios o al comenzar a jugar; es decir, el inicio generalmente estuvo asociado a estados de excitación inmediatamente luego del reposo. La duración fluctuaba desde minutos hasta 3 horas. La frecuencia de presentación era diaria, a veces 2 o 3 episodios en el mismo día. En una de las perras, los episodios comenzaron con rigidez de los miembros pelvianos, sin flacidez (figura 5). En el transcurso de 7 a 10



Figura 4. **Episodio inicial, consistente en debilidad, con flacidez de los miembros pelvianos y los miembros torácicos, provocando incapacidad de corregir el decúbito esternal**



Figura 5. **En una de las perras, los episodios comenzaron con rigidez de los miembros pelvianos, sin flacidez**

días, todos los animales empezaron a presentar rigidez del tronco y de los miembros pelvianos; en 2 de los perros también se observaron contracciones lateralizadas de la cabeza y la musculatura cervical (figura 6), así como también el denominado signo de von Graefe o *lid lag*. Este

signo es un fenómeno miotónico que consiste en la imposibilidad del párpado superior para acompañar los movimientos del globo ocular hacia abajo después de haber dirigido la mirada hacia arriba (McArdle 1962). Todos los episodios fueron notoriamente más severos en el macho que en las hembras.

Todos los animales concurren a la interconsulta con el servicio de neurología con análisis de sangre realizados previamente, que incluían hemograma completo, bioquímica sanguínea básica (glucemia, uremia, ALT, AST, FAS, proteínas totales, albúmina), y serología de toxoplasmosis y neosporosis. En todos los casos los resultados fueron normales, y las serologías negativas. Al macho y a una de las hembras se les había realizado previamente imágenes por resonancia magnética (IRM); en el macho se había informado el estudio como compatible con lisencefalia, aunque después de observar y analizar las imágenes se consideraron normales, al igual de las de la hembra. Ambos perros ya se encontraban medicados con anticonvulsivantes (clonazepam a dosis de 0,2 mg/kg cada 8 hs, y fenobarbital a dosis de 2,5 mg/kg cada 12 hs), sin resultados positivos en cuanto al control de los signos clínicos. Otra de las hembras ya se encontraba medicada con furosemida (2 mg/kg cada 12 hs) al momento de la interconsulta, por una presunción clínica de hidrocefalia, sin resultados positivos en lo que se refiere al control de los signos clínicos. A la hembra restante se le había realizado una tomografía computada (TC) y, con un diagnóstico presuntivo de meningoencefalitis inmunomediada, comenzó a ser medicada con prednisolona (1 mg/kg cada 12 hs durante una semana para continuar con 1 mg/kg/día). Los signos clínicos persistieron con la misma intensidad pero se espaciaron en el tiempo, con una frecuencia de 3 a 4 episodios por semana. Las imágenes no pudieron ser observadas, porque no se encontraban en poder del propietario.

El examen neurológico de todos los animales afectados fue normal entre los episodios, y

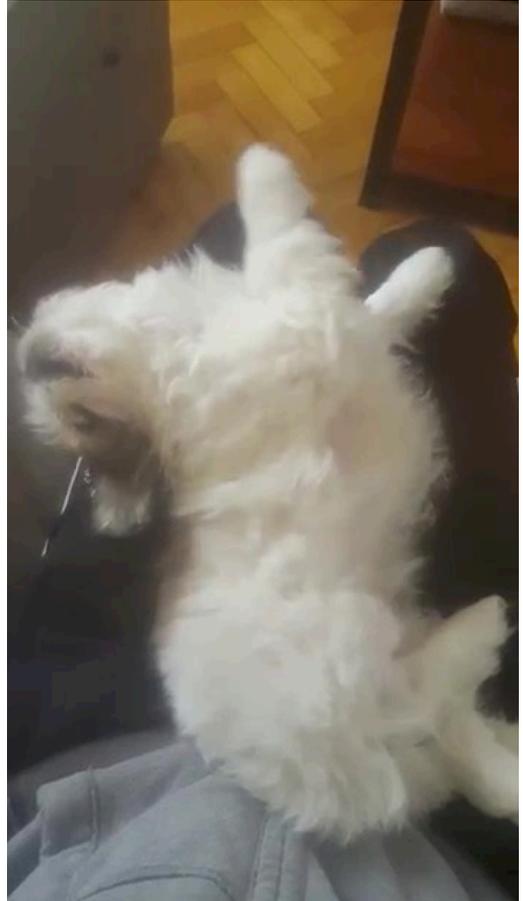


Figura 6. A partir de la semana de iniciado el cuadro clínico, los episodios consistían en rigidez del tronco y de los miembros pelvianos; en 2 de los perros también se observaron contracciones lateralizadas de la cabeza y la musculatura cervical

por ese motivo se desestimaron los diagnósticos que consideraban trastornos estructurales (lisencefalia, hidrocefalia) o inflamatorios (meningoencefalitis inmunomediada). Los signos clínicos fueron evaluados gracias a la presentación de videos caseros tomados por los propietarios.

Ante un cuadro clínico de presentación aguda, con signos que aparecían y desaparecían espontáneamente y examen neurológico normal



Figura 7. En los primeros 2 meses de tratamiento los signos clínicos se limitaron a episodios de rigidez de ambos miembros pelvianos (“salto de conejo”) al iniciar la marcha o la carrera luego del reposo, desencadenados generalmente por situaciones de excitación

entre los episodios, los diagnósticos diferenciales que se contemplaron fueron: crisis epilépticas; DP; MND. Por la gran duración de las crisis (hasta 3 horas), la ausencia de signos autonómicos y la falta de respuesta al tratamiento anticonvulsivante en los 2 perros en los que se había implementado, se descartó que los signos correspondieran a crisis epilépticas; la duración solamente se hubiera explicado por la presencia de lesiones estructurales, que se habían descartado mediante IRM en 2 de los perros. Por la raza afectada, que en nuestro conocimiento no padece de ninguna DP comunicada, y por la duración de los ataques se consideró que este tipo de trastorno era muy poco probable. En consecuencia, el diagnóstico presuntivo a partir del que se elaboró la estrategia diagnóstica fue el de MND. Como ninguno de los animales afectados presentaba signos permanentes que permitieran sospechar patología muscular obvia, tales como marcha rígida, hipometría, dolor muscular, hipertrofia muscular o signo del hoyuelo, se consideró una MND por alteración del canal de

sodio. Debido a la relación de parentesco entre los animales afectados se sospechó una base genética, aunque no se pudieron averiguar antecedentes confiables en relación a los padres o a otras camadas.

En base a esta presunción diagnóstica, a todos los perros se les indicó un ionograma completo y un perfil tiroideo (T4 libre específica y TSH); se propuso a los propietarios la realización de un estudio electromiográfico, pero no fue aceptado. A uno de los perros (al macho) se le indicó potasio por vía oral como prueba diagnóstica. Los resultados del ionograma mostraron hipercalemia en una de las hembras (6.5 mEq/L –valores de referencia 3.7-5.2 mEq/L–), y el perfil tiroideo fue normal en los 4 animales. En el perro al que se le suministró potasio se observó un empeoramiento de los signos clínicos, en relación a su frecuencia e intensidad.

De acuerdo a los hallazgos clínicos y de laboratorio, el diagnóstico presuntivo fue PPHiperC con mionía debido a una canalopatía del canal de sodio (Jurkat-Rott *et al.* 2002; 2015;

Jurkat-Rott y Lehmann-Horn 2010). Se inició un tratamiento con acetazolamida (Diamox®, Argentina) a dosis de 10 mg/kg cada 8 hs.

Con la administración de acetazolamida las manifestaciones clínicas mejoraron inicialmente (luego de 3 o 4 días); la mejoría se manifestó en la frecuencia de los episodios, que pasaron a ser semanales o bisemanales, y en su intensidad. En los primeros 2 meses las manifestaciones clínicas se limitaron a episodios de rigidez de ambos miembros pelvianos (“salto de conejo”) al iniciar la marcha o la carrera luego del reposo, desencadenados generalmente por situaciones de excitación (figura 7), para desaparecer por completo luego de 3 meses de tratamiento, sin cambiar la dosis de la medicación. La acetazolamida fue discontinuada entre los 7 y los 8 meses del diagnóstico, en forma gradual. En la actualidad, a 9 meses de haber realizado el diagnóstico presuntivo y entre 1-2 meses de haber abandonado el tratamiento, los cachorros se encuentran completamente asintomáticos.

DISCUSIÓN

Los casos clínicos descritos en este trabajo se asemejan a la PPHiperC con miotonía/paramiotonía de los humanos (Jurkat-Rott *et al.* 2002, 2015; Jurkat-Rott y Lehmann-Horn 2010; Okuda *et al.* 2001; Wagner *et al.* 1997).

Los hechos que sustentaron el diagnóstico presuntivo fueron la localización neuroanatómica de los signos clínicos (sistema muscular), la edad de presentación, la relación de parentesco entre los animales afectados, el desencadenamiento de los signos clínicos (debilidad y miotonía) en relación al ejercicio (al inicio en los perros Shi-Tzú, luego de un rato de iniciado en los perros Pastor Alemán), la duración de los ataques, la presencia de hipercalemia en todos los perros Pastor Alemán y en uno de los de raza Shi-Tzú, el empeoramiento de los signos clínicos con la administración de potasio en uno de los perros Shi-Tzú y la resolución de los signos luego de administrarles acetazolamida en

todos los perros (Camacho 1984; Okuda *et al.* 2001; Jurkat-Rott *et al.* 2002, 2015; Jurkat-Rott y Lehmann-Horn 2010; Kim 2014; Statland *et al.* 2018).

En la camada de perros Pastor Alemán, la diferenciación entre PMC y PPHiperC con paramiotonía fue dificultosa debido a que los signos clínicos se superponen entre ambos trastornos (Statland *et al.* 2018); se realizó en base a la duración de los episodios, a los hallazgos de laboratorio y a la respuesta a la terapia con un inhibidor de la anhidrasa carbónica. Previamente a la disponibilidad de pruebas de genética molecular existían argumentos para afirmar que ambos trastornos eran una misma enfermedad nosológica. Inclusive, en algunas familias humanas, los pacientes con PMC desde el nacimiento muestran episodios de PPHiperC en la adolescencia (Rayan *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2014; Hahn y Salajegheh 2016). La diferenciación entre ambas patologías es importante porque el tratamiento es diferente; en PMC las drogas de primera elección son el mexiletine, propafenon o flecainida (Mohammadi *et al.* 2005; Rayan *et al.* 2010; Statland *et al.* 2012; Hahn y Salajegheh 2016), mientras que en PPHiperC son los inhibidores de la anhidrasa carbónica (Matthews *et al.* 2011; Tricarico y Camerino 2011; Cannon 2015). La excelente respuesta de los cachorros afectados a la acetazolamida fue uno de los elementos que nos permitieron diferenciar entre PPHiperC y PMC.

El tratamiento de la PPHiperC consiste en disminuir la hipercalemia con fármacos como la acetazolamida, mineralocorticoides, fludrocortisona y dietas bajas en potasio (Naberhaus *et al.* 2008; Jurkat-Rott y Lehmann-Horn 2010; Zapata-Wainberg *et al.* 2015; Dewey y Talarico 2016). En todos los casos presentados en este trabajo la respuesta a la acetazolamida fue exitosa; en los perros Pastor Alemán la resolución de los signos fue inmediata. En los perros Shi-Tzú todos los animales respondieron satisfactoriamente a la administración de acetazolamida, atenuándose los signos clínicos al inicio de la

terapia, para desaparecer por completo luego de 3 meses de tratamiento. Se supone que la acetazolamida estimula la liberación tanto de insulina como de glucagón, lo que promueve en forma subsecuente el influjo de potasio hacia el interior de la célula muscular, mejorando los signos clínicos de la PPHiperC (Dewey y Talarico 2016). La mejoría parcial de uno de los perros Shi-Tzú tratado con prednisolona fue atribuida a la acción de los glucocorticoides sobre el balance electrolítico, incrementando la eliminación de potasio en el tracto intestinal (Cosío *et al.* 2005).

Llama la atención el hecho de no haber tenido que ajustar la dosis con el aumento de peso de los animales debido al crecimiento y también que, al retirar la medicación, no hubo recidivas. Podría deberse a que la enfermedad sea autolimitante en el tiempo, tal como sucede en los humanos con PPHiperC, en los que se observa una disminución de la frecuencia y gravedad de los signos clínicos a partir de los 40 años (Platt y Griggs 2009; Zapata-Wainberg *et al.* 2015). La remisión también podría resultar a partir de una sensibilidad al tiempo de la expresión del gen mutado, tal como sucede en algunas epilepsias juveniles con remisión espontánea (por ej., epilepsia rolándica benigna o epilepsia de ausencia infantil en los humanos, o epilepsia benigna juvenil familiar benigna del Lagotto Romagnolo en los perros) (Roger *et al.* 2005; Jokinen *et al.* 2007; Seppala *et al.* 2011; 2012). En estos casos, los signos comienzan en la segunda fase del desarrollo cerebral pos natal, durante el cual se expresan genes mutados que son reemplazados en la fase final por genes homólogos normales (Arsenault y Zhang 2006).

Los niveles de potasio sérico estuvieron francamente elevados en todos los perros Pastor Alemán; en cambio, los niveles obtenidos de los 4 cachorros Shi-Tzú demostraron la presencia de hipercalemia en uno solo de ellos, resultando normocalémicos los demás. La hipercalemia es muy rara en PMC, siendo la mayoría de los pacientes afectados nor-

mocalémicos (Zapata-Wainberg *et al.* 2015). La normocalemia no descarta la presencia de PPHiperC; muchas personas con este tipo de MND son normocalémicas durante los ataques (Sansone *et al.* 2012; Jurkat-Rott *et al.* 2015; Zapata-Wainberg 2015; Statland *et al.* 2018). En una larga serie de pacientes humanos con la mutación T704M *SCN4A* (una de las 2 más frecuentes en PPHiperC) la hipercalemia durante las crisis se observó solamente en el 50% de los casos (Plassart *et al.* 1994). En una época se consideró a la PPnormoC como un tercer tipo de PP, generando un debate acerca de su real existencia (Poskanzer y Kerr 1961). Un análisis retrospectivo clínico y molecular en familias con PPnormoC demostró mutaciones T704M o M1592V *SCN4A*, que previamente habían sido descritas como causales de PPHiperC, confirmando que la PPnormoC es simplemente una variante fenotípica de la PPHiperC, y no una enfermedad distinta (Chinnery *et al.* 2002).

En relación a la duración de los episodios, en PPHiperC son relativamente breves, entre 15 minutos y 4 horas (Rose y Griggs 2009), mientras que en PMC suelen durar de horas a varios días (Zapata-Wainberg *et al.* 2015). En los casos presentados en este trabajo la duración nunca excedió de unos pocos minutos para los perros Pastor Alemán, ni las 3 horas para los perros Shi-Tzú.

Debido a la relación de parentesco y la presentación simultánea de los signos clínicos en todos los perros, se sospechó una base genética con herencia autosómica. En los humanos, la PPHiperC es de transmisión autosómico dominante. Si sucediera lo mismo en los perros, al menos uno de los padres en ambas camadas debería haber presentado signos clínicos. En el caso de los perros Pastor Alemán, la ausencia de signos clínicos en los padres podría deberse al desconocimiento de la historia en los primeros meses de vida (fueron adquiridos a los 6 y 8 meses de edad), o a que la penetrancia de la enfermedad en esta especie fuera reducida, como sucede con algunas mutaciones puntuales

que provocan PPHiperC con paramiotonía en los humanos (McClatchey *et al.* 1992; Wagner *et al.* 1997). En el caso de los perros Shi-Tzú, por desgracia no se pudieron obtener datos confiables acerca de los padres por falta de colaboración de los criadores. Con respecto al carácter autosómico, en ambas camadas enfermaron tanto las hembras y los machos, aunque en estos últimos los signos clínicos fueron mucho más severos. En medicina humana se describieron casos de mutaciones puntuales en el gen *SCN4A* que causan PPHiperC con paramiotonía en los varones, y solamente descargas miotónicas visibles en el electromiograma en las mujeres, lo que sugiere modificaciones en la expresión clínica relacionadas al sexo. Los autores propusieron una expresividad clínica inferior en las mujeres, causada por una dependencia de la excitabilidad de la fibra muscular en las hormonas sexuales, o la expresión de un canal adicional, con participación en la estabilización del sarcolema, codificado solamente por el cromosoma X (Wagner *et al.* 1997).

No se pudieron realizar pruebas genéticas para identificar la mutación *SCN4A*. En medicina humana, en ausencia de la identificación de la mutación genética, la PPHiperC puede diagnosticarse en base a la presentación clínica, los niveles de potasio sérico durante la crisis y los patrones de anormalidad durante un ejercicio prolongado. Si se sospecha de PPHiperC primaria debe confirmarse que los signos no son secundarios a otras condiciones como tirotoxicosis (Lin 2005) u otras causas que provoquen discalemias (Statland *et al.* 2018). Los perros en cuestión eran eutiroides y sin otras patologías sistémicas que pudieran afectar las concentraciones séricas de potasio.

La presentación clínica de las MND es compleja en todas las especies, y a menudo variable. Aunque algunos métodos de diagnóstico complementario pueden proveer la confirmación de muchos de estos trastornos, o al menos descartar enfermedades que las mimetizan, su valor es limitado debido al origen funcional de estas

condiciones (Abdo *et al.* 2010; Forman *et al.* 2012). En consecuencia, se enfatiza en el hecho que el diagnóstico se apoya fundamentalmente en las observaciones surgidas del examen clínico (Abdo *et al.* 2010; Lowrie y Garosi 2017), tal como lo hemos hecho en los casos descritos.

En medicina veterinaria, la MND por alteración en los canales de sodio se ha demostrado y caracterizado en caballos Cuarto de milla y sus mestizos (Spier *et al.* 1990; Rudolph *et al.* 1992; Meyer *et al.* 1999), y se ha comunicado su fuerte sospecha en perros (Jezyk 1982); ha sido denominado PPHiperC (Lowrie y Garosi 2017).

En los caballos Cuarto de milla se ha identificado la mutación responsable del trastorno, que consiste en un cambio de fenilalanina a leucina en uno de los dominios transmembrana de la proteína *SCN4A* homóloga a la humana (Rudolph *et al.* 1992). El perfil de la enfermedad es muy similar en todos los aspectos a la forma humana de PPHiperC, con 2 excepciones: en caballos siempre cursa con miotonía, y se han descrito casos de muerte súbita durante los episodios (Meyer *et al.* 1999); en la actualidad constituye un modelo animal espontáneo para esta enfermedad (Naberhaus *et al.* 2008).

En los perros, se comunicó la sospecha de PPHiperC en una hembra Pit bull de 7 meses de edad que presentaba episodios de 10 a 15 segundos de colapso asociado al ejercicio, hipotonía en los miembros y en el cuello, y protrusión de la lengua. Los episodios se hicieron más frecuentes con el correr del tiempo. El diagnóstico se apoyó en los signos clínicos, sustentado por un aumento de las concentraciones séricas de potasio. Los signos clínicos se exacerbaban con la administración de potasio por vía oral, lo que se utilizó como apoyo diagnóstico (Jezyk 1982).

Un caso de DP responsiva a la acetazolamida fue comunicado en una hembra de raza Retriever Dorado de 12 semanas de edad. La mayoría de los episodios se desencadenaban por excitación y ejercicio y comenzaban con

marcha rígida y cifosis, progresando a descenso de la cabeza y elevación de los miembros pelvianos. Finalmente, la perra colapsaba con rigidez extensora en los 4 miembros. Una vez desaparecido el factor desencadenante, el tono muscular volvía a la normalidad y los signos desaparecían. La frecuencia de los episodios era de 1 a 8 por día, y la duración variaba de unos pocos segundos a un máximo de 10 minutos. Entre los episodios la perra era completamente normal, y los resultados del hemograma, la bioquímica sanguínea y los electrolitos fueron normales. Los signos desaparecieron completamente 3 días después de comenzar la terapia con acetazolamida (Royaux *et al.* 2016). Este caso difiere a los que presentamos en este trabajo en la ausencia de episodios de flacidez, y en la normalidad de los análisis de laboratorio.

En 12 gatos Europeos de pelo corto se comunicó un cuadro de rigidez muscular agravada por potasio. La edad de inicio de los signos clínicos varió entre los 2 meses a los 3 años y, aunque se sospechó una relación genética entre los animales afectados, no pudo comprobarse. Los resultados de la evaluación neurológica fueron normales en los gatos durante el reposo, pero todos ellos manifestaron episodios de espasticidad muscular inducidos por el estrés o por el ejercicio. Los exámenes complementarios no evidenciaron ningún tipo de anomalía; sin embargo, la administración de una dieta enriquecida con potasio resultó en severo agravamiento de los signos clínicos, lo que permitió el diagnóstico de rigidez muscular agravada por potasio (Kiesewetter *et al.* 2011).

CONCLUSIONES

En base a la fenomenología clínica (debilidad con paramiotonía en los perros Pastor Alemán, debilidad con flacidez y miotonía en los perros Shi-Tzú, edad de presentación, parentesco entre los animales afectados, desencadenamiento de los signos clínicos en relación al ejercicio, presencia de hipercalemia en todos

los individuos de raza Pastor Alemán y en uno de los perros Shi-Tzú), la ocurrencia episódica, la ausencia de signos clínicos entre los episodios y la duración de los mismos, y su empeoramiento cuando se administró potasio por vía oral en uno de los perros Shi-Tzú se propone a esta descripción como la primera comunicación de PPHiperC con paramiotonía en perros Pastor Alemán y PPHiperC con miotonía en perros Shi-Tzú. Tal diagnóstico presuntivo está apoyado por la respuesta favorable tras el inicio de la terapia con acetazolamida. Se propone incorporar estas razas al grupo de perros afectados por PPHiperC con miotonía. El curso de la enfermedad en todos los perros observados indica un curso regresivo, con un pronóstico favorable.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Sofia Cerda-Gonzalez, y a los Dres. Ronaldo Casimiro da Costa y Martí Pumarola Batlle por sus sugerencias y comentarios, que contribuyeron a mejorar el artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdo, W.F., van de Warrenburg, B.P., Burn, D.J., et al. (2010). The clinical approach to movement disorders, *Nat Rev Neurol*, 6, 29-37.
2. Arsenault D., Zhang, Z.W. (2006) Developmental remodelling of the lemniscal synapse in the ventral basal thalamus of the mouse, *J Physiol* 573(Pt 1),121-132.
3. Brancati, F., Valente, E.M., Davies, N.P., Sarkozy, A., Sweeney, M.G., Lo-Monaco, M., et al. (2003). Severe infantile hyperkalaemic periodic paralysis and paramyotonia congenita: broadening the clinical spectrum associated with the T704M mutation in SCN4A, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*;74:1339-41.
4. Camacho, L.M. (1984). Parálisis periódica paramiotónica. Estudio de una familia colombiana, *Acta Méd Col*, 9(2), 53-59.

5. Cannon, S.C. (2002). An expanding view for the molecular basis of familial periodic paralysis, *Neuromusc Disord*, 12, 533–543.
6. Cannon, S.C. (2015). Channelopathies of skeletal muscle excitability, *Compr Physiol*, 5, 761–790.
7. Cannon, S.C. (2018). Sodium channelopathies of skeletal muscle, *Handb Exp Pharmacol*, 246, 309-330.
8. Chinnery, P.F., Walls, T.J., Hanna, M.G., Bates, D., Fawcett, P.R. (2002). Normokalemic periodic paralysis revisited: does it exist? *Ann Neurol*, 52(2), 251–252.
9. Cosío, B.G., Torrego, A., Adcock, I.M. (2005) Mecanismos moleculares de los glucocorticoides, *Arch Bronconeumol*, 41, 34-41
10. Dewey, C.W., Talarico, L.R. (2016). Myopathies: disorders of skeletal muscle (chapter 18). En: C.W. Dewey, R.C. da Costa (Ed.), *Practical guide to canine and feline neurology*. 3rd ed. (pp 481-520). New Delhi, India: Wiley Blackwell.
11. Forman, O.P., Penderis, J., Hartley, C., Hayward, L.J., Ricketts, S.L., Mellersh, C.S. (2012). Parallel mapping and simultaneous sequencing reveals deletions in BCAN and FAM83H associated with discrete inherited disorders in a domestic dog breed, *PLoS Genetics*, 8, e1002462.
12. George, A.L. Jr, Komisarof, R.G., Barchi, R.L. (1992). Primary structure of the adult human skeletal muscle voltage-dependent sodium channel, *Annals of Neurology*, 31, 131-137.
13. Hahn, C., Salajegheh, M.K. (2016). Myotonic disorders: a review article, *Iran J Neurol*, 15(1), 46-53.
14. Hayward, L.J., Kim, J.S., Lee, M.Y., Zhou, H., Kim, J.W., Misra, K., Salajegheh, M., Wu, F.F., Matsuda, C., Reid, V., Cros, D., Hoffman, E.P., Renaud, J.M., Cannon, S.C., Brown, R.H. (2008). Targeted mutation of mouse skeletal muscle sodium channel produces myotonia and potassium-sensitive weakness, *J Clin Invest*, 118, 1437-1449.
15. Huang, W., Liu, M., Yan, S.F., Yan, N. (2017). Structure-based assessment of disease-related mutations in human voltage-gated sodium channels, *Protein Cell*, 8, 401–438.
16. Isom, L.L., De Jongh, K.S., Patton, D.E., Reber, B.F., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A.L., Catterall, W.A. (1992). Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel, *Science*, 256, 839-842.
17. Jezyk, P.F. (1982). Hiperkalemic periodic paralysis in a dog, *J Am Anim Hosp Assoc*, 18, 977-980.
18. Jokinen, T.S., Metsahonkala, L., Bergamasco, L., Viitmaa, R., Syrja, P., et al. (2007) Benign familial juvenile epilepsy in lagotto romagnolo dogs, *J Vet Intern Med*, 21(3), 464–471.
19. Jurkat-Rott, K., Mitrovic, N., Hang, C., et al. (2000). Voltage-sensor sodium channel mutations cause hypokalemic periodic paralysis type 2 by enhanced inactivation and reduced current, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 9549–9554.
20. Jurkat-Rott, K., Lerche, H., Lehmann-Horn, F. (2002). Skeletal muscle channelopathies, *J Neurol*, 249, 1493-1502.
21. Jurkat-Rott, K., Lehmann-Horn, F. (2010). State of the art in hereditary muscle channelopathies, *Acta Myologica*, XXIX, 343-350.
22. Jurkat-Rott, K., Rüdél, R., Lehmann-Horn, F. (2015). Muscle channelopathies: myotonias and periodic paralyses (chapter 38). En: B.T. Darras, H.R. Jones, M.M. Ryan, D.C. De Vivo (Ed.). *Neuromuscular disorders of infancy, childhood, and adolescence* (2nd ed.) (pp 719-734). China: Elsevier Inc.
23. Kiesewetter, I.S., Tipold, A., Baumgärtner, W., Schenk, H.C. (2011). Potassium-aggravated muscle stiffness in 12 cats, *J Am Vet Med Assoc*, 238(8), 1026-1031.
24. Kim J., Hahn, Y., Sohn, H., Lee, Y.J., Yun, J.H., Kim, J.M., et al. (2001). Phenotypic variation of a Thr704Met mutation in ske-

- letal sodium channel gene in a family with paralysis periodica paramyotonia, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 70, 618-23.
25. Kim, J. (2014). Channelopathies, *Korean J Pediatr*, 57(1), 1-18.
 26. Kumar, D., Ambasta, R.K., Kumar, P. (2014). Mutational consequences of aberrant ion channels in neurological disorders, *J Membrane Biol*, 247, 1083-1127.
 27. Lehmann-Horn, F., Rüdel, R., Jurkat-Rott, K. (2004). Nondystrophic myotonias and periodic paralyses (chapter 46). En: A.G. Engel, C. Franzini-Armstrong (Ed.). *Myology*. 3rd ed. (pp 1257-1300). New York: McGraw-Hill.
 28. Lin, S.H. (2005). Thyrotoxic periodic paralysis, *Mayo Clin Proc*, 80, 99-105
 29. Lowrie, M., Garosi, L. (2017). Classification of involuntary movements in dogs: myoclonus and myotonia, *J Vet Intern Med*, 31, 979-987.
 30. Matthews, E., Portaro, S., Ke, Q., Sud, R., Haworth A., Davis, M.B., et al. (2011). Acetazolamide efficacy in hypokalemic periodic paralysis and the predictive role of genotype, *Neurology*, 77, 1960-1964.
 31. McArdle, B. (1962). Adynamia episodica hereditaria and its treatment, *Brain*, 85, 121-48.
 32. McClatchey, A.I., McKenna-Yasek, D., Cros, D., Worthen, H.G., Kuncl, R.W., DeSilva, S.M., Cornblath, D.R., Gusella, J.F., Brown, R.H. Jr. (1992). Novel mutations in families with unusual and variable disorders of the skeletal muscle sodium channel, *Nat Gen*, 2, 148-152.
 33. Meyer, T.S., Fedde, M.R., Cox, J.H., Erickson, H.H. (1999). Hyperkalaemic periodic paralysis in horses: a review, *Equine Vet J*, 31, 362-7.
 34. Miller, T.M., Dias da Silva, M.R., Miller, H.A., Kwiecinski, H., Mendell, J.R., Tawil, R., McManis, P., Griggs, R.C., Angelini, C., Servidei, S., Petajan, J., Dalakas, M.C., Ranum, L.P., Fu Y.H., Ptacek, L.J. (2004). Correlating phenotype and genotype in the periodic paralyses, *Neurology*, 63, 1647-1655.
 35. Mohammadi, B., Jurkat-Rott, K., Alekov, A. (2005). Preferred mexiletine block of human sodium channels with IVS4 mutations and its pH dependence, *Pharm Gen*, 15, 235-44
 36. Naberhaus, B., Cormand, B., Cuenca-León, E., Ribasés, M., Monells, J. (2008). Parálisis periódica hipercaliémica: presentación de una familia española con la mutación p.Thr704Met en el gen *SCN4A*, *Neurología*, 23(7), 427-435.
 37. Okuda, S., Kanda, F., Nishimoto, K., Sasaki, R., Chihara, K. (2001). Hyperkalemic periodic paralysis and paramyotonia congenita. A novel sodium channel mutation, *J Neurol*, 249, 1003-4.
 38. Plassart, E., Reboul, J., Rime, C.S., et al. (1994). Mutations in the muscle sodium channel gene (*SCN4A*) in 13 French families with hyperkalemic periodic paralysis and paramyotonia congenita: phenotype to genotype correlations and demonstration of the predominance of two mutations, *Eur J Hum Genet*, 2, 110-124.
 39. Platt, D., Griggs, R. (2009). Skeletal muscle channelopathies: new insights into the periodic paralyses and nondystrophic myotonias, *Curr Opin Neurol*, 22(5), 524-31.
 40. Poskanzer, D.C., Kerr, D.N. (1961). A third type of periodic paralysis, with normokalemia and favourable response to sodium chloride, *Am J Med Sep*, 31, 328-342.
 41. Ptacek, J.L., Tyler, F., Trimmer, J.S., Agnew, W.S., Leppert, M. (1991a). Analysis in a large hyperkalemic periodic paralysis pedigree supports tight linkage to a sodium channel locus, *Am J Hum Genet*, 49, 378-82.
 42. Ptacek, L.J., George, A.L. Jr, Griggs, R.C., Tawil, R., Kallen, R.G., Barchi, R.L., et al. (1991b). Identification of a mutation in the gene causing hyperkalemic periodic paralysis, *Cell*, 67, 1021-7.

43. Ptacek, L.J., Kohnson, K.J., Griggs, R.C. (1993). Genetics and physiology of the myotonic muscle disorders, *N Eng J Med*, 328(7), 482-489.
44. Rayan, R., Dipa, L., Michael, H.G. (2010). Skeletal muscle channelopathies: nondystrophic myotonias and periodic paralysis, *Current Opinion in Neurology*, 23(5), 466-76.
45. Renner, D.R., Ptacek, L.J. (2001). Periodic paralyzes and nondystrophic myotonias, *Neuromusc Disord*, 15, 235-52.
46. Ricker, K., Rohkamm, R., Böhlen, R. (1986). Adynamia episodica and paralysis periodica paramyotonica, *Neurology*, 36, 682-6.
47. Roger, J., Bureau, M., Dravet, C., Genton, P., Tassinari, C.A., et al. (2005) *Epileptic syndromes in infancy, childhood and adolescence* (4th edition). John Libbey Eurotext. 616 p.
48. Rojas, C.V., Wang, J., Schwartz, L.S., Hoffman, E.P., Powell, B.R., Brown, R.H. (1991). A Met-to-Val mutation in the skeletal muscle Na⁺ channel alpha-subunit, *Nature*, 354, 387-9.
49. Rose, M., Griggs, R.C. (2009). Hereditary nondegenerative neuromuscular disease. En: C.G. Goetz (Ed). *Textbook of clinical neurology*. 3^a ed. (pp. 813-826). Philadelphia: Saunders.
50. Royaux, E., Bhatti, S., Harvey, R. et al. (2016) Acetazolamide-responsive paroxysmal dyskinesia in a 12-week-old female golden retriever dog, *Vet Quart*, 36, 45-49.
51. Rüdel, R., Lehmann-Horn, F. (1985). Membrane changes in cells from myotonia patients, *Physiol Rev*, 65, 310-356.
52. Rüdel, R., Ricker, K., Lehmann-Horn, F. (1993). Genotype-phenotype correlations in human skeletal muscle sodium channel diseases, *Arch Neurol*, 50, 1241-1248.
53. Rudolph, J.A., Spier, S.J., Byrns, G., Rojas, C.V., Bernoco, D., Hoffman, E.P. (1992). Periodic paralysis in quarter horses: a sodium channel mutation disseminated by selective breeding, *Nat Gen*, 2, 144-147.
54. Sansone, V.A., Ricci, C., Montanari, M., Apolone, G., Rose, M., Meola, G.; INQoL Group. (2012). Measuring quality of life impairment in skeletal muscle channelopathies, *Eur J Neurol*, 19, 1470-1476.
55. Seppala, E.H., Jokinen, T.S., Fukata, M., Fukata, Y., Webster, M.T., et al. (2011) LGI2 truncation causes a remitting focal epilepsy in dogs, *PLoS Genet*, 7(7), e1002194. doi: 10.1371/journal.pgen.1002194.
56. Seppala, E.H., Koskinen, L.L.E., Gulløv, C.H., Jokinen, P., Karlskov-Mortensen, P., et al. (2012) Identification of a Novel Idiopathic Epilepsy Locus in Belgian Shepherd Dogs., *PLoS ONE*, 7(3): e33549. doi:10.1371/journal.pone.0033549.
57. Spier, S.J., Carlson, G.P., Holliday, T.A., Cardinet, G.H. 3rd, Pickar, J.G. (1990). Hyperkalaemic periodic paralysis in horses, *J Am Vet Med Assoc*, , 1971009-1017.
58. Spillane, J., Kullmann, D.M., Hanna, M.G. (2016). Genetic neurological channelopathies: molecular genetics and clinical phenotypes, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 87, 37-48.
59. Statland, J.M., Bundy, B.N., Wang, Y., Rayan, D.R., Trivedi, J.R., Sansone, V.A., et al. (2012). Mexiletine for symptoms and signs of myotonia in nondystrophic myotonia: a randomized controlled trial, *JAMA*, 308(13), 1357-65.
60. Statland, J.M., Fontaine, B., Hanna, M.G., Johnson, K.E., Kissel, J.T., et al. (2018). Review of the diagnosis and treatment of periodic paralysis, *Muscle Nerve*, 57, 522-530.
61. Sternberg, D., Maisonobe, T., Jurkat-Rott, K., et al. (2001). Hypokalaemic periodic paralysis type 2 caused by mutations at codon 672 in the muscle sodium channel gene SCN4A, *Brain*, 124, 1091-1099.
62. Tricarico, D., Camerino, D.C. (2011). Recent advances in the pathogenesis and drug

- action in periodic paralyses and related channelopathies, *Front Pharmacol* 2, 8.
63. Trimmer, J.S., Cooperman, S.S., Tomiko, S.A., Zhou, J., Crean, S.M., Boyle, M.B., Kallen, R.G., Sheng, Z., Barchi, R.L., Sigworth, F.J., Goodman, R.H., Agnew, W.S., Mandel, G. (1989). Primary structure and functional expression of a mammalian skeletal muscle sodium channel, *Neuron*, 3, 33-49.
64. Vicart, S. (2004). New mutations of SCN4A cause a potassium-sensitive normokalemic periodic paralysis, *Neurology*, 63, 2120-7.
65. Wagner, S., Lerche, H., Mitrovic, N., et al. (1997) A novel sodium channel mutation causing a hyperkalemic paralytic and paramyotonic syndrome with variable clinical expressivity, *Neurology*, 49, 1018-1025
66. Wu, F., Mi, W., Burns, D.K., Fu, Y., Gray, H.F., Struyk, A.F., Cannon, S.C. (2011). A sodium channel knockin mutant (NaV1.4-R669H) mouse model of hypokalemic periodic paralysis, *J Clin Invest*, 121, 4082- 4094.
67. Zaharieva, I., Thor, M., Oates, E., Karnebeek, C., Hendson, G., Blom, E., Witting, N., Rasmussen, M., Gabbett, M., Ravenscroft, G., Sframeli, M., Sutterlin, K., Sarkozy, A., D'Argenzio, L., Hartley, L., Matthews, E., Pitt, M., Vissing, J., Bellegard, M., Krarup, C., Slordhal, A., Halvorson, H., Ye, C., Zhang, L.H., Lokken, N., Werlauf, U., Abdelsayed, M., Davis, M.R., Feng, L., Phadke, R., Sewry, C.A., Morgan, J.E., Laing, N.G., Vallance, H., Ruben, P., Hanna, M.G., Lewis, S., Kamsteeg, E.J., Mannikko, R., Mutoni, F. (2016). Recessive loss-of-function SCN4A mutations associated with a novel phenotype of congenital myopathy, *Brain*, 139, 674-691.
68. Zapata-Wainberg, G., Gallego de la Sacristana, M., Vivancos, J. (2015). Canalopatías del músculo esquelético de base genética: parálisis periódicas y miotonías no distróficas, *Medicine*, 11(75), 4511-5.

**RESÚMENES TRABAJOS
FIN DE GRADO
2017-2018**

MATEO VILLORA Y FLORES (1838-1899): VETERINARIO ALBACETENSE COMPROMETIDO CON LA PROFESIÓN Y CON LA SOCIEDAD

Alfaro, J. S.; Gil, F*.

***Autor para correspondencia:** Francisco Gil Cano. Email: cano@um.es. Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo, Universidad de Murcia. 30100-Murcia. España. Tel: 868 884698

RESUMEN

En este trabajo de fin de grado sobre historia de la veterinaria, pretendemos dar a conocer ciertos datos biográficos del veterinario Mateo Villora y Flores. Nacido en Albacete en 1838, estudió veterinaria en el Real Colegio Escuela de Madrid, donde obtuvo su título en 1861. Desde el punto de vista profesional, Mateo Villora se ocupó de la inspección de carnes de esta ciudad, ejerciendo además el cargo de Subdelegado de Veterinaria. Pero uno de los aspectos más importantes de este albaceteño, y que nos ha hecho dar pie a esta investigación y a poner tal interés es que durante la epidemia de cólera que sufrió parte de España en 1885, ayudó de manera desinteresada a las personas afectadas por esta enfermedad, siendo por ello nombrado hijo predilecto de Albacete y otorgándole su nombre a una de las plazas de esta ciudad.

Para llevar a cabo nuestra investigación hemos recurrido a diversas fuentes de información, especialmente archivos históricos de la provincia de Albacete y diferentes hemerotecas digitales donde pudimos encontrar, tanto documentos relativos al propio Mateo Villora como relativos al estado de la profesión veterinaria durante el siglo XIX. También hemos recabado información relacionada con la epidemia de cólera que en 1885 afectó a gran parte de la población de esta provincia. De esta manera hemos podido compilar una serie de datos y conocimientos que no eran conocidos para la profesión veterinaria española ni para la sociedad en general.

Los resultados que arrojan nuestra investigación describen numerosos aspectos biográficos de Mateo Villora y Flores así como datos vinculados a su actividad profesional. También aportamos los documentos que acreditan el reconocimiento que tuvo por parte de las autoridades locales por su importante labor durante la epidemia de cólera antes mencionada, y su compromiso con la salud pública.

De esta forma, rescatamos para la historia de la veterinaria española a un importante veterinario del siglo XIX que prácticamente era desconocido para nuestra profesión. No solo desarrolló su actividad en el campo de la veterinaria, sino también en otros ámbitos inusuales o no tan conocidos pero que son de gran relevancia para salud pública. Y es por todo ello, que además de haber sido un buen profesional, también es un ejemplo a seguir.

Palabras clave: Veterinario; Albacete; Cólera

ABSTRACT

In this work we show some biographic notes of Mateo Villora y Flores, a veterinarian who was born in Albacete in 1838, and studied Veterinary Medicine at Real Colegio Escuela of Madrid, where he got his degree in 1861.

From a professional point of view, Mateo Villora was in charge of the city's meat inspection, while also working as sub-delegate of veterinary. But one of the most important aspects of this veterinarian, and what made us lead this research with such interest, is that during the cholera epidemic that affected part of Spain in 1885, he selflessly helped the people affected by this disease, which led to him being named Albacete's Favourite Son for all his work and merits and naming one of the city's squares after him. Therefore, he is an example of the importance of Veterinary Medicine in other areas.

To carry out our research we have used various sources of information, especially historical archives of the province of Albacete and different digital newspaper archives where we were able to find documents relating to Mateo Villora himself and the state of the veterinary profession during the nineteenth century. We have also collected information related to the cholera epidemic that affected a large part of the population of this province in 1885. This is how we have been able to compile a series of data and knowledge that were not known to the Spanish veterinary profession or to society in general. We were able to verify that Mateo Villora y Flores was a character practically unknown in the field of the history of our profession. We didn't find any references of him, neither in the books that explain the history of our profession, nor in professional associations, or even in the minutes books of the National and Ibero-American Congresses of Veterinary History held up until 2016. The lack of information about this amazing veterinarian led us to propose an investigation with the following aims:

1º) Discover relevant information regarding the biography of D. Mateo Villora y Flores related to his personal life by providing copies of original documents kept in archives and newspaper archives.

2º) To investigate his professional work, focusing on the role he played during the cholera epidemic that affected the province of Albacete in 1885.

We started this project with two extensive sections of bibliographic review. In the first of them we attempted to become acquainted with the veterinary profession during the nineteenth century, the period in which the life of the character unfolds. In the second section we aimed at describing the cholera and other epidemics that our country suffered during that century in order to understand what was known about that disease, to further discover how it affected society and what remedies were applied for its eradication, especially regarding the impact it had in the province of Albacete, where Mateo Villora y Flores practised his professional activity.

So, the results of our research describe numerous biographical aspects of Mateo Villora y Flores as well as data related to his professional activity. We also provide the documents that certify the recognition he received from the local authorities for his important work during the aforementioned cholera epidemic, and his commitment to public health.

This way, we were able to rescue the history of an important Spanish veterinarian of the nineteenth century who was practically unknown to our profession. He did not only develop his activity in the veterinary field, but also in other unusual or not so well known areas of great relevance for public health. And that is why, apart from being a great professional, he is also an example to follow.

Key words: Veterinarian; Albacete; Cholera

ESTUDIO CLÍNICO DEL ESTORNUDO INVERSO EN 65 PERROS

Barrales, I; Talavera, J.

***Autor para correspondencia:** Jesús Talavera. Email: talavera@um.es. Universidad de Murcia. Murcia 30100. España.

RESUMEN

El estornudo inverso es un fuerte sonido inspiratorio que se produce como reflejo ante un estímulo mecánico sensitivo en las vías respiratorias superiores para mantenerlas permeables, presenta una duración variable de segundos a minutos, y que hace su aparición en forma de ataque paroxístico. Actualmente es muy escasa la bibliografía que recoge información sobre este síntoma. De manera que se ha realizado un estudio retrospectivo descriptivo de 65 casos atendidos en el Hospital Veterinario de la Universidad de Murcia entre los años 2005-2018. De este estudio se extrae que el estornudo inverso no presenta predilección por sexo, edad o raza, pero sí por animales de pequeño tamaño o talla toy. De igual manera queda reflejado que este síntoma puede aparecer de manera aislada y fisiológica, o como parte de un cuadro sintomático. La investigación diagnóstica debe confirmar o no la presencia de causas primarias del estornudo inverso, incluyéndose en el mismo pruebas de imagen, siendo de especial utilidad el uso de endoscopia de ésta forma desechar posibles causas que originen el estornudo inverso, aunque en muchas ocasiones el costo económico puede suponer un impedimento para la realización y obtención de un diagnóstico definitivo. Finalmente, el 23% de los casos se diagnosticaron como estornudo inverso fisiológico, el 49% consecuencia de una patología respiratoria, el 3% se debió a un proceso gastrointestinal, y el 1,53% a enfermedad periodontal, permaneciendo un 23% con diagnóstico abierto. Por lo que se extrae que el estornudo inverso ha aparecido en este estudio con mayor frecuencia de manera aislada, o asociado a un cuadro de enfermedad respiratoria, presentándose de manera escasa asociado a otros cuadros sintomatológicos.

Palabras clave: estornudo inverso, perro, distrés respiratorio, estridor

ABSTRACT

Reverse sneezing is a strong inspiratory noise that occurs as a reflex against a mechano-sensitive stimulus in the upper respiratory tract, to keep it permeable, it presents a duration of seconds to minutes, and has a paroxysmal form of attack. Currently, the bibliography that collects information about this symptom is quite poor. The present study is a descriptive retrospective study of 65 cases attended in the Veterinary Hospital of the University of Murcia between the years 2005-2018. This study shows reverse sneezing has no predilection for sex, age or race, but it does for animal of small size or toy size. It is also reflected that this symptom can appear

in an isolated and physiological way, or as part of symptomatology. The diagnostic investigation must confirm or not the presence of primary causes of reverse sneezing, including imaging tests, being of special importance the use of endoscopy, and this way discard possible causes of the reverse sneeze, although in many cases the cost can be an impediment to the realization and obtaining a definitive diagnosis. Finally, 23% of the cases were diagnosed as physiological reverse sneezing, 49% as a consequence of a respiratory pathology, 3% due to a gastrointestinal process, and 1.53% to periodontal disease, remaining 23% with open diagnosis. So it is shown that the reverse sneeze has appeared in this study more frequently in isolation, or associated with a respiratory disease, presenting in a scant way associated with other symptoms.

Key words: reverse sneezing, dog, respiratory distress, stridor

PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN OVÁRICA PARA INCREMENTAR LA CALIDAD DE LOS OVOCITOS BOVINOS OBTENIDOS POR OPU

Billón. M.¹; Sena Lopes. J.¹; Aguilar. H.²; Ruiz S^{1*}.

***Autor para correspondencia:** Salvador Ruiz López. E-mail: sruiz@um.es. Dirección: Dpto. Fisiología. Facultad de Veterinaria. Complejo Espinardo. 30100. Universidad de Murcia. España. Tel: 868 884 790

1 Dpto. Fisiología. Facultad de Veterinaria. Complejo Espinardo. 30100. Universidad de Murcia. España.

2 Escuela de Ingeniería Agronómica Zootecnista. Centro Universitario Temascaltepec. Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM). México.

RESUMEN

La punción folicular mediante ecografía transvaginal (OPU) permite la obtención de ovocitos procedentes de hembras vivas y con información genética conocida, para su posterior uso en producción *in vitro* de embriones (PIV) y en otras biotecnologías reproductivas. En este trabajo se ha ensayado un protocolo de estimulación hormonal para incrementar la calidad de los ovocitos bovinos obtenidos por OPU.

Se emplearon dos vacas de raza Holstein de la Granja Docente Veterinaria de la Universidad de Murcia. Los animales donantes se sometieron a un tratamiento de estimulación hormonal mediante GnRH (Dalmarelin. 0.2 mg, 2 ml i.m.) y FSH (Pluset. 500 UI). La administración de FSH se dividió en varias aplicaciones, con la siguiente distribución: 36 h post-GnRH, se administraron 3,5 ml (i.m.) y 4 ml (s.c.) y 24 h más tarde, 2,5 ml (i.m.). La OPU se realizó 40 h después de la última administración de FSH. El proceso fue repetido durante 4 semanas consecutivas.

El protocolo de OPU precisó de tranquilización previa mediante xilacina (0.25 ml/100 kg p.v. i.m.), seguida de carprofeno (1.4 mg/kg p.v. s.c.) y de lidocaína (2%. 5 ml) vía epidural. Posteriormente, se procedió a la manipulación rectal para realizar la exploración ultrasonográfica. Se analizó el número de folículos a aspirar y el número de ovocitos obtenidos en cada animal por sesión de OPU, calculándose el porcentaje de eficacia en la recogida (ovocitos obtenidos/folículos aspirados). Los complejos cúmulo-ovocito (CCOs) obtenidos se evaluaron y clasificaron en función de las características morfológicas del citoplasma y células del cúmulo en 2 grupos: ovocitos aptos para PIV (tipos I, II y III) y no aptos (tipos IV, V y ovocitos degenerados).

Se obtuvieron 37 ovocitos de los 70 folículos totales aspirados, lo que supone un 52,86% de rendimiento de OPU, cifra en consonancia con la literatura científica. La mayoría de los ovocitos obtenidos (86,49%) fueron aptos para PIV. Los grupos de CCOs más numerosos fueron de categoría II (35,14%), categoría I (29,73%) y

categoría III (21,62%). Estos resultados mejoran notablemente los obtenidos por otros autores que realizaron OPU a las 48 h de la administración de FSH y con una única aplicación hormonal. Se puede concluir que el protocolo de estimulación hormonal seguido permite obtener una alta proporción de ovocitos de mejor calidad y aptos para la PIV, y que el rendimiento de la OPU no resultó afectado por la obtención de los ovocitos a las 40 h de la última administración de FSH.

Palabras clave: FSH, ovocito, bovinos, OPU

ABSTRACT

Follicular puncture using transvaginal ultrasound (*ovum* pick up, OPU) allows obtaining oocytes from live females with known genetic information, for later use in *in vitro* production of embryos (IVP) and in other reproductive biotechnologies. In this work a protocol of hormonal stimulation has been tested to increase the quality of bovine oocytes obtained by OPU.

Two Holstein cows were used from the Veterinary Teaching Farm of the University of Murcia. The donor animals were subjected to a hormonal stimulation treatment using GnRH (Dalmarelin, 0.2 mg, 2 ml i.m.) and FSH (Pluset, 500 IU). The administration of FSH was divided into several applications, with the following distribution: 36 h post-GnRH, 3.5 ml (i.m.) and 4 ml (s.c.) were administered and 24 h later, 2.5 ml (i.m.). The OPU was performed 40 h after the last administration of FSH. The process was repeated for 4 consecutive weeks.

OPU protocol required prior tranquilization with xylazine (0.25 ml / 100 kg p.v. i.m.), followed by carprofen (1.4 mg / kg p.v. s.c.) and lidocaine (2% . 5 ml) epidurally. Subsequently, rectal manipulation was performed to perform the ultrasound scanning. The number of follicles to be aspirated and the number of oocytes obtained in each animal per OPU session were analyzed, calculating the percentage of efficiency in the collection (oocytes obtained/follicles aspirated). The cumulus-oocyte complexes (COCs) obtained were evaluated and classified according to the morphological characteristics of the cytoplasm and cumulus cells in 2 groups: oocytes suitable for IVP (types I, II and III) and unsuitable (types IV, V and degenerated oocytes).

We obtained 37 oocytes from the 70 total follicles aspirated, representing a 52.86% OPU yield, results consistent with the scientific literature. The majority of the oocytes obtained (86.49%) were suitable for IVP. The most numerous groups of COCs were category II (35.14%), category I (29.73%) and category III (21.62%). These results significantly improve those obtained by other authors who performed OPU at 48 h after the administration of FSH and with a single hormonal application.

We can concluded that the hormonal stimulation protocol followed allows a high proportion of oocytes of better quality and suitable for IVP and OPU performance was not affected by obtaining the oocytes 40 h after the last administration of the FSH dose.

Key words: FSH, oocyte, bovine, OPU

VALORACIÓN DE LESIONES DE OSTEOCONDROSIS CARPOMETACARPIANA Y SU PREVALENCIA EN BOVINO DE CEBO

Cortes, C.; Sánchez, P.; Seva J.*

***Autor para correspondencia:** Juan Seva. jseva@um.es. Anatomía Patológica Veterinaria. Universidad de Murcia. Tel: +93868884701

RESUMEN

La osteocondrosis es un proceso degenerativo de las superficies articulares que afecta al cartílago de crecimiento y altera la osificación endocondral. Con el presente trabajo, se pretende valorar macroscópicamente y microscópicamente las lesiones de osteocondrosis en la articulación carpometacarpiana en el bovino de aptitud cárnica, determinar su prevalencia y qué factores influyen en ella.

Para este trabajo se han estudiado 200 animales de la raza bovina (*Bos taurus*), 100 hembras y 100 machos, con orientación productiva de carne, y pertenecientes principalmente a las razas Asturiana de los Valles, Limousin y Mestiza. De cada uno de los animales se han evaluado las lesiones en ambas extremidades: macroscópicamente procediendo a la valoración morfológica de las lesiones in situ y la medición del área de cartílago lesionada mediante el sistema de análisis de imagen MIP-4.5 para versión Windows®; y microscópicamente a través del examen histológico de las muestras tomadas en formol de las lesiones observadas. Se realizó el estudio descriptivo de los resultados obtenidos y se emplearon pruebas de inferencia estadística para evaluar la influencia de variables como sexo o raza sobre el grado de lesión y determinar la relación entre esta y el peso y edad de los animales, con ayuda del programa SPSS, v.24®, considerando un nivel de significación $p < 0.05$.

193 animales (96,5%) presentaron lesión en la superficie articular metacarpiana, manifestándose únicamente en la cara medial y siempre bilateralmente. Las lesiones se clasificaron en grado I (hasta un 2% de área lesionada en la cara articular), II (2-3,5%) y III (>3,5%), que fue el más predominante (62%). Histológicamente se evidenció la degeneración del cartílago articular, siendo mayor al aumentar el grado de lesión y la profundidad de la misma, afectando en los procesos más avanzados incluso al tejido óseo. Estadísticamente se observó asociación entre el grado de lesión de osteocondrosis, la raza y el sexo de los animales. Asimismo, se comprobó una ligera disminución de la ganancia promedio de peso diaria en los bovinos con grado III respecto a los grado I, obteniendo una correlación negativa mayor en los machos de la raza Asturiana. En vista a esto, el predominante carácter culón podría ser uno de los factores contribuyentes al desarrollo de la osteocondrosis en dicha raza, aunque serían necesarios nuevos estudios para corroborar estas observaciones.

Palabras clave: osteocondrosis, articulación carpometacarpiana, bovino.

ABSTRACT

Osteochondrosis belongs to Developmental orthopedic diseases and it has been defined as an idiopathic condition characterized by a disruption in endochondral ossification which affects the cartilage growth. It causes thickening and retention of cartilage, necrosis of the basal layers of the retained articular cartilage, subchondral bone defects and subchondral fracture and production of bone fragments, leading to biomechanical defects. This disorder is regarded as having a multifactorial etiology, with no single factor accounting for all aspects of the disease.

It is a pathology hardly bibliographic references in cattle, unlike other species, in which there is no clinical presentation and requires a post-mortem diagnosis, and can manifest in any diarthrodial joint. Particularly in bovine it has been evidenced in the atlanto-occipital joint, shoulder, elbow, carpometacarpal, knee, tarsometacarpal and phalangeal. Through this research we intend to evaluate macroscopically and microscopically the osteochondrosis lesions in the carpometacarpal joint in beef cattle, determine its prevalence and the factors that influence it.

For this survey, 200 animals of beef-breed cattle were studied, 100 females and 100 males, mostly belonging to the breeds "Asturiana de los Valles", Limousin and cross-bred. For each individual animal, the forelimb lesions have been evaluated: proceeding to the morphological assessment of the lesions in situ and the measurement of the injured cartilage area through the programme MIP-4.5 image analysis system for Windows version; and performing the histopathological examination of the samples preserved in formalin which were taken of injured areas. Conversely, a descriptive study was made of the results obtained and statistical inference tests were used to evaluate the influence of variables such as sex or breed on the degree of injury, and determine the relation between the degree with the weight and age of the animals. For that purpose, we used the programme SPSS v.24 considering a level of significance $p < 0.05$.

The macroscopic results reflect articular cartilage damage in 193 animals (96,5%), exclusively appearing on the medial aspect of the joint and always bilaterally. Lesions were classified in three grades, according to the results of image analysis system and macroscopic exam: I (until a 2% of injured area on the articular surface), II (between a 2-3,5%) and III (as of a 3,5%), which was the most prevalent. In addition, 72,50% of animals showed the same grade in both limbs, so the pathology exhibits a symmetrical component most of the times.

Histopathological examination exhibited a degeneration and loss of the articular cartilage. The disorders were greater as the lesions grade and depth increases, affecting even bone tissue in the most advanced processes.

Besides that, statistically significant differences were found in the distribution of grades of lesion according to breed and sex, but there was interaction between both factors. Likewise, a decrease in the means of average gain of daily weight was verified in cattle with lesions of grade III regard to those of grade I. After that, the average daily gain was related to the percentage of lesion, establishing a significant negative correlation (Pearson's $r = -0.818$) in the case of Asturian male bovines.

Unlike previous researches developed by other authors, in our study osteochondrosis lesions have been classified based on a ponderable parameter: the percentage of lesioned area regarding to the total area of the joint face, through an image analysis system. Histological study reveals that the severity of lesions depends on the depth and the length of the same, so it's difficult to establish between these histological changes and the grades of lesion observed macroscopically. The impartiality of the methodology used for this survey and the variety of the cattle feedlots strengthen our results about high prevalence of grade III in beef cattle with osteochondrosis. However, these animals come from different farms, which mean they are subjected to different feeding and handling conditions. Consequently, it's complicated to draw conclusions about the influence of the factors studied on the lesion's grade, although it seems that there's more reliance on genetic factors, such as breed and sex, than from others like age, carcass weight or joint's diameter, within the slaughter age ranges in beef cattle.

Animals of "Asturiana" breed, in particular male bovines, revealed a greater negative correlation between the osteochondrosis and the average daily gain, which may be related with the characteristic "culón" character of this breed. In any case, recent studies in pigs show that the osteochondrosis implies a decrease in economic profitability, so we should go in depth in the study of the possible economic repercussions of the osteochondrosis' development in beef cattle. En los anteriores números se ha incluido el abstract tal cual aparecía en el TFG/TFM, pero los autores pueden hacer los cambios que estimen oportunos.

Key words: osteochondrosis, carpometacarpal joint, bovine.

DIAGNÓSTICO POR IMAGEN DE OBSTRUCCIONES DEL TRACTO GASTROINTESTINAL OCASIONADAS POR ENTERITIS GRANULOMATOSA REGIONAL: A PROPÓSITO DE DOS CASOS CLÍNICOS

Díaz M.; Agut, A.; Soler, M.

***Autor para correspondencia:** mtasoler@um.es. . Universidad de Murcia. Murcia 30100. España.
Tel: 868887542

RESUMEN

Este trabajo versa sobre dos casos clínicos de una perra y un perro cuyo motivo de consulta fue la presentación de vómitos. En un caso, la exploración física no aportó mucha información adicional, mientras que en otro caso se evidenció la presencia de una masa abdominal a la palpación. Sus analíticas sanguíneas no mostraron ninguna alteración muy significativa que explicase el cuadro clínico que mostraban los pacientes.

Se les realizó radiografías abdominales, pero dada la emaciación que presentaban, no se pudo visualizar ninguna alteración radiográfica evidente.

En el examen ecográfico abdominal, se evidenció en ambos pacientes un segmento de intestino delgado con un engrosamiento de la capa muscular, de la cual se originaba una masa de ecogenidad y ecotextura heterogénea con pérdida de diferenciación de capas, que ocasionaba una obstrucción de la luz intestinal.

En uno de los casos, se realizó una tomografía computarizada de abdomen donde se pudo observar que la masa no tenía relación con el resto de órganos abdominales.

El diagnóstico presuntivo en los dos casos, basándose en los hallazgos de imagen, fue de una neoplasia intestinal.

Ambos animales se sometieron a la resección quirúrgica de las masas. El resultado histopatológico de las muestras enviadas procedentes de las masas concluyó que, tanto en el macho como en la hembra, las masas eran resultado de una enteritis granulomatosa.

La etiología de la enteritis granulomatosa regional es todavía incierta. Se ha asociado a la presencia de materiales extraños, como fragmentos de plantas o tejidos parecidos a pelo que debido a su estructura y a los movimientos peristálticos del intestino se quedan alojados en la pared intestinal (Papazoglou et al. 2010), o la presencia de agentes vivos como *E. Coli* enteroinvasiva, *Mycobacterium spp.*, hongos (*Pythium*, histoplasma) o *Prototheca* (Lecoindre et al. 2016). También se ha asociado como una complicación tras una ovariohisterectomía (Agut et al. 2003).

Los pacientes presentan principalmente vómitos (Watson et al. 2014), aunque cabe destacar que en otro estudio realizado con un mayor número de animales el síntoma principal fue la diarrea (Lecoindre et al. 2016).

Analíticamente, se suelen apreciar pocas alteraciones a pesar de la cronicidad de la patología, aunque se puede destacar la aparición de ligera neutrofilia compatible con leucograma de estrés o ligera inflamación o hypoalbuminemia.

El empleo de un estudio radiológico puede aportar información limitada al ayudar a visualizar la presencia de una masa en la cavidad abdominal y también es útil para descartar la presencia de metástasis en tórax y así poder diferenciar mejor entre un proceso neoplásico de un proceso inflamatorio.

Ecográficamente, se visualiza en la mayoría de los casos una masa heterogénea hipocogénica con aumento del grosor de la capa muscular y pérdida total o parcial de diferenciación de capas de la pared intestinal (Papazoglou et al. 2010, Jeon et al. 2014, Lecoindre et al. 2016), aunque en algunos casos no se llega a perder la estructura de las capas de la pared del segmento intestinal afectado (Watson et al. 2014).

Para su diagnóstico, es necesario la realización de un estudio histopatológico, ya que no es posible diferenciarla de otros procesos, como por ejemplo un proceso neoplásico, con los medios de diagnóstico por imagen actuales.

Se ha observado una similitud entre la enteritis granulomatosa regional y la enfermedad de Crohn en humanos. La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria intestinal de etiología multifactorial incluyendo la combinación de factores genéticos y ambientales. En ambas enfermedades, se da la presentación de una inflamación granulomatosa transmural como rasgo principal (Watson et al. 2014).

En todos los casos descritos en la literatura consultada, se realizó una resección quirúrgica de la masa y anastomosis del intestino. En aproximadamente la mitad de ellos, la cirugía resultó en una remisión completa sin tratamiento adicional, aunque en otros casos, solamente hubo una remisión parcial de los signos clínicos y hubo que administrar tratamiento con dieta gastrointestinal, agentes inmunosupresores y antibioterapia para poder controlar los signos clínicos.

La enteritis granulomatosa regional es poco frecuente, pero podría presentar una mayor frecuencia de aparición de lo que podemos pensar al no estar incluida como diagnóstico diferencial frente a procesos neoplásicos y no llegar a ser diagnosticada.

Por estas razones, la enteritis granulomatosa regional debe ser incluida en el diagnóstico diferencial de una masa intestinal.

Palabras clave: Enteritis granulomatosa, obstrucción intestinal, perro, diagnóstico por imagen.

ABSTRACT

This work is about two clinical cases of two dogs, a neutered female and an entire male, that presented a history of vomiting and weight loss. In one case, the physical examination did not contribute very additional information, while in the other an abdominal mass was noticed by palpation. Their haematology and biochemistry did not show very significant disorders which could explain the clinical signs.

In the abdominal radiographs, it was not possible to visualize any remarkable findings because the emaciated animals had poor serosal detail because of lack of intraabdominal fat.

Abdominal ultrasonography revealed in both patients a small bowel segment with a focal thickening of the muscular layer, from which a heterogeneous and hypoechoic mass with indistinct wall layers originated, which caused intestinal obstruction.

In the female dog, an abdominal computed tomography scan (CT) was performed which showed that the abdominal mass was not associated with adjacent abdominal organs.

The presumptive diagnosis in the two cases, based on the imaging findings, was an intestinal neoplasia.

Mass removal and intestinal anastomosis were performed in both animals. Histopathological result of the samples concluded that the masses were caused by a granulomatous enteritis, both in the male and the female.

Granulomatous enteritis in the dog is a rare form of canine intestinal bowel disease (IBD) of uncertain aetiology. It has been associated with the presence of foreign materials, such as plant fragments or hair-like shaft, combined with the peristaltic movement of the intestines, that may help the foreign body to lodge itself in the intestinal wall (Papazoglou et al. 2010), or the presence of alive agents as enteroinvasive E. Coli, Myco-

bacterium spp, fungi or Prototheca (Lecoindre et al. 2016). It has also been associated as ovariohysterectomy complication (Agut et al. 2003).

The patients show mainly vomiting (Watson et al. 2014), although in another study with a greater number of animals the main clinical sign was diarrhoea (Lecoindre et al. 2016).

Analytically, few features are usually showed despite the chronicity of the pathology, although it can be seen a mild neutrophilia consistent with stress leukogram or mild inflammation or hypoalbuminaemia.

The use of a radiological study can provide limited information to help visualize the presence of a mass in the abdominal cavity. Even so, the use of radiography to rule out the presence of chest metastasis is of great help to be able to better differentiate between a neoplasm process of an inflammatory process.

Ultrasonographically, a heterogeneous hypoechoic mass with thickening of the muscular layer and total or partial loss of layering of intestinal wall is seen in most cases (Papazoglou et al., 2010, Jeon et al., 2014, Lecoindre et al. al., 2016), although in some cases the structure of the wall layers of the affected intestinal segment is not lost (Watson et al., 2014).

For its diagnosis, it is necessary to perform a histopathological study, since it is not possible differentiate it currently of the other processes, for example a neoplasm, by diagnostic imaging in spite of the multiple modalities.

In humans it has been observed a similarity between regional granulomatous enteritis and Crohn's disease. Crohn's disease is a inflammatory bowel disease of multifactorial aetiology including the combination of genetic and environmental factors.

In both diseases, the presentation of a transmural granulomatous inflammation is the main feature (Watson et al. 2014).

In all the cases described in the reported literature, a surgical resection of the intestine mass and intestinal anastomosis was performed. In approximately half of them, the surgery resulted in a complete remission without additional treatment, although in other cases, there was only a partial remission of the clinical signs and it was necessary to administer treatment with gastrointestinal diet, immunosuppressive agents and antibiotic therapy to be able to control the signs clinical.

Regional granulomatous enteritis is rare, but it could be present in a greater percentage of appearance than we can think since it is not included as a differential diagnosis in the face of neoplasm processes and it usually does not get diagnosed. Therefore, it should be included in the differential diagnosis of intestinal masses in dogs.

Key words: Granulomatous enteritis, intestinal obstruction, dog, imaging diagnostic

ESTUDIO DE LAS PATOLOGÍAS EN EL DESVIEJE DEL GANADO CAPRINO LECHERO

Jover, M.T.;* Gómez, M.A.; Seva, J.; Bernabé, A.

***Autor para correspondencia:** Nombre: María Teresa Jover Martínez. Email: maitejm2@outlook.com
Dirección: C/Las Lomas, nº9. Elda (Alicante). Teléfono: 656358690

RESUMEN

El presente trabajo está basado en la identificación de patologías encontradas en el desvieje de cabras adultas lecheras. Para ello, se ha realizado un estudio de 20 cabras mayores de 2 años de raza Murciano-granadina durante el mes de noviembre de 2017. Los animales proceden de una explotación murciana intensiva de carácter lechero con destino a la producción quesera y calificación sanitaria M4 (oficialmente indemnes a brucelosis). Gracias a la realización de necropsias regladas, se tomaron muestras que fueron procesadas y teñidas, para finalmente realizar su estudio histopatológico. Los resultados obtenidos dieron un total de 6 patologías generales; encontrándose las mamarias encabezando la lista con un 28,12% de prevalencia, seguidas por pulmonares con un 25,00% e intestinales con un 21,87%. Dentro de estas han destacado mamitis, pleurobronconeumonías y enteritis paratuberculosas. Las patologías restantes se han dado en menor porcentaje, quedando las hepáticas con un 9,37%, reproductoras con un 9,37% y parasitarias con un 6,25%. En general, todas ellas han comparido un alto grado de cronicidad, con alta presentación de necrosis, aumento de tejido conectivo, acúmulo de células mononucleares (linfocitos y macrófagos) y afectación de nódulos linfáticos adyacentes.

La información obtenida mediante la realización de este trabajo puede ser de gran utilidad para conocer las principales causas de desvieje en caprino lechero, haciendo ver tanto a veterinarios como a ganaderos la importancia de prevenir y tratar estas patologías, ya que aunque no causen una mortalidad directa, producen enfermedades crónicas y subclínicas que repercuten significativamente en el rendimiento y la producción láctea, pudiendo llegar a causar graves pérdidas económicas.

Palabras clave: desvieje, caprino adulto, mamitis, pulmón, hígado, paratuberculosis, anatomía patológica, estudio histopatológico, cabras lecheras, patología veterinaria.

ABSTRACT

The present work is based on the identification of pathologies found in the slaughter of adult milk goats. To this end, a study about 20 goats older than 2 years of the Murciano-granadina race was carried out during the month of November 2017. The animals come from an intensive Murcian farm of dairy character for cheese pro-

duction and a qualification M4 (officially unharmed to brucellosis). Thanks to the performance of the regulated necropsies, samples were taken that were processed and stained, in order to finally perform histopathological study. The results were a total of 6 general pathologies; finding the mammary, leading the list with a 28.12% prevalence, followed by pulmonary with 25.00% and by intestinal with 21.87%. Within these ones, mastitis, pleurobronconeumonias and enteritis paratuberculous have stood out. The remaining pathologies have occurred in a lower percentage, leaving the hepatic with 9.37%, the reproductive with 9.37% and the parasitic with 6.25%. In general, all of them have shared a high degree of chronicity, with a high presentation of necrosis, an increase of connective tissue, an accumulation of mononuclear cells (lymphocytes and macrophages) and an involvement of adjacent lymph nodes.

The information obtained through the development of this work can be very useful to know the main causes of slaughter of dairy goats, making both veterinarians and farmers see the importance of preventing and treating these pathologies, because although they do not cause a direct mortality, they produce chronic and subclinical diseases that have a significant impact on efficiency and milk production, causing some serious economic losses.

Key words: animals slaughter, adult goat, mastitis, lung, liver, paratuberculosis, pathological anatomy, histopathological study, dairy goats, veterinary pathologies, milk production.

ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE LAVADOS TRAQUEALES: ESTUDIO RETROSPECTIVO EN 17 PERROS Y 5 GATOS

Perich Miralles, P.S.; Fernández del Palacio, M.J.; Talavera J*

***Autor para correspondencia:** Jesús Talavera. Email: talavera@um.es. Universidad de Murcia. Murcia 30100. España.

RESUMEN

La infección de las vías aéreas es una de las múltiples causas de la tos crónica en pequeños animales. Cuando se sospecha de infección de las vías bajas se recomienda la toma de muestras para la confirmación de la infección, la identificación del patógeno y el establecimiento de un tratamiento antibiótico basado en los resultados del antibiograma. Cuando estos procedimientos no son posibles, se administra un tratamiento empírico basado en las guías terapéuticas disponibles. Las recomendaciones antimicrobianas de estas guías están basadas en los patógenos que se espera estén causando la infección, apoyándose en los resultados de estudios previos. La mayoría de estos estudios son realizados en el extranjero y, por lo tanto, sus resultados pueden no reflejar los patógenos que afectan a la población local de pequeños animales ni su sensibilidad a antibióticos.

Se realiza un estudio retrospectivo sobre una población de 17 perros y 5 gatos con tos crónica sometidos a lavados traqueales en una clínica veterinaria de Elche, Alicante en el periodo entre mayo de 2016 y mayo de 2018. Se analiza los resultados de los cultivos microbiológicos y antibiogramas con el objetivo de determinar las especies bacterianas más comúnmente aisladas en poblaciones locales y la eficacia de los antibióticos más recomendados en ellas; y establecer las mejores opciones antimicrobianas para nuestra población.

A pesar de que la mayoría de los cultivos (77,27%) obtuvieron crecimiento, una baja proporción de ellos (23,5% en perros y 25% en gatos) fueron compatibles con infección. Las bacterias más aisladas fueron *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus pseudintermedius*. Las especies consideradas patógenas en este estudio fueron: *Pseudomonas aeruginosa* en perros y gatos y *Enterobacter cloacae* y *E. coli* en los perros. En general, los antibióticos más recomendados por las guías terapéuticas (doxiciclina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefalexina) hubieran sido poco eficaces en los aislamientos obtenidos en este estudio. Basándonos en los resultados de los antibiogramas, podrían ser buenas opciones terapéuticas la enrofloxacina, la marbofloxacina, la ciprofloxacina, la pradofloxacina y la gentamicina en perros y; la gentamicina, la tobramicina y la amikacina en gatos con tos crónica. Se recomienda el desarrollo de estudios prospectivos más amplios en poblaciones locales de perros y gatos que aporten información más específica sobre las infecciones bacterianas y la eficacia de los antibióticos.

Palabras clave: lavado traqueobronquial, tos, perro, gato, infección

ABSTRACT

The infection of the airways is one of the multiple causes of chronic cough in small animals. When low-level infection is suspected, it is recommended to take samples for confirmation of the infection, identification of the pathogen and establishment of an antibiotic treatment based on the results of the antibiogram. When these procedures are not possible, an empirical treatment is administered based on the available therapeutic guidelines. The antimicrobial recommendations of these guidelines are based on the pathogens that are expected to be causing the infection, based on the results of previous studies. Most of these studies are conducted abroad and, therefore, their results may not reflect the pathogens that affect the local population of small animals or their sensitivity to antibiotics.

A retrospective study was conducted on a population of 17 dogs and 5 cats with chronic cough subjected to tracheal washings in a veterinary clinic in Elche, Alicante between May 2016 and May 2018. The results of the microbiological cultures are analyzed. antibiograms with the objective of determining the bacterial species most commonly isolated in local populations and the efficacy of the most recommended antibiotics in them; and establish the best antimicrobial options for our population.

Despite the fact that most cultures (77.27%) obtained growth, a low proportion of them (23.5% in dogs and 25% in cats) were compatible with infection. The most isolated bacteria were *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus pseudintermedius*. The species considered pathogenic in this study were: *Pseudomonas aeruginosa* in dogs and cats and *Enterobacter cloacae* and *E. coli* in dogs. In general, the antibiotics most recommended by the therapeutic guidelines (doxycycline, amoxicillin / clavulanic acid, cephalexin) would have been ineffective in the isolates obtained in this study. Based on the results of the antibiograms, enrofloxacin, marbofloxacin, ciprofloxacin, pradofloxacin and gentamicin in dogs could be good therapeutic options; gentamicin, tobramycin and amikacin in cats with chronic cough. The development of broader prospective studies in local populations of dogs and cats that provide more specific information on bacterial infections and the efficacy of antibiotics is recommended.

Palabras clave: tracheobronchial wash, cough, dog, cat, infection

REVISIÓN SISTEMÁTICA Y METAANÁLISIS DE LA BIBLIOGRAFÍA EN RELACIÓN A LA PARASITACIÓN POR LARVAS DE ANISÁKIDOS EN EL MAR MEDITERRÁNEO

Ruiz, M.; Muñoz-Hernández, C.; Ruiz de Ybáñez, M.R*.

***Autor para correspondencia:** María del Rocío Ruiz de Ybáñez Camero. Email: rocio@um.es. Universidad de Murcia. Murcia 30100. España. Tel: 868884719

RESUMEN

La anisakidosis es una enfermedad zoonótica ocasionada por el consumo de pescado y cefalópodos crudos o poco cocinados que están infectados con larvas L3 de la familia Anisakidae (*Anisakis* spp., *Contracaecum* spp y *Pseudoterranova* spp.). También hay que tener en cuenta a otros nematodos (*Hysterothylacium* spp.), que aunque no son patógenos para el ser humano, pueden afectar a la calidad del pescado destinado al consumo humano. El aumento de casos nuevos de anisakidosis a nivel mundial hace necesario el control de esta parasitosis en peces y cefalópodos. Este estudio busca determinar a través de la realización de una revisión sistemática con metaanálisis, la prevalencia, abundancia e intensidad de larvas de anisákidos de los géneros *Anisakis*, *Hysterothylacium*, *Contracaecum* y *Pseudoterranova* en peces, cefalópodos, tortugas y mamíferos marinos capturados en el mar Mediterráneo. Para ello, se realizó una búsqueda en la plataforma Web of Science (WOS) con la siguiente combinación de palabras clave: “(ANISAK* or HYSTERTHYLACIUM or PSEUDOTERRANOVA or CONTRACAECUM) and (PREVALENCE or ABUNDANCE or INTENSITY or RISK FACTORS) and MEDITERRANEAN”. Inicialmente se obtuvieron 161 artículos, aunque tras un proceso de selección únicamente 68 fueron incluidos en el metaanálisis. La mayoría de los estudios analizó la infección por anisákidos en peces (n=62), seguida de cefalópodos (n=7), tortugas (n=3) y delfines (n=1). Las dos especies más estudiadas fueron el boquerón (*Engraulis encrasicolus*) y la sardina (*Sardina pilchardus*). Las prevalencias medias (rango) de anisákidos más altas se encontraron en tortugas y delfines con 47% (4-100) y 39,5% (27-52), respectivamente, mientras que peces y cefalópodos registraron prevalencias de 38% (0-100) y 14% (0-60) cada uno. Las especies más parasitadas fueron el jurel (*Trachurus trachurus*) y la bacaladilla (*Micromesistius pou-tassou*). La mayoría de los estudios utilizó el estereomicroscopio para el análisis de las muestras (n=49). Con el paso de los años se ha detectado un aumento en los niveles de parasitación por anisákidos en los especímenes capturados en el mar Mediterráneo, con mayor riesgo de transmisión de anisakidosis por el consumo de peces capturados en la zona central de dicho mar. Asimismo, se observaron las cifras de parasitación más altas en las muestras de vísceras, y se confirmó que *Anisakis pegreffii* es la principal especie causante de anisakidosis en el área Mediterránea, así como la ausencia de especies del género *Pseudoterranova* en la citada área. Estos datos

demuestran el importante papel de los peces procedentes del área Mediterránea como fuente de infección de anisakidosis en humanos, así como el riesgo derivado del consumo de cefalópodos, hasta ahora infravalorado, haciéndose necesaria una mayor investigación en estas especies.

Palabras clave: Anisákidos, Mediterráneo, prevalencia, abundancia, intensidad, factores de riesgo.

ABSTRACT

Anisakidosis is a zoonotic disease in humans caused by the consumption of raw or undercooked fish or cephalopods infected with the L3 larva of the Anisakidae family (*Anisakis* spp., *Contracaecum* spp. and *Pseudoterranova* spp.). The genus *Hysterothylacium*, belonging to the Raphidsacaridae family, is not considered pathogenic for humans, although its presence affects the quality of fish products. The worldwide increase of new cases of anisakidosis makes essential the continuous monitoring of the parasitization in fish and cephalopods. The aim of this study is to know the prevalence, abundance and intensity of anisakid larva belonging to the genera *Anisakis*, *Hysterothylacium*, *Contracaecum* and *Pseudoterranova* in fishes, cephalopods, turtles and marine mammals captured in the Mediterranean Sea. For this purpose, a systematic review with meta-analysis was conducted using the Web of Science (WOS) platform with the following key words combination: “(ANISAK* or HYSTEROTHYLACIUM or PSEUDOTERRANOVA or CONTRACAECUM) and (PREVALENCE or ABUNDANCE or INTENSITY or RISK FACTORS) and MEDITERRANEAN”. Of a total of 161 articles initially recovered, the implementation of several criteria reduced to 68 the articles finally analyzed. Most scientific articles studied the anisakids infection in fishes (n=62), followed by cephalopods (n=7), turtles (n=3) and dolphins (n=1). The most analyzed fish species were European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and sardine (*Sardina pilchardus*). The highest mean prevalences (range) were found in turtles and dolphins, with 47% (4-100) and 39.5% (27-52) respectively, followed by fishes with 38% (0-100) and cephalopods with 14% (0-60). The horse mackerel (*Trachurus trachurus*) and the blue whiting (*Micromesistius poutassou*) were the most parasitized fish species. The stereomicroscope was the technique used by most studies for the analysis of the samples (n=49). An increase in the parasitic level by anisakids has been detected over the years in the Mediterranean Sea specimens, with the higher risk of anisakidosis due to the consumption of fish caught in the central Mediterranean area. Likewise, the highest parasitization figures were observed in the viscera samples, and *Anisakis pegreffii* was confirmed as the main origin of anisakidosis in the Mediterranean area. On the other hand, it is outstanding the absence of the *Pseudoterranova* genus in this area. Our results highlight the role of fishes caught in the Mediterranean Sea as a source of anisakid infection for humans, as well as the main role of consumption of cephalopods, until now undervalued, showing the need of further research in these species.

Key words: Anisakid, Mediterranean, prevalence, abundance, intensity, risk factor.

BOLETÍN DE SUSCRIPCIÓN COMPRA O INTERCAMBIO
(SUBSCRIPTION ORDER)

ENVIAR A (SEND TO):

Servicio de Publicaciones

Universidad de Murcia

Apdo. 4021 - 30080 Murcia (España)

Telf.: (968) 36 30 12 / (internacional: + 34 68 363012)

Fax nº: (968) 363414 (Foreing countries: -internacional code + 34 68 363414)

**ANALES DE
VETERINARIA**

I.S.S.N.: 0213-5434

1. Por favor, *suscríbame* a *Anales de Veterinaria*, desde el año....., nº....., inclusive.
2. Por favor, deseo adquirir los volúmenes o números *atrasados*:.....
3. Deseamos obtener *Anales de Veterinaria*, por *intercambio* con la revista:
-
cuyos datos (temática, dirección postal, etc.) se adjuntan.

FORMAS DE PAGO

- Pago mediante recibo. Una vez recibido el Boletín de suscripción o compra, le enviaremos un recibo, que deberá hacer efectivo para que podamos proceder al envío de los ejemplares correspondientes.

PAÍSES MIEMBROS DE C.E.E.: Sólo cheque nominativo. Importe en EUROS.

RESTOS PAÍSES: Sólo cheque nominativo. Importe en DOLLARS U.S.A.

PRECIOS DE SUSCRIPCIÓN

Suscripción anual: un volumen / Annual suscription rates, for a year volumen:

Suscriptions normal: 9,02 euros (foreing countries: 18 U.S. \$);

Número atrasado (number delayed): 9,02 euros (18 U.S. \$).

Gastos de envío:

Nacionales, 1,80 euros; Extranjeros, 2,40 euros.

DATOS PERSONALES

Nombre y apellidos o razón social:.....

N.I.F. o C.I.FCalle/Plaza

C.P.:..... Ciudad:.....Provincia:

País:..... Tfs.:..... Fax:



Anales de Veterinaria de Murcia

Normas de publicación

(www.um.es/analesvet)

Anales de Veterinaria de Murcia (AVM) es una revista científica, con evaluación externa por pares, que publica artículos de investigación originales e inéditos dentro del campo de las Ciencias Veterinarias. Además, publica reseñas de libros, así como revisiones de temas científicos, experimentales, clínicos, o tecnológicos relevantes y de actualidad, a invitación del Comité Editorial.

Envío y aceptación de publicación de los manuscritos

Los trabajos en formato WORD se enviarán a la revista a través de aplicación informática disponible en la página de la revista <http://revistas.um.es/analesvet>. Los autores asumen el compromiso de que los trabajos enviados son originales y que no se ha remitido a otra revista ni han sido publicados con antelación.

AVM prevé que los trabajos se evalúen en el plazo de un mes tras su recepción. Tras la evaluación, AVM se pondrá en contacto con el autor de correspondencia para comunicarle la decisión del Comité Editorial sobre la publicación del trabajo, en función de los comentarios de los evaluadores, y en su caso le hará llegar los informes elaborados por los mismos. Los trabajos que vayan a ser publicados y precisen revisión, dispondrán de un plazo para volver a enviar la versión corregida a la revista, empleando de nuevo la aplicación informática. Una vez que el Comité Editorial reciba y evalúe la adecuación de los cambios realizados, se pondrá en contacto con el autor de correspondencia para comunicarle la decisión final de publicación del artículo.

Preparación de los manuscritos

Idioma y longitud

Los artículos tendrán una extensión máxima de 25 páginas o 10.000 palabras y se redactarán en

castellano o en inglés y deben incluir un resumen con extensión máxima de 350 palabras en ambos idiomas.

Formato

Los artículos irán estructurados en los siguientes apartados: título, título abreviado, autor(es), resumen en dos idiomas, palabras clave (máximo de seis), introducción, material y métodos, resultados, discusión, agradecimientos, bibliografía, tablas y figuras. Se podrán incluir *pies de página*, que irán redactados en la página correspondiente e irán numerados consecutivamente.

El artículo se presentará escrito a doble espacio, con las páginas numeradas al igual que las filas que irán numeradas independientemente en cada página. En la primera página se incluirá el título en mayúsculas, el título abreviado, los autores, y el nombre teléfono, fax y correo electrónico del autor de correspondencia. **Se recomienda a los autores que antes de enviar su trabajo comprueben que el formato es idéntico al del artículo de ejemplo disponible en la aplicación informática.**

Unidades, nomenclatura y abreviaturas

Las unidades de medida se ajustarán al Sistema Internacional (SI), los nombres científicos de microorganismos y de especies zoológicas o botánicas deberán estar actualizados y escritos en cursiva, y siempre que aparezcan en el título y/o resumen habrá que incluirlos junto a su nombre común. En el resto del manuscrito, el nombre científico se incluirá la primera vez que se cite.

Las abreviaturas de términos biológicos, químicos o de cualquier otro ámbito científico sólo serán empleadas cuando sean internacionalmente reconocidas. El empleo de abreviaturas presupone la incorporación entre paréntesis del término al que sustituyen, la primera vez que se utilicen.

Tablas y figuras

Las tablas y cuadros se relacionarán en el texto como *tablas* y las *figuras, ilustraciones y gráficas* se mencionarán en el texto como *Figuras*, llevando numeración arábiga. Se podrán utilizar fotogra-

fías, diapositivas, o archivos en soporte informático para imágenes. Se admitirán imágenes tanto en blanco y negro como en color cuando sea estrictamente necesario para la correcta visualización de detalles concretos. En este caso la revista correrá con los gastos de las imágenes en color. Cada figura y tabla irá en una página independiente junto a su leyenda, al final del artículo.

Citas bibliográficas

Las referencias a otros trabajos en el texto incluirán el apellido del primer autor seguido de “y cols.” (y colaboradores) cuando haya tres o más autores o el de ambos autores cuando haya dos autores solamente, seguido del año de la publicación. Las citas en la *Bibliografía* incluirán solamente las obras escritas o en prensa citadas en el texto, relacionadas alfabéticamente según el apellido del primer autor. Las citas de un mismo autor se ordenarán cronológicamente, y las de un mismo año se distinguirán mediante letras (2010 a, 2010 b, etc.).

Ejemplos:

Artículos en revistas:

ÁLVAREZ V., ARRANZ J., DALTABUIT-TEST M., LEGINAGOIKOA I., JUSTE R.A., AMORENA B., DE ANDRÉS D., LUJÁN LL., BADIOLA J. J., BERRIATUA E. 2005a. Relative contribution of colostrum from Maedi-Visna virus (MVV) infected ewes to MVV-seroprevalence in lambs, *Res. Vet. Sci.* 78: 237-243.

Las abreviaciones se ajustarán al “Serial Sources for the Biosis Data Base” del “Biological Abstracts code”.

Capítulos de libros:

HOUWERS D.J. 1990. Economic importance, epidemiology and control. In: Petursson G., Hoff-Jorgensen R.,(Eds.), *Maedi-Visna and related diseases*. Kluwer Academic Press, Massachussets: 83-117.

Trabajos en congresos

GOYENA, E., BERRIATUA, E., MARTÍNEZ-CARRASCO, C., ALONSO, F., CASAIS, R., PRIETO, M., GARCÍA MARÍN, F., RUIZ DE YBAÑEZ, R., 2011. Dynamic of *Sarcoptes scabiei* infection and cutaneous hypersensitivity in swine mange endemic pig herds in southeast Spain. European Veterinary Parasitology College Annual Congress, Zagreb, Croacia. 16 y 17 de junio 2011.

Tesis de investigación:

DALTABUIT-TEST, M. 2005. Desarrollo y aplicación de técnicas de diagnóstico serológico y molecular para el estudio de la transmisión clostral y horizontal del virus maedi-visna (VMV) en ovino. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza.

Empleo de animales de experimentación y otros estudios *in vivo*

Los trabajos en los que se utilicen animales experimentales deberán haber sido autorizados y así se especificará en el manuscrito, por el “Comité de Ética y Bienestar Animal” u organismo equivalente de la Institución donde se haya realizado la experiencia, que garantice que el trabajo se ha realizado de acuerdo a la legislación vigente. En los estudios *in vivo* que impliquen experimentación con humanos, también será necesario hacer constar el consentimiento de los individuos sometidos a estudio.

Pruebas

El autor de referencia de cada trabajo recibirá antes de la publicación de su artículo, una *prueba de imprenta* paginada para su supervisión y aprobación definitiva. El plazo de devolución de la misma será inferior a dos semanas desde su recepción. Con el objeto de evitar retrasos en la publicación no se permitirá, en esta fase, la introducción de modificaciones importantes a la versión del manuscrito aceptada por el Comité Editorial.

ANALES DE VETERINARIA. VOL. 34 (2018)

I.S.S.N.: 0213-5434. Publicación anual

Precio de la suscripción 9,02 euros

ÍNDICE - CONTENTS

ARTÍCULOS ORIGINALES

<i>ALCÁZAR, E. et al.: Desafíos para la salud de las vacas durante el periodo de transición. Uso de monensina.....</i>	<i>7</i>
<i>LOZANO-PICAZO, C. et al.: Especies reactivas de oxígeno y su implicación en biomedicina</i>	<i>17</i>
<i>CANDEL-PÉREZ, C. et al.: Evaluación del efecto antimicrobiano de una mezcla de probióticos frente a Cronobacter sakazakii y Salmonella enterica en preparados reconstituidos para lactantes</i>	<i>27</i>
<i>ALONSO DE VEGA, F.D. et al.: Helmintos gastrointestinales en liebres (Lepus granatensis) del sureste de la península ibérica.....</i>	<i>39</i>
<i>PELLEGRINO, F.C.: Presunta parálisis periódica hipercalémica con miotonía en perros Shi-Tzú y Pastor Alemán</i>	<i>49</i>
RESÚMENES TRABAJOS FIN DE GRADO 2017-2018.....	67