

Tabla de contenidos

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Evaluación de un producto comercial en base a polisacáridos bacterianos propuesto como promotores de crecimiento en bovinos para carne

Mascaró, E.D.; Genero, G.A.; Gimenez, M.; Ferrán, A.M.; Castaldo, A.O.; Calvo, C. y Halac, J.M.....Pp. 2-10

ARTÍCULOS EXTENSIÓN

Tenencia Responsable de Mascotas y Enfermedades Zoonóticas en el Valle Medio

Sosa, R.A.; Torres; P.A.; Álvarez, M.A. y Chávez, E.J.....Pp. 11-15

ARTÍCULOS TÉCNICOS

Análisis histológico y expresión de receptores de estrógenos y progesterona en úteros y placentas porcinas durante la gestación temprana

Marrón Y.M.; Viglierchio M.C.; García M.; Williamson D.; Clazure M. y Vélez C.....Pp. 16-27

Modelo experimental para evaluar compuestos gastroprotectores en ratones sometidos a estrés y tratados con indometacina

Toso, F.; Ardoino, S.M.; Hartfiel, L.E. y Benitez, V.P.....Pp. 28-34

Aplicación de tecnologías en un rodeo de cría: inseminación artificial a tiempo fijo y destete precoz en la zona del caldenal

Tobal, C.F.; Ferrán, A. M.; Moralejo, R.¹; Peratta, D.; Halac, J.M.; Hecker F.; Lamela. P. y Sierro, M.....Pp. 35-41

SECCIÓN ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Evaluación de un producto comercial en base a polisacáridos bacterianos propuesto como promotores de crecimiento en bovinos para carne

Mascaró, E.D.; Genero, G.A.; Gimenez, M.; Ferrán, A.M.; Castaldo, A.O.; Calvo, C. y Halac, J.M.

Pp. 2-10

Evaluación de un producto comercial en base a polisacáridos bacterianos propuesto como promotores de crecimiento en bovinos para carne

Mascaró, E.D.¹; Genero, G.A.¹; Gimenez, M.¹; Ferrán, A.M.¹; Castaldo, A.O.¹; Calvo, C.¹ y Halac, J.M.¹

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa.
danimascaro@yahoo.com.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el uso de fragmentos de polisacáridos bacterianos en forma de un producto inyectable (MK471, Laboratorio Puebla SRL) en bovinos en crecimiento. Se utilizaron 40 vaquillonas, con un peso inicial de 260 kg, las que fueron divididas al azar en dos grupos: Control y Tratamiento. Las vaquillonas del grupo Tratamiento recibieron 10 ml del producto, al momento inicial, a los 21, 73 y 107 días. Los animales fueron individualizados con caravanas numeradas y pesados, en 5 oportunidades, a lo largo del ensayo para determinar la ganancia diaria de peso (GDP). Con la misma periodicidad, las vaquillonas fueron sangradas para evaluar variables hematológicas: número de glóbulos rojos (GR) y blancos (GB), y cantidad de proteínas plasmáticas totales. Los animales consumieron una pastura de alfalfa, con manejo rotativo, durante la totalidad del ensayo, que duró 170 días. El grupo Tratamiento fue estadísticamente superior en las variables GDP, concentración de proteínas plasmáticas totales y número de GR y GB en sangre. Se concluye que el producto MK471 tiene un efecto positivo como promotor de crecimiento en vaquillonas y demuestra una amplia relación beneficio/costo.

Palabras clave: Polisacáridos bacterianos, bovinos para carne, promotor de crecimiento.

Evaluation of a commercial product based on bacterial polysaccharide proposed as a growth promotor in beef cattle.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the use of bacterial polysaccharide fragments in the form of an injectable product (MK471, Puebla SRL) in growing cattle. 40 heifers, with an initial weight of 260 kg, were randomly divided into two groups: Control and

Treatment. The heifers in the Treatment group received 10 ml of the product, at the initial moment, at 21, 73 and 107 days. The animals were individualized with numbered caravans and weighed on 5 moments throughout the trial to determinate the weight daily gain (WDG). With the same periodicity, the heifers were bled to evaluate hematological variables: number of red (RBC) and white blood cells (WBC), and amount of total plasma proteins. The animals consumed an alfalfa pasture, with rotational management, during the entire trial, which lasted 170 days. The Treatment group was statistically superior in the variables WDG, concentration of total plasma proteins and number of RBC and WBC. It is concluded that the product MK471 has a positive effect as a growth promoter in heifers and shows a wide benefit/cost ratio.

Key words: bacterial polysaccharide, beef cattle, growth.

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de estrategias para mejorar la eficiencia de la producción global de los bovinos para carne ha dado lugar a diferentes líneas de investigación a nivel mundial (Terry et al., 2021). Los implantes con productos esteroides naturales (17- β estradiol) o sintéticos (zearalenona, acetato de trembolona) han sido utilizados en Estados Unidos durante más de 60 años (Smith y Johnson, 2020), pero enfrentan restricciones crecientes en importantes mercados internacionales, como la Unión Europea. La Resolución No 447/2004, de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación ha prohibido la utilización de anabólicos esteroides en la producción de carne bovina. El uso de agonistas beta adrenérgicos (cimaterol, zilpaterol, ractopamina) en el alimento también ha sido objeto de fuertes restricciones en el comercio mundial de carnes (Centner et al., 2014) y, en consecuencia, no está autorizado en nuestro país. Resulta de interés, entonces, la experimentación con nuevas alternativas al uso de los promotores de crecimiento hormonales, con productos como el de referencia que no dejen residuos en carne, que no representen un riesgo para la salud y sean aceptadas por los consumidores.

Algunos componentes de la pared celular bacteriana están relacionados a respuestas proinflamatorias, pero otros, tales como el polisacárido A (Surana y Kasper, 2012) y el ácido lipoteicoico (Smelt et al., 2013), se han vinculado con respuestas anti-inflamatorias e inmunoregulatoras que mejoran la salud animal, a partir de su interacción con el sistema inmunitario. También se han identificado otras moléculas efectoras, como los glucanos, que forman parte de la envoltura microbiana. Pueden distinguirse dos tipos de glucanos: los polisacáridos capsulares, que están firmemente unidos a la superficie celular, y los exopolisacáridos (EPS), que están laxamente unidos a la superficie extracelular o son secretados al ambiente que la rodea. Existe una variedad de receptores en las células del sistema inmunitario que intervienen en el reconocimiento de determinadas sustancias microbianas, como los EPS, y en la iniciación y regulación de la respuesta inmunitaria. Algunos de los receptores más estudiados son los receptores tipo Toll (TLRs o Toll-like receptors) y los receptores a lectina tipo C (CLRs o C-type lectin receptors). La interacción de los EPS con los receptores de las células dendríticas, asociadas al intestino, inician, a su vez, una

cadena de eventos asociados a la estimulación de los linfocitos B, con la subsecuente producción de inmunoglobulina A (IgA), y de los linfocitos T helpers y T regulatorios, que intervienen en la estimulación y la regulación inmunitaria, respectivamente (Oerlemans et al., 2021). Es reconocido, por otro lado, que los polisacáridos switeriónicos (como el polisacárido A) son tomados por células presentadoras de antígenos, procesados a través de reacciones oxidativas y presentados a linfocitos T en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII), elicitando así una respuesta inmunológica. Los polisacáridos no switeriónicos no son capaces de unirse al MHCII. Sin embargo, si están unidos a proteínas pueden interactuar con el MHCII y a receptores de linfocitos T, lo que dio lugar a las vacunas a base de glucoconjugados (Avcı et al., 2013). También los glicolípidos, por ejemplo, alfa galactosil ceramida, pueden inducir respuestas de células T “natural killer” invariantes (iNKT), cuando son presentados por moléculas llamadas CD1d (Sun et al., 2016).

De esta manera, y en base a las complejas interacciones de polisacáridos y lipopolisacáridos bacterianos con el sistema inmunitario, resulta de interés evaluar el uso de este tipo de productos, como promotores del crecimiento, a través de una mejora de la salud animal (Tzianabos et al., 1994; Notararigo et al., 2014) y, probablemente, a través de efectos directos propuestos sobre algunos sistemas metabólicos (Zhang et al., 2016).

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en la Unidad Didáctica Experimental y Productiva (UDEP) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, ubicada cercana a la localidad de General Pico, y comenzó el 5 de noviembre de 2019.

Se utilizaron 40 vaquillonas, con peso inicial promedio de 260 kg, la mayoría cruce Hereford por Aberdeen Angus, identificadas con caravanas numeradas. Los animales fueron asignados aleatoriamente a dos grupos iguales: Control y Tratamiento, los que fueron manejados en forma conjunta sobre una pastura de alfalfa durante todo el período del ensayo, en un pastoreo rotativo, con parcelas de 2 hectáreas.

El grupo Tratamiento fue inoculado en forma subcutánea, con 10 ml de un producto comercial a base de polisacáridos bacterianos (MK471, Laboratorio Puebla, Argentina), al inicio del ensayo y a los 21, 73 y 107 días. Si bien la recomendación publicada en el prospecto del laboratorio es de 2 dosis con 20 días de intervalo, en el presente ensayo se decidió extender el protocolo a 4 dosis, para evaluar un uso más extendido del producto, lo que fue consensuado con el equipo técnico del Laboratorio Puebla. Las vaquillonas de ambos grupos fueron pesadas por la mañana, previo desbaste desde las 18:00 h del día anterior para calcular la ganancia diaria de peso (GDP) general en todo el experimento (diferencia entre el peso final e inicial, dividido por la duración del experimento) y de cada período o intervalo entre pesadas. A las 72 h de cada pesada, los animales se llevaron a la manga, sin encierro previo, para minimizar las situaciones de estrés, y fueron sangrados de vena yugular, para obtener muestras de sangre, utilizando EDTA como anticoagulante. Dichas muestras de sangre fueron enviadas dentro del término de una hora al laboratorio para su análisis hematológico.

El recuento de glóbulos rojos (GR) y blancos (GB) se realizó en la cámara de Neubauer. Para los GR se realizó una dilución 1:200 de la muestra de sangre en solución salina al 0,85%, y se procedió al recuento con microscopio óptico (40 x) en las áreas correspondientes. El valor obtenido se expresó como número de GR por microlito (μl).

En el caso de los GB, la dilución fue de 1:20, con una solución de Turk (ácido acético glacial al 3 %). El recuento se realizó con un aumento de 10 x y el resultado se expresó como número de GB por microlito (μl).

Para medir la concentración de proteínas plasmáticas totales se utilizó un refractómetro y el valor se expresó como proteínas en g/dl de plasma.

Al inicio del ensayo, se realizaron mediciones para verificar que las medias y las varianzas de los animales muestreados para conformar los grupos Control y Tratamiento eran estadísticamente iguales en las cuatro variables de interés (peso inicial, GR, GB y proteínas plasmáticas totales). Los análisis estadísticos mostraron la existencia de homogeneidad de varianzas para las cuatro variables ($p_{\text{HomVar}} > 0,05$) y la no existencia de diferencias entre las medias ($p > 0,05$).

Con los datos productivos al momento de finalización del ensayo se realizó un análisis marginal de beneficio/costo para evaluar la factibilidad económica de la utilización del promotor de crecimiento.

Análisis Estadístico: El diseño experimental fue un diseño completamente aleatorizado. Las variables respuesta peso vivo, GDP de cada período o intervalo entre pesadas, número de GR y GB, y concentración de proteínas totales en plasma fueron analizadas mediante un modelo general mixto, modelando la falta de independencia entre las observaciones. El modelo incluyó los efectos fijos de tratamiento, tiempo y la interacción tratamiento x tiempo, y para el caso de GDP se incluyó, además, el peso inicial como covariable. La matriz de correlación seleccionada fue la que presentó el menor valor de AIC (Criterio de Información de Akaike). La GDP general de todo el período experimental se analizó mediante un modelo lineal general con el efecto fijo del tratamiento y modelando la estructura de la varianza mediante varExp. Para el análisis se utilizó el software estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2017). Las diferencias entre medias fueron declaradas significativas cuando el p valor fue menor a 0,05.

RESULTADOS

Como puede observarse en la Figura 1, la diferencia en el peso vivo entre los grupos comenzó a ser estadísticamente diferente a partir de la cuarta medición (día 107) y continuó así hasta los 170 días, donde el grupo Tratamiento presentó los mayores pesos. En el mismo sentido, la GDP fue superior (+ 0,11 kg/día, $p < 0,0001$) en el grupo Tratamiento comparado con la del grupo Control (Tabla 1). El análisis de la GDP por períodos, o intervalos entre pesadas, resultó con interacción tratamiento x tiempo, siendo en todos los casos mayor en el grupo Tratamiento (Figura 2).

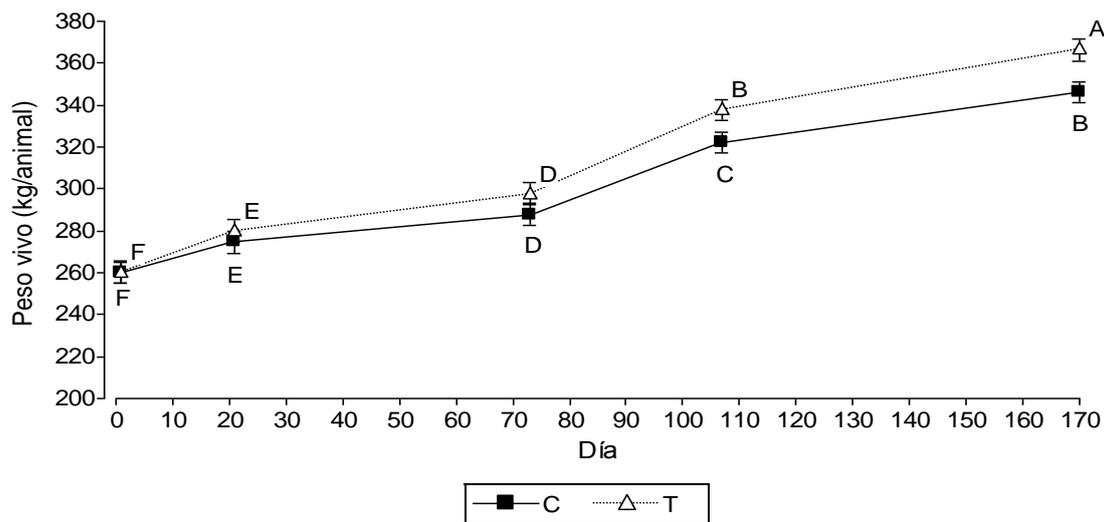
Las determinaciones sanguíneas, número de GR y GB, y concentración de proteínas plasmáticas totales, resultaron con interacción tratamiento x tiempo significativa (Tabla 1). El número de GR fue superior en el grupo Tratamiento ($p < 0,01$) a lo largo de todo el ensayo (Figura 3), a excepción del día 0 donde no hubo diferencias, lo que explica la interacción. Por su parte, el conteo de GB fue mayor en el grupo Tratamiento a los 21, 73 y 107 días (Figura 4), pero, sin embargo, no difirió al final del ensayo. La

concentración de proteínas totales en plasma fue más elevada en el grupo Tratamiento a los 73, 107 y 170 días (Figura 5).

Tabla 1. Medias y error estándar (EE) de la ganancia diaria de peso (GDP) general de todo el período experimental, el número de glóbulos rojos (GR) y blancos (GB), y la concentración de proteínas plasmáticas totales de los animales del grupo Control (C) y Tratamiento (T).

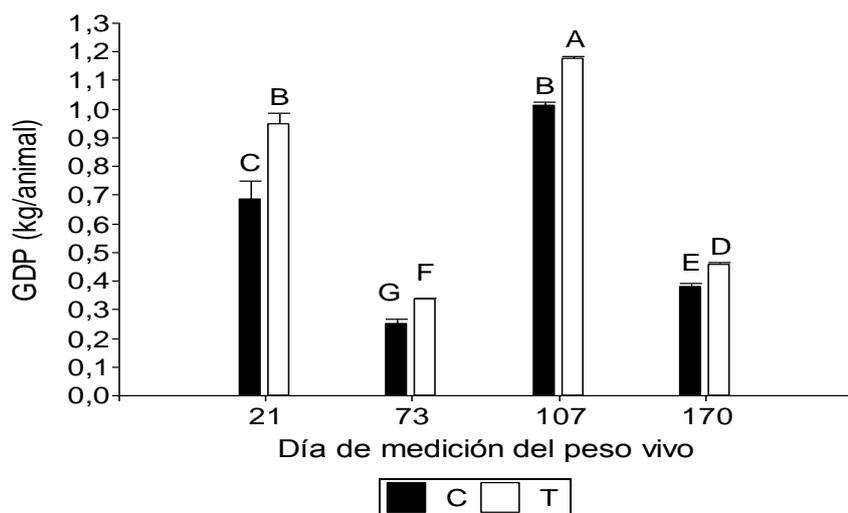
	T	C	EE	p valor		
				Tratamiento	Tiempo	Tratamiento x Tiempo
GDP (kg/día)	0,62	0,51	0,01	<0,0001	-	-
GR (millones/ μ l)	7,00	6,06	0,10	<0,0001	<0,0001	<0,0001
GB (miles/ μ l)	8,12	7,80	0,09	0,014	<0,0001	<0,0001
Proteínas (g/dl)	6,91	6,70	0,08	0,066	0,158	0,003

Figura 1. Evolución del peso vivo (medias ajustadas \pm error estándar) de los animales del grupo Control (C) y Tratamiento (T) a lo largo del ensayo.



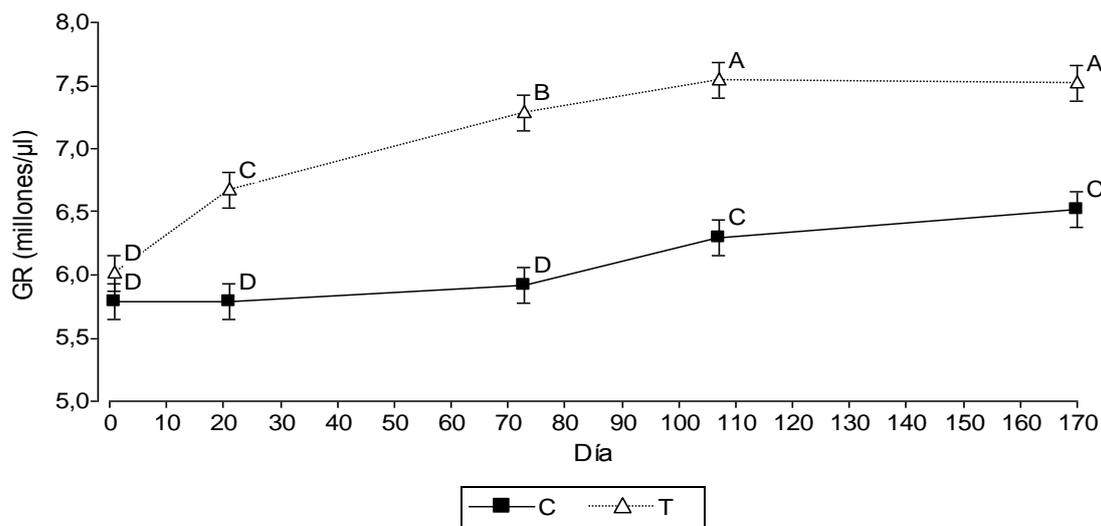
Efectos: Tratamiento: NS; Tiempo: $p < 0,01$; Tratamiento x Tiempo: $p < 0,01$. Letras distintas indican diferencias entre medias ($p < 0,05$) para la interacción Tratamiento x Tiempo.

Figura 2. Evolución de la ganancia diaria de peso (medias ajustadas \pm error estándar) de los animales del grupo Control (C) y Tratamiento (T) a lo largo del ensayo.



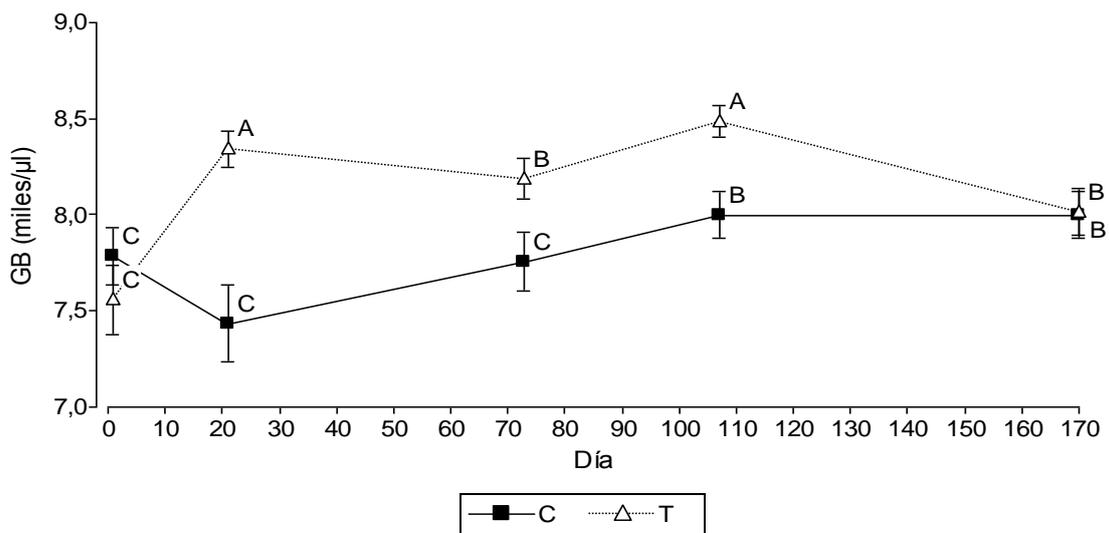
Efectos: Tratamiento: $p < 0,01$; Tiempo: $p < 0,01$; Tratamiento x Tiempo: $p < 0,01$. Letras distintas indican diferencias entre medias ($p < 0,05$) para la interacción Tratamiento x Tiempo.

Figura 3. Evolución del número de glóbulos rojos (GR, medias ajustadas \pm error estándar) en los animales del grupo Control (C) y Tratamiento (T) a lo largo del ensayo.



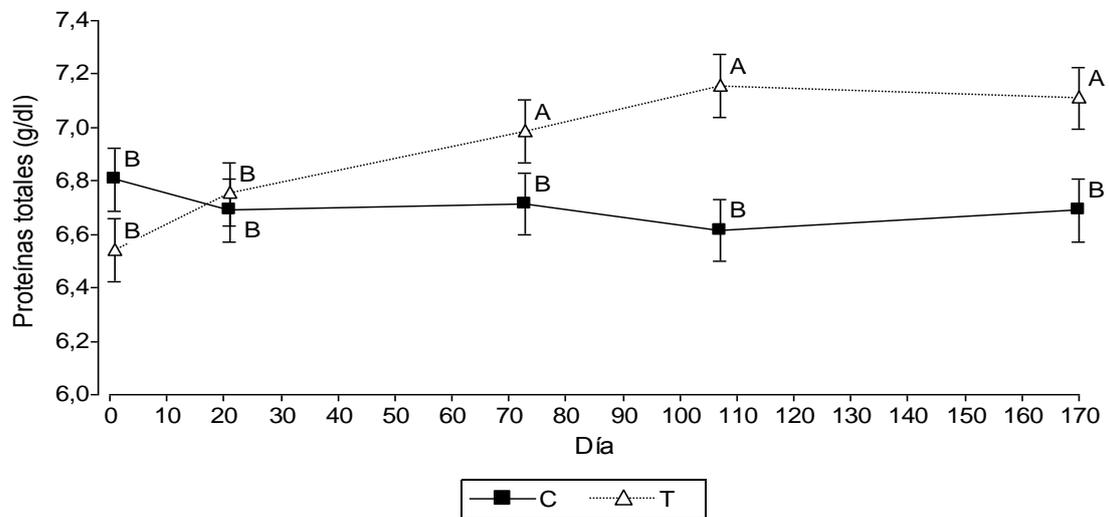
Efectos: Tratamiento: $p < 0,01$; Tiempo: $p < 0,01$; Tratamiento x Tiempo: $p < 0,01$. Letras distintas indican diferencias entre medias ($p < 0,05$) para la interacción Tratamiento x Tiempo.

Figura 4. Evolución del número de glóbulos blancos (GB, medias ajustadas \pm error estándar) en los animales del grupo Control (C) y Tratamiento (T) a lo largo del ensayo.



Efectos: Tratamiento: $p < 0,05$; Tiempo: $p < 0,01$; Tratamiento x Tiempo: $p < 0,01$. Letras distintas indican diferencias entre medias ($p < 0,05$) para la interacción Tratamiento x Tiempo.

Figura 5. Evolución de la concentración de proteínas plasmáticas totales (medias ajustadas \pm error estándar) en los animales del grupo Control (C) y Tratamiento (T) a lo largo del ensayo.



Efectos: Tratamiento: $p < 0,10$; Tiempo: NS; Tratamiento x Tiempo: $p < 0,01$. Letras distintas indican diferencias entre medias ($p < 0,05$) para la interacción Tratamiento x Tiempo.

Análisis económico (abril 2020, valor dólar \$ 65,37 / USD)

El costo del producto es de 2,44 USD por animal (0,61 USD/dosis por 4 dosis), a lo cual se le suman 2,14 USD por honorarios profesionales (10,71 USD el día de trabajo, por 4 días, dividido 20 animales) y se obtiene un costo marginal de 4,58 USD por animal. Por otro lado, considerando que la ganancia de peso de todo el período de 171 días fue de 86 kg

en el grupo Control y de 106 kg en el grupo Tratamiento, el ingreso marginal es de 32,80 USD por animal (20 kg por 1,64 USD de ingreso neto/kg de peso) y, como resultado, la relación beneficio/costo sería de 7,2/1 (32,80 USD dividido 4,58 USD).

DISCUSIÓN

Un aspecto a destacar del producto comercial en base a polisacáridos bacterianos, como estimulante del crecimiento en vaquillonas, es que su efecto se mantuvo tanto en momentos de alta (pesadas 2 y 4) como de baja (pesadas 3 y 5) disponibilidad de forraje (Figura 2). Dados los resultados obtenidos en cuánto a GDP, dicho producto podría proponerse como una nueva herramienta en la búsqueda de la mejora de la eficiencia de conversión en ganadería bovina. Así mismo se proponen mayores estudios de investigación que respalden su utilización como promotor del crecimiento.

Aun cuando no se midieron otras variables metabólicas, las diferencias en el número de GR y en la cantidad de proteínas plasmáticas totales a favor del grupo Tratamiento parecen sustentar la respuesta en la variable productiva ganancia de peso, similar a los descrito por Ayala et al. (2001) en vacas lecheras.

Adicionalmente, puede hipotetizarse que la elevación en el número de GB en el grupo Tratamiento se relacionaría con una mejora en aspectos sanitarios, que, a su vez, impactarían sobre el crecimiento, como lo describieron Roa et al. (2017). No obstante, el valor de GB en el muestreo del día 170 no difirió del grupo Control ($p > 0,05$; Figura 4), lo cual explica la interacción tratamiento x tiempo ($p < 0,0001$; Tabla 1), y podría asociarse a una caída del efecto del medicamento.

La mejora en variables relacionadas con el sistema inmunitario amerita futuros ensayos más específicos.

CONCLUSIONES

Como conclusión, se puede observar al finalizar el ensayo que el tratamiento con fragmentos de polisacáridos bacterianos tuvo un impacto positivo en la ganancia de peso de las vaquillonas tratadas, con una diferencia del 21,6 % sobre el grupo Control. Asimismo, el análisis económico marginal revela una amplia relación beneficio/costo, que, al momento de la realización del ensayo, fue de 7,2/1.

BIBLIOGRAFÍA

- Avci, F.Y.; Li, X.; Tsuji, M.; Kasper, D.L. (2013). *Carbohydrates and T cells: A sweet twosome*. *Semin Immunol* 25: 146-151.
- Ayala, J.; Pinos, J. M.; Sabas, J. G. y Salinas, P. S. 2001. *Perfil metabólico sanguíneo de vacas lecheras alimentadas con dietas conteniendo lasalocida y cultivos de levadura*. *Invest. Agr. Prod. Sanid. Anim.* 16:143-155.
- Centner, T.J.; Alvey, J.C.; Stelzleni, A.M. (2014). *Beta agonists in livestock feed: Status, health concerns, and international trade*. *J Anim Sci* 92: 4234-4240.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; González, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. (2017). *InfoStat* versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>.
- Notararigo, S.; Casas-Engel, M.; Palencia, P.F. (2014). *Immunomodulation of human macrophages and myeloid cells by 2-substituted (1-3)-rmbeta-D-glucan from P. parvulus 2.6*. *Carbohydrate Polymers*, dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.073.

Oerlemans, M.M.P.; Akkerman, R.; Ferrari, M.; Walvoort, M.T.C.; de Vos, P. (2021). *Benefits of bacteria-derived exopolysaccharides on gastrointestinal microbiota, immunity and health*. J Funct Foods. doi:10.1016/j.jff.2020.104289.

Roa, M.; Ladino, E. y Hernández, M. 2017. *Indicadores de bioquímica sanguínea en bovinos suplementados con Cratylia argentea y Saccharimyses cerevisiae*. Pastos y Forrajes. 40:144-151.

Smelt, M.J.; de Haan, B.J.; Bron, P.A.; van Swam, I.; Meijerink, M.; Wells, J.M.; Kleerebezem, M.; Faas, M.M.; de Vos, P. (2013). *The impact of Lactobacillus plantarum WCFS1 teichoic acid D-alanylation on the generation of effector and regulatory T-cells in healthy mice*. PLoS ONE 8(4): e63099. doi:10.1371/journal.pone.0063099.

Smith, Z.K.; Johnson, B.J. (2020). *Mechanisms of steroidal implants to improve beef cattle growth: a review*. J Appl Anim Res 48: 133-141.

Sun, L.; Middleton, D.R.; Wantuch, P.L.; Ozdilek, A.; Avci, F.Y. (2016). *Carbohydrates as T-cell antigens with implications in health and disease*. Glycobiology 10: 1029-1040.

Surana, N.K.; Kasper, D.L. (2012). *The ying yang of bacterial polysaccharides: Lessons learned from B. fragilis PSA*. Immunol Rev 245: 13-26.

Terry, S.A.; Barasab, J.A.; Guan, L.L.; McAllister, T.A. (2021). *Strategies to improve the efficiency of beef cattle production*. Can J Anim Sci 101: 1-19.

Tzianabos, A.T.; Onderkonk, A.B.; Zaleznik, D.F.; Smith, R.S.; Kasper, D.L. (1994). *Structural characteristics that induce protection against intra-abdominal abscess formation*. Infect Immun 62: 4881-4886.

Zhang, Z.; Zhou, Z.; Zhoun, L.; Ding, Q.; Xu, L. (2016) *Isolated exopolysaccharides from Lactobacillus rhamnosus GG alleviated adipogenesis mediated by TLR2 in mice*. Sci Rep 6, 36083; doi: 10.1038/srep36083.

Tenencia Responsable de Mascotas y Enfermedades Zoonóticas en el Valle Medio

Sosa, R.A.¹; Torres; P.A.¹; Álvarez, M.A.¹ y Chávez, E.J.¹

¹Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Río Negro. Pacheco 460. Choele Choel, Río Negro.

asosa@unrn.edu.ar

RESUMEN

Este proyecto de extensión fue generado por docentes y estudiantes comprometidos con la tenencia responsable de mascotas y con la promoción y prevención de enfermedades zoonóticas. Se unieron a entidades participantes y propusieron generar la toma de conciencia por parte de la sociedad sobre la tenencia responsable. Participaron la Carrera de Medicina Veterinaria y organizaciones públicas y privadas que se encuentran involucradas en la problemática (municipios, veterinarias privadas y escuelas). Se desarrollaron acciones que permitieron conformar una red interinstitucional para la concientización de la temática en cuestión. Se abordó la problemática del crecimiento en la población de caninos y felinos y la identificación de factores de riesgo en salud pública. Se realizaron campañas de esterilización, desparasitación y vacunación antirrábica, se brindaron charlas en colegios y se llevaron a cabo campañas de difusión a través de medios, haciendo hincapié en las familias y en los cuidados en la salud de los niños y las mascotas en distintos barrios de Choele Choel y otras localidades cercanas.

Palabras claves: tenencia responsable de mascotas, enfermedades zoonóticas, salud pública, esterilización, vacunación antirrábica.

Responsible Pet Ownership and Zoonotic Diseases in Valle Medio

ABSTRACT

This project of university extension was generated by teachers and students committed to responsible pet ownership and the promotion and prevention of zoonotic diseases. They joined participating entities and proposed to raise awareness on the part of society about responsible ownership. The Faculty of Veterinary Medicine and public and private organizations involved in the problem (municipalities, private veterinarians and schools) participated in this activity. The actions allowed an inter-institutional network to raise awareness of the issue in question. The problem of growth in the canine and feline population and the identification of risk factors in public health were addressed. Sterilization, deworming and rabies vaccination campaigns were performed; a canine census was implemented; talks were given in schools and information campaigns were

carried out through the media, emphasizing the families, children, and animals' health care in different neighborhoods of Choele Choel and other close towns.

Keywords: responsible pet ownership, zoonotic diseases, public health, sterilization, rabies vaccination.

INTRODUCCIÓN

La superpoblación urbana de caninos y felinos significa un serio problema en la sociedad. Entre otras cosas, promueve la transmisión de enfermedades zoonóticas (Milano y Oscherov, 2005). Por otro lado, los perros sin propietarios terminan por apropiarse de los espacios verdes y espacios públicos (Daniels, 1982).

El manejo de la población canina y felina requiere un conjunto de estrategias dirigidas a prevenir la sobrepoblación y el abandono de los animales. Estas estrategias se basan en la perspectiva de promover la salud de la comunidad, el bienestar humano y animal y el mantenimiento del equilibrio ambiental (García et al. 2012).

Este proyecto promovió acciones sociales que devienen en una didáctica basada en competencias, un aprender haciendo para los involucrados (Schön 1987). Son acciones que se han desarrollado por varios años consecutivos y se ha integrado el accionar de diversos estudiantes, docentes y profesionales del medio. Estudios científicos, problemas asociados a la falta de conciencia en la tenencia responsable de mascotas y denuncias que se difunden a través de los medios de comunicación concluyen que los perros sueltos aumentan y que las acciones realizadas no son suficientes para concientizar a los propietarios o propietarios comunitarios. Las castraciones masivas con buenos resultados en otros países o provincias, adolecen de problemas organizativos y/o financieros que las hacen insuficientes. Cuestiones prioritarias como el censo, la educación en escuelas y la concientización sobre tenencia responsable de mascotas y las zoonosis siguen relegadas. Pero el problema no son los caninos, su forma de reproducción o sus instintos ancestrales; está comprobado por estudios de seguimiento demográfico que hay una dependencia demográfica de los perros y las poblaciones humanas; significa entonces que el crecimiento como población humana incide directamente en el crecimiento de la población canina. En cuanto a la reproducción, aún en condiciones controladas, una perra y su progenie, pueden ser responsables de un incremento de la población animal de hasta 4400 perros al cabo de 7 años (Botero Bernal, 2009). Las asociaciones que toman esta problemática, las ONG que incluyen campañas de Adopción responsable en la Feria, el trabajo con el Concejo Deliberante y el municipio, los segmentos en radio y difusión de spots, la coordinación del Programa de castraciones y vacunaciones, hacen que la localidad de Choele Choel muestre acciones y trabajo en dicha problemática que surgen de manera aislada. Este proyecto intentó desarrollar un espacio y conformar una red interinstitucional que intensificara la educación sobre la tenencia responsable de estas especies. A partir de esta problemática y para concientizar sobre tenencia responsable de mascotas se elaboró este programa que concentró las acciones a fin de organizarlas y formalizarlas. En estas actividades se renovó, en el concepto de aprendizaje académico universitario, la capacidad de aplicar conocimientos, habilidades y destrezas adquiridas en la resolución de problemas sociales, con énfasis en los sectores más vulnerables y desprotegidos. El concepto al cual se apuntó es el de servicio social, vinculando de una manera colaborativa y constructiva a la universidad con la sociedad, para que ambas

reciban mutuos beneficios en torno a los saberes y a la resolución de problemas, intentando que el resultado de este trabajo social impacte en un mejor control de la población de estas mascotas y en la salud pública mediante el control de las enfermedades de estas especies y en particular de aquellas denominadas zoonóticas. El objetivo del proyecto fue fortalecer el paradigma de una sola salud al establecer vínculos con instituciones que están en contacto regular con los animales, tomar la responsabilidad y el compromiso de ejercer acciones de salud, inclusión social, voluntad de servicio, participación ciudadana y solidaridad en un ambiente de trabajo interdisciplinario. Este proyecto intentó, por un lado, responder a las demandas de concientización, asesoramiento, capacitación y acompañamiento planteadas por la comunidad del Valle Medio de Río Negro en cuanto a la tenencia responsable de mascotas y colaborar en vacunaciones, identificación de factores de riesgo en enfermedades zoonóticas y, por el otro, participar en el control de la población mediante castraciones masivas. Por otra parte se buscó desarrollar un espacio y conformar una red interinstitucional para llevar adelante acciones de concientización a través de todos los medios, comenzando por la educación en la familia y los cuidados en la salud de los niños y las mascotas. También se apuntó a fomentar la participación de los estudiantes universitarios en tareas comunitarias con la finalidad de ampliar no sólo su formación, sino también su compromiso social.

METODOLOGÍA

Durante la ejecución del proyecto, en marzo, abril y mayo del año 2018 se realizaron 15 charlas tanto en jardines como en colegios primarios y secundarios de Choele Choele, Beltrán y Lamarque (destinadas a promover la tenencia responsable de mascotas, haciendo hincapié principalmente en la transmisión de información referida a enfermedades zoonóticas). Los docentes a cargo del proyecto capacitaron previamente a los estudiantes y fueron ellos quienes, más tarde (con el apoyo de los docentes) estuvieron a cargo de las charlas. Antes y después del dictado de las charlas se entregaron cuestionarios a los alumnos para conocer sus saberes (previos y posteriores a la charla informativa) con el objetivo de medir el grado de impacto de la actividad. Los establecimientos educativos de la zona que recibieron las charlas de concientización en la localidad de Lamarque fueron las escuelas de Educación Primaria 25, 226, 368, 112 y 237. En la localidad de Beltrán las escuelas de Educación Primaria 101, 11, 215 y el CET 29. En la localidad de Choele Choele, las escuelas de Educación Primaria 280, 354, el colegio Agrotécnico, el CET 13 y CEM 47. Esto significó una audiencia aproximada de 600 alumnos. Las charlas y actividades tuvieron una duración de 45 a 60 minutos cada una.

En mayo, junio, septiembre y octubre del mismo año se efectuaron 7 jornadas de esterilizaciones, 8 de desparasitaciones y 10 de vacunaciones antirrábicas en caninos y felinos en Choele Choele, Beltrán, Lamarque, Pomona, Chimpay, Darwin y Belisle. Al propietario de cada animal vacunado se le entregó un certificado de vacunación antirrábica con validez legal, otorgado por el Colegio Médico Veterinario de la provincia de Río Negro. Para ello se contó con el apoyo de los municipios, quienes estuvieron a cargo de la difusión de la actividad para lograr que la sociedad tome conocimiento de las jornadas que se desarrollarían. El PROTENENCIA (Presidencia de la Nación) aportó el quirófano móvil. También colaboró el HeMeVe (Hospital Escuela de Medicina Veterinaria de la UNRN), quien puso a disposición a su personal no docente del sector de pequeños

animales para que colabore con los profesionales a cargo de las campañas. En estos casos los estudiantes colaboraron realizando vacunaciones y desparasitaciones bajo la supervisión de los médicos veterinarios, y se desempeñaron como asistentes en las cirugías. Se confeccionaron y entregaron folletos a los propietarios de los animales vacunados. También se realizó entrega de los mismos a diversas personas en las calles de Choele Choel, Pomona, Chimpay, Lamarque, Beltrán, Darwin y Belisle, e inclusive se dejaron en los Municipios, Hospitales, Centros de Cultura y Colegios primarios y secundarios de estas localidades. En dichos folletos se encontraban detalladas las formas de transmisión y de prevención de la Rabia, como así también la importancia que representa para la salud pública la prevención de la misma.

En otra oportunidad, en abril y agosto de 2019, también se efectuaron vacunaciones antirrábicas en las localidades de Choele Choel, Pomona, Chimpay, Lamarque, Beltrán, Darwin y Belisle (1 jornada en cada localidad). A diferencia de aquello realizado en campañas anteriores, en estas oportunidades se vacunaron exclusivamente caninos y felinos vagabundos.

Sobre el final del proyecto, en octubre de 2019, se dictó una charla informativa sobre Rabia a alumnos de la Escuela Primaria N° 215 de Luis Beltrán. Estos alumnos ya habían recibido una charla acerca del tema anteriormente y desde el mismo colegio nos pidieron que volviéramos a hablarles del tema con mayor profundidad. Esta vez la jornada se llevó a cabo en el Hospital Escuela de medicina veterinaria de la UNRN. De esta manera los alumnos también conocieron las instalaciones del mismo y recibieron información acerca de distintos temas relacionados a la medicina veterinaria y, principalmente, a la salud pública.

CONCLUSIONES

Se logró realizar diferentes actividades destinadas a promover la tenencia responsable de mascotas. Los estudiantes han manifestado un alto grado de interés en trabajar sobre dicha problemática, poniendo de manifiesto el compromiso para con la comunidad. El proyecto intentó dar respuesta a diversas necesidades, como lo son la educación sobre tenencia responsable en colegios, la esterilización, desparasitación y vacunación antirrábica de mascotas. Debe tenerse presente que las actividades realizadas surgen efecto a mediano o largo plazo. Por otro lado es real que se debe seguir trabajando para que el grado de alcance sea mayor. El trabajo debe ser sostenido en el tiempo y, es por este motivo, que resulta fundamental seguir ejecutando proyectos similares a través de los años. La educación es tan o más importante que las esterilizaciones ya que, si se logra una tenencia responsable de mascotas, el número de animales en situación de calle será cada vez menor y se reducirá la ocurrencia de enfermedades zoonóticas. Se ha contado con la buena predisposición de los distintos municipios, de los establecimientos educativos y de la sociedad en general, lo cual alienta al cuerpo docente de la carrera de Medicina Veterinaria a continuar trabajando en esta temática.

BIBLIOGRAFÍA

Botero Bernal. 2009. *Tenencia responsable de mascotas*. Revista Colombiana de Ciencia Animal, Vol. 2, N° 2.

Daniels, T.J. *The social organisation of free-ranging urban dogs*. 1. non-oestrus social behaviour 2. oestrus social behaviour. Applied Animal Ethology. 1982. 10:341-363

Garcia, RCM; Calderón, N; Ferreira, F. *Consolidação de diretrizes internacionais de manejo de populações caninas em áreas urbanas e proposta de indicadores para seu gerenciamento*. Revista Panam. 2012. 32(2):140-144.

Milano, MF; Oscherov, EB. *Contaminación de aceras con enteroparásitos caninos en Corrientes, Argentina*. Parasitología Latinoamericana. 2005. 60:82-85.

Schön, Donald. 1987. *La formación de profesionales reflexivos. Hacia un nuevo diseño de la enseñanza y el aprendizaje en las profesiones*. Barcelona, Paidós. 1Ed.1992. ISBN: 84-7509-730-8

SECCIÓN ARTÍCULOS TÉCNICOS

Análisis histológico y expresión de receptores de estrógenos y progesterona en úteros y placentas porcinas durante la gestación temprana

Marrón Y.M.; Viglierchio M.C.; García M.; Williamson D.; Clazure M. y Vélez C.

Pp. 16-27

Análisis histológico y expresión de receptores de estrógenos y progesterona en úteros y placentas porcinas durante la gestación temprana

Marrón Y.M.¹; Viglierchio M.C.¹; García M.¹; Williamson D.¹; Clazure M.¹ y Vélez C.¹

¹Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa. Calle 5 esquina 116, General Pico (6360). La Pampa.

El trabajo se realizó en el marco de una Beca Estímulo a las Vocaciones Científicas del Consejo Interuniversitario Nacional

yolandamabelmarron@gmail.com

RESUMEN

En este artículo técnico se describen las características histológicas y la expresión de receptores de estrógenos β y de progesterona isoforma A, en úteros de cerdas no gestantes en fase folicular y en placentas porcinas en etapa de implantación. Se analizó tejido uterino usando la tinción de hematoxilina eosina, y se evaluó cualitativamente la expresión de receptores de estrógenos β y de progesterona isoforma A por medio de la técnica de inmunohistoquímica. Los resultados se expresaron en función de la coloración marrón detectada en núcleos de las muestras analizadas. En cerdas no gestantes se halló expresión de ambos receptores en endometrio. A los 17 días de gestación se halló expresión de receptor de estrógeno β en glándulas y en trofoblasto. En relación con el receptor de progesterona isoforma A, la inmunomarcación se observó en glándulas, tejido conectivo y miometrio. Los resultados obtenidos sugieren que los receptores de estrógenos fetales y los receptores de progesterona endometriales son imprescindibles para establecer las señales de comunicación entre el útero receptivo y los embriones en la fase de implantación en la cerda.

Palabras claves: Cerda; Úteros; Hormonas; Receptores.

Histological analysis and expression of estrogen and progesterone receptors in uteri and placentas of sows during the early gestation.

ABSTRACT

In this technical article the histological characteristics and the expression of estrogen receptors β and progesterone isoform A are described in the uteri of non-pregnant sows in the follicular phase and porcine placentas at implantation stage. The uterine tissue was analysed using hematoxylin eosin staining and the expression of estrogen receptors β and progesterone isoform A were qualitatively evaluated with immunohistochemical technique. The results were expressed based on brown color detected in nucleus from endometrial samples. In non-pregnant sows, it was found

expression of both receptors in endometrium. At 17 days of gestation, it was found estrogen receptor β in glands and in trophoblast. Regarding the progesterone receptor isoform A, immunostaining was observed in glands, connective tissue and myometrium. The results obtained suggest that fetal estrogen receptors and endometrial progesterone receptors are essential to establish signal pathways between receptive uteri and embryos in the porcine implantation stage.

Key Words: Sow; Uterus; Hormones; Receptors.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la porcicultura es la principal actividad pecuaria y fuente de proteína animal, la carne de cerdo es mayoritariamente elegida por los consumidores, ya que representa el 35,3% del total de carne consumida (Braun, 2015); y en los últimos años en Argentina ha crecido su producción (Iglesias and Ghezan, 2013). Esto sucede porque los cerdos poseen mayor eficiencia biológica en la transformación de los alimentos en carne a diferencia de otra especie como la bovina. Además, tienen un periodo de gestación más corto (114 días), alta prolificidad (24-30 lechones por hembra por año) y corta edad para llegar a faena (4-5 meses) (Barrales *et al.*, 2004); siendo estas características claves en la disminución de los costos de producción en comparación con otras carnes.

La eficiencia reproductiva dentro de una granja puede ser medida de varias maneras dependiendo la fase del ciclo que se quiera evaluar, cómo ser: tasa de parto, peso al nacimiento y destete, cantidad de lechones nacidos totales, vivos, muertos y destetados. Existen numerosas evidencias científicas sobre la pérdida embrionaria en porcinos, y también son variados los parámetros que utilizan los distintos autores en el análisis de este tema, dado que las pérdidas prenatales limitan la rentabilidad económica en la industria porcina (Freking *et al.*, 2007). La implantación embrionaria es una acción clave de la fisiología reproductiva en los mamíferos y es resultado de una serie de procesos tisulares complejos que se inicia con la fijación del blastocito en el útero y termina con la formación definitiva de una placenta (Betancourt Alonso *et al.*, 2006). Después del contacto inicial entre embrión y endometrio, a los 12 días de gestación (dg), el trofoblasto comienza a proliferar muy rápidamente, empieza a extenderse dentro de la luz uterina y toma contacto con el endometrio (Wooding and Burton, 2008). Estudios sugieren que el trofoblasto se pliega como resultado de su rápida expansión sin alterar la captación de líquido dentro del blastócele. Desde la implantación y hasta la aparición de la función placentaria, el embrión depende para su nutrición de la captación de "leche uterina" o nutrición histiotrófica (Hafez and Hafez, 2003). Es importante investigar a través de técnicas histológicas e inmunohistoquímicas sobre las características de los tejidos en este período, ya que puede darnos pautas necesarias para tomar las decisiones más adecuadas en el manejo de la cerda durante su gestación temprana. En esta etapa, en el diálogo entre el embrión y el útero se encuentran involucrados varios factores, como las prostaglandinas, leucotrienos, factores del crecimiento, citoquinas y hormonas esteroides ováricas (Betancourt Alonso *et al.*, 2006). Es imprescindible la presencia de un blastocito con capacidad para implantarse y al mismo tiempo el desarrollo de un endometrio receptivo (Wooding and Burton, 2008). En este periodo, se generan interacciones recíprocas entre el *conceptus* (embrión y anexos embrionarios) y el

endometrio donde las hormonas esteroideas, estrógenos (Es) y progesterona (P4), cumplen un papel importante. Estas hormonas secretadas por los ovarios, pertenecen al grupo de las hormonas esteroideas caracterizadas químicamente por poseer un núcleo tetracíclico, el ciclo pentano perhidrofenantreno, que bajo condiciones fisiológicas ejercen múltiples efectos en la cerda gestante (Hafez and Hafez, 2003). Estas moléculas liposolubles, difunden de manera pasiva a través de la membrana plasmática, se fijan a receptores nucleares específicos, y actúan regulando la transcripción de un número definido de genes (Murray *et al.*, 2019). Esto determina la síntesis de ARNm el cual es transportado al citoplasma donde estimula la síntesis de proteínas para regular los eventos moleculares que se desarrollan durante la implantación, al generar acciones específicas sobre los tejidos uterinos y el trofoblasto (Bazer and Johnson, 2014). Las hormonas esteroideas y sus genes regulados promueven los cambios en el desarrollo del útero que son necesarios para una implantación exitosa y la placentación (Mulac-Jericevic y Conneely, 2004; Sukjumlong *et al.*, 2005; Sukjumlong *et al.*, 2009; Steinhäuser *et al.*, 2017).

Los estrógenos desempeñan un rol imprescindible en la proliferación y expansión de la placenta, en el movimiento de agua y electrolitos, en la permeabilidad celular y en la regulación del flujo de sangre uterina. Además, intervienen en el transporte del embrión hacia los cuernos uterinos, en la migración y en el espaciado equidistante en el interior de los cuernos uterinos antes de la elongación rápida y adhesión a la superficie endometrial (Meyer *et al.*, 2019). La función de los estrógenos está mediada a través de la unión de sus receptores nucleares y citoplasmáticos (Miller *et al.*, 2017) y que en el cerdo cumplen un rol fundamental los estrógenos fetales. Los estrógenos secretados por el *conceptus* (estrógenos fetales) permiten un ambiente uterino receptivo para la implantación del embrión y el reconocimiento materno fetal (Velez, 2017).

Los receptores nucleares para estrógenos β (RE β), son proteínas sintetizadas a partir de genes específicos que corresponden a un subtipo de receptor de estrógeno (RE) no funcional, con efecto anti-proliferativo y que promueven la diferenciación celular en presencia de ligando (Koehler *et al.*, 2005).

Además, el epitelio uterino se expone a la acción de la progesterona, hormona de la gestación. La respuesta biológica a la P4 está mediada por dos isoformas del receptor de P4 isoforma A (RPA) e isoforma B (RPB). Los RPA y RPB son transcritos a partir de dos promotores diferentes de un mismo gen, que son inducidos por los Es, los cuales poseen efectos fisiológicos diferentes (Mulac-Jericevic and Conneely, 2004; Durlej *et al.*, 2010). Mulac-Jericevic and Conneely (2004), utilizando al ratón como modelo, estudiaron los efectos de los dos tipos de receptores, encontrando que RPA disminuye severamente la ovulación, perjudica la implantación y la decidualización, generando infertilidad. En ratón se sabe que RPA actúa como un represor dominante de RPB y además disminuye la respuesta a otras hormonas esteroideas tales como andrógenos y Es. No se han encontrado estudios de RPA en la especie porcina.

Los eventos moleculares posteriores, a la fijación del embrión, comienzan con un proceso de señalización entre el blastocito y el útero para iniciar la formación de la placenta. Este período involucra la presencia de varias moléculas en la etapa de implantación (15-17 dg), generando el diálogo entre el trofoblasto y el útero receptivo que afecta la tasa de gestación y posterior tamaño de camada, visualizándose en los índices reproductivos de esta especie. Por esta razón, este mecanismo de señalización deja varios interrogantes sobre la expresión del RE β y RPA en diferentes estructuras del

útero, tanto de cerdas no gestantes (NG) en fase folicular como cerdas gestantes (G) en el período de 15-17 dg.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de tractos reproductivos

Se utilizaron 8 tractos reproductivos de cerdas entre segundo y tercer parto destinadas a faena. Cuatro de las mismas provenían de cerdas gestantes (G) que se encontraban entre los 15 y 17 dg (n=4), y cuatro pertenecientes a cerdas no gestantes (NG) (n=4). Se determinó la edad gestacional de acuerdo a los registros de su historia clínica y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio. Los tractos reproductivos, se obtuvieron de animales que fueron a faena comercial en frigoríficos de la zona de General Pico, provincia de La Pampa, Argentina. Los animales se encontraban en buen estado de salud con plan sanitario completo. La sanidad de los animales fue acreditada mediante evaluación de su historia clínica a través de una entrevista con el productor. En el período gestacional estudiado, los embriones no son identificados por palpación en los tractos reproductivos, por lo cual se seccionaron los cuernos uterinos por su curvatura mayor para visualizar la posición de los filamentos. Luego se tomaron muestras de úteros de cerdas no gestantes, cerdas gestantes y filamento embrionario (trofoblasto: Tr). Se realizó técnica histológica para la tinción de hematoxilina eosina (H-E) para observar morfología del tejido. Se realizó inmunohistoquímica, para la determinación de RE β y RPA.

Análisis microscópico de la estructura de la placenta y útero

Técnica Histológica: Se realizaron cortes histológicos para microscopía óptica. Se extrajeron muestras de 1 cm³ de útero no gestante y de tejido placentario, tanto materno como fetal y se las fijó en formol tamponado con fosfato al 10% durante 12 a 24 hs. Posteriormente, las muestras fueron lavadas con agua de grifo, durante una a dos horas (Celani *et al.*, 1984), para luego ser deshidratadas a través de pasajes de alcohol con el siguiente orden: se las colocó en alcohol 70° por 10 horas; a continuación en alcohol 96° (Bialcohol®, Argentina) por 4 horas, nuevamente en alcohol 96° 4 horas, luego se las colocó en alcohol 100° dos horas, dos veces. A continuación, se colocaron en benzoato de bencilo durante toda la noche, finalmente se las sumergió dos veces en xilol (Dorwil®, Argentina) una hora. Seguidamente las muestras se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes de cada muestra con un espesor de aproximadamente 5 μ m, montando dos o tres cortes en cada portaobjetos positivado (Genex, USA); previamente al montaje se colocaron los cortes en un baño termostatzado a 40°C con agua. Se realizaron cuatro preparados de cada etapa fisiológica (NG y G), a modo de obtener una muestra para cada tinción (H-E, RPA y RE β) y un control negativo.

Tinción con Hematoxilina-Eosina

Para colorear los cortes histológicos, se realizó la técnica convencional según Luna (1968). Brevemente, se desparafinaron los cortes mediante 3 baños con xilol (Dorwil®, Argentina) durante 10 minutos cada baño, luego se sumergieron los cortes en una batería de alcoholes con graduación decreciente (alcohol 100°, dos baños de 5 min cada uno; alcohol 96°, dos baños de 5 min cada uno y alcohol 70°, un baño de 5 minutos). Posteriormente, se procede a la tinción con hematoxilina, luego en agua destilada para

que precipite y por último se realizó la tinción con eosina. Los preparados teñidos con H-E se deshidrataron para montarlos con un cubreobjetos, utilizando un medio de montaje no acuoso.

Determinación de receptores de hormonas esteroideas en tejidos placentarios y endometrio porcino por inmunohistoquímica

Se determinó la expresión RE β y RPA por inmunohistoquímica y se observaron los preparados para establecer de modo cualitativo la expresión de los receptores. Debido a la escasa disponibilidad de anticuerpos anti-receptores hormonales específicos para porcinos, se trabajó con anticuerpos que reaccionan con la especie humana, porcina y murina, ya utilizados por Durlej *et al.* (2010) y Tang *et al.* (2018). Sobre los cortes histológicos de cerdas NG y G del período de 15-17 dg se realizó la técnica de inmunohistoquímica indirecta LSAB (Labeled Streptavidin Biotin Method) utilizando el anticuerpo de ratón anti-receptor de estrógenos β humana-babuino monoclonal, [14C8] ab288 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) y anticuerpo de ratón monoclonal anti-receptor de progesterona isoforma A, clon 16, NCL-L-PGR-312 (Leica Biosystems, Novocastra Lab, Newcastle, United Kingdom). Brevemente, se desparafinaron los preparados sumergiéndolos en xilol, para luego rehidratar los tejidos mediante el uso de una serie de alcoholes de concentración decreciente, utilizando la técnica arriba mencionada. Seguidamente, se lavó el tejido con solución salina tamponada (PBS) sumergiendo los cortes dos veces durante 10 min, se agregó peróxido de hidrógeno al 5% en PBS (para bloquear la peroxidasa endógena) durante 20 min y se lavó con PBS (dos baños de 5 min cada uno, en adelante: 2x5). Se realizó tratamiento de recuperación antigénica, con este fin se utilizó un microondas de uso doméstico, en el que se sometió los cortes, en baño térmico con *buffer* citrato 0.01 M, pH 6.0 (Durlej *et al.*, 2010) por 3 min a 100% de potencia y 9 min al 50% de potencia; posteriormente las muestras se dejaron enfriar 20 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBS (2x5). Se colocó bloqueante de biotina endógena (Avidin-biotin-blocking-reagents, Cell Marque, USA): primero se incubó por 10 min con avidina y luego de un baño de 5 min con PBS se incubó por 10 min con biotina. Se lavó el tejido con PBS (2x5). Se utilizó Tritón X-100 al 0.1% en PBS, durante 5 minutos para permeabilizar las membranas celulares. Se lavó el tejido con PBS (1x5). Se utilizó suero de caballo al 1% en PBS por 30 min a fin de bloquear las uniones inespecíficas (Durlej *et al.*, 2010). Para la determinación de RE β se utilizó un anticuerpo de ratón anti-receptor de estrógenos β humana-babuino monoclonal, [14C8] ab288 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) (Tang *et al.*, 2018), dilución 1:250, incubando aproximadamente 20 horas a 4°C. Luego de la incubación, se dejaron los cortes a temperatura ambiente por 10 min y se los lavó con PBS (2x5). Se agregó un segundo anticuerpo biotilado, inmunoglobulina anti-anticuerpos de conejo, ratón y cabra (Cytoscan Biotinylated Link, Cell Marque, USA), se incubó durante 30 min y se lavó con PBS (2x5). Se colocó estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Cytoscan TM HRP Detection System, Cell Marque, USA), se incubó durante 30 min y se lavó con PBS (2x5). A continuación, se cubrió con solución cromógena diaminobencidina (DAB Substrate Kit, Cell Marque, USA), durante 15 min (bajo control de microscopio óptico), se cortó la coloración con un pasaje de agua corriente, luego se lavó con agua destilada (un pasaje), y se contrastó con hematoxilina activada por 1 min (Biopur, Argentina). Finalmente, se sumergió en agua de grifo 5 min para viraje. A las muestras se las deshidrató (usando una batería de alcoholes de graduación creciente, 1 min en alcohol

70°, y un pasaje por cada siguiente baño: dos veces en alcohol 96°, dos veces en alcohol 100° y dos veces en xilol), y se las montó con un cubreobjetos utilizando un medio de montaje sintético (Canadax®, Biopur, Argentina). El control negativo de la reacción se trató igual que las muestras, sólo que no se agregó el anticuerpo primario, en su reemplazo se utilizó PBS.

Para la determinación del RPA se utilizó la misma técnica descrita para la determinación de la expresión del RE β con la diferencia que se agregó el anticuerpo de ratón monoclonal anti-receptor de progesterona isoforma A, clon 16, NCL-L-PGR-312 (Leica Biosystems, Novocastra Lab, Newcastle, United Kingdom), dilución 1:100 (Durlej *et al.*, 2010). En todos los períodos analizados se observó inmunexpresión de RPA en el núcleo de las células miometriales y se consideró un control positivo en las experiencias de IHQ porque en el miometrio gestante, el RPA es imprescindible para disminuir la motilidad uterina que conduce a un mantenimiento de la gestación exitoso. Se utilizó miometrio de cada muestra como control positivo.

Observaciones microscópicas

Se observaron cortes histológicos correspondientes a úteros de cerdas NG y G. Cada corte se visualizó a bajo aumento (4x) y luego se realizaron microfotografías a 10x con el fin de demostrar homogeneidad de tinción y las estructuras placentarias en general. A continuación, se tomaron microfotografías a 40x, de cada estructura estudiada (epitelio luminal endometrial, glándulas, tejido conectivo y trofoblasto) de todas las muestras.

En la evaluación de la estructura se observó la continuidad del epitelio, la definición de las glándulas y núcleos del estroma en preparados con tinción de H-E.

Los resultados de la determinación de la expresión de los receptores fueron expresados en forma cualitativa, como positivos (+) o negativos (-). Se consideró inmunomarcación positiva, la observación de color marrón en los núcleos celulares, dentro de las estructuras analizadas. A fin de poder evaluar cualitativamente la expresión de los RE y RP en la interfase placentaria porcina en el período de gestación seleccionado, fueron tomadas imágenes de los resultados de la inmunohistoquímica para su posterior análisis morfológico.

Todas las muestras histológicas fueron fotografiadas con un microscopio Carl Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Alemania) equipado con una cámara digital Canon PowerShot G20 (Tokio, Japón), adquiridas con el *software* Axiovisión (AxioVision 4.8, Carl Zeiss). Todas las fotografías para el análisis de la inmunomarcación, fueron realizadas con el objetivo de 40x. A fin de describir la expresión de receptores nucleares de estrógenos y progesterona en útero no gestante, útero gestante y trofoblasto para cada preparado se extrajeron imágenes del epitelio luminal (EL) y glandular (EG) y estroma endometrial (TC) del útero materno y el trofoblasto (Tr).

RESULTADOS

Visualización de cortes histológicos de tejido uterino por H-E

Se observan en los preparados histológicos teñidos por H-E la morfología de los tejidos uterinos de cerdas NG en fase folicular (Foto 1) y cerdas G (Foto 2) en el periodo de 15-17 dg.

Foto N° 1: Microfotografía de útero de cerdas no gestantes.

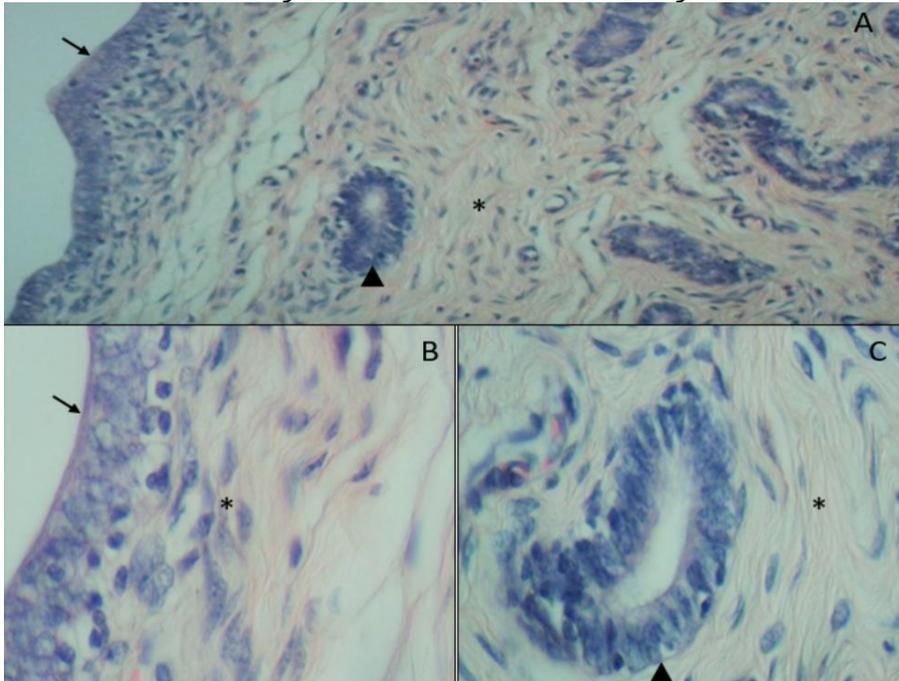


Foto N° 1: A-Útero de cerda no gestante en fase folicular. H-E; 10 x. Se visualiza EL (Flecha), EG (punta de flecha) y TC (asterisco). B- Se observa EL y TC a 40x. C-Se observa EG y TC a 40x.

Foto N° 2: Microfotografía de útero de cerdas gestantes.

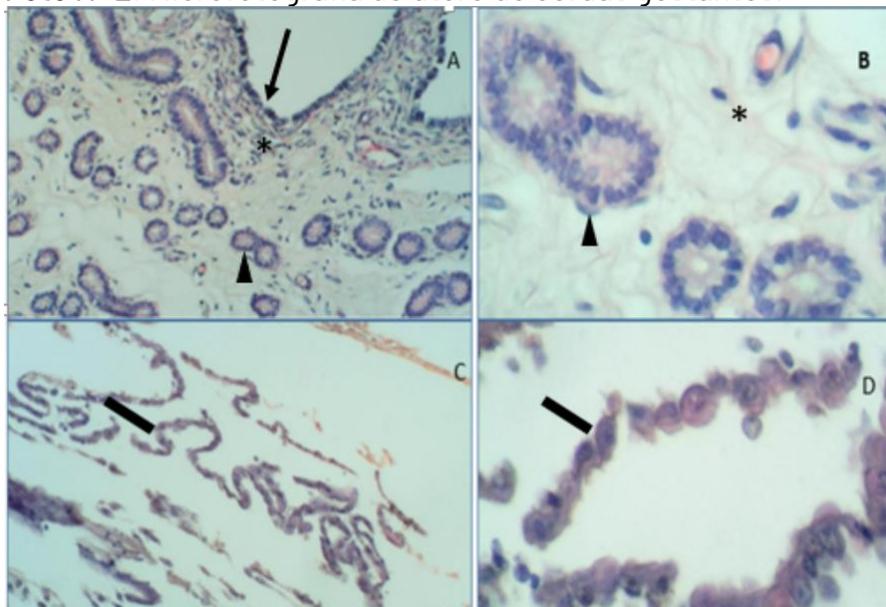


Foto N°2: A-Útero de cerdas gestantes a los 15-17 dg. H-E; 10x. Se observa EL (Flecha), EG (punta de flecha) y TC (asterisco). B-Se observa EG y TC a 40x. C-Se observa el filamento embrionario (línea llena) a 10x. D-Se observa filamento embrionario a 40x.

Al analizar estas imágenes, se observó el endometrio (Figura 1.A) revestido con un epitelio cilíndrico simple (Foto 1.B), y el estroma endometrial compuesto de tejido conectivo laxo con presencia de glándulas (Foto 1.A y 1.C). Respecto al útero gestante, la mucosa del endometrio consta de múltiples pliegues (Foto 2.A), y se observan múltiples glándulas endometriales que tienen epitelio cúbico simple con vacuolas en el

citoplasma (Foto 2.B). En el trofoblasto (Foto1.C), se observan células trofoblásticas cilíndricas y grandes (Foto 2.D).

Estudio de la expresión de los receptores en la estructura del tejido uterino

Se determinó la presencia del RE β y RPA en placentas porcinas en etapa de implantación (15 -17 dg) y úteros de cerdas no gestantes en fase folicular.

Foto N°3: Microfotografías de útero de cerdas gestantes.

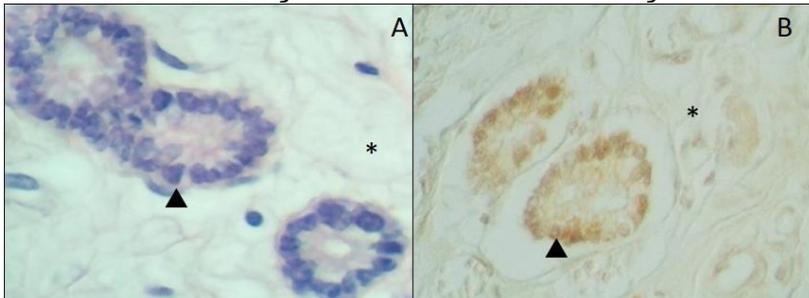


Foto N° 3: A- Útero con tinción de H-E de cerda de 15-17 dg a 40x se observa EG (punta de flecha) y TC (asterisco). B-Expresión del RE β en EG a 40x.

Foto N°4: Microfotografías de filamento embrionario

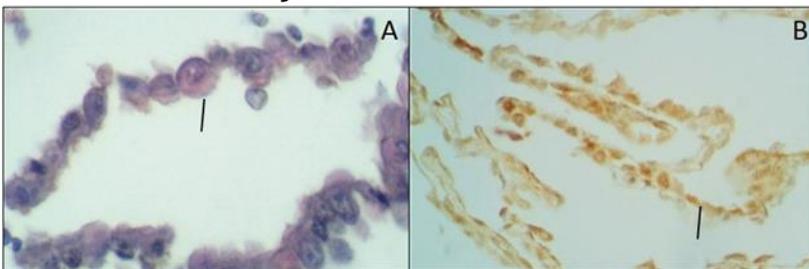


Foto N° 4: A- Tr (línea llena) de 15-17 dg con tinción de H-E a 40x. B-trofoblasto de 15-17 dg con expresión del RE β a 40x.

Se observa que el RE β se expresó en el trofoblasto a los 17 dg (Foto 4.B) y en las glándulas endometriales uterinas (Foto 3.B). Los núcleos de las células se observan de color marrón.

Foto N°5: Técnica de Inmunohistoquímica en útero de cerdas NG

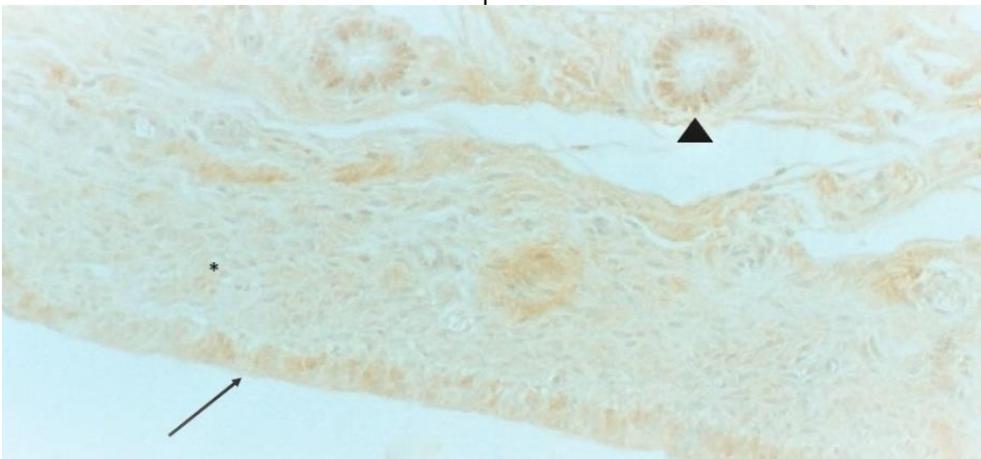


Foto N° 5: Expresión del RE β a 10x en EL (Flecha), EG (punta de flecha) y TC (asterisco)

Foto N°6: Tinción de H-E y técnica de Inmunohistoquímica en útero de cerdas NG en fase folicular

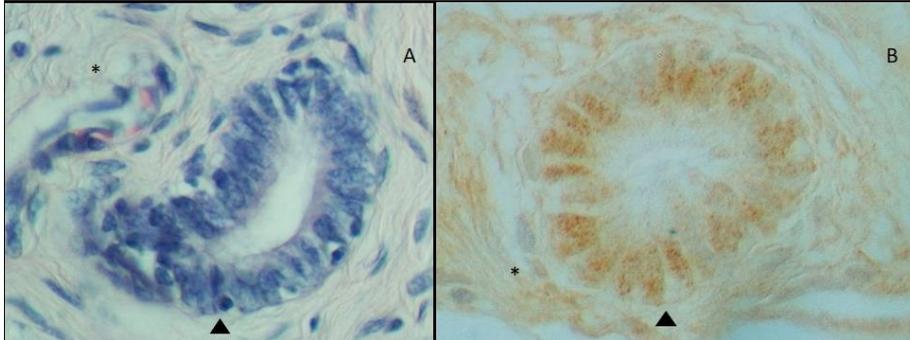


Foto N°6: A- Tinción con H-E se observa, EG (punta de flecha) y TC (asterisco). B-Expresión del REβ en EG a 40x.

En útero de cerda NG en fase folicular se observa expresión del REβ en epitelio (Foto 5), estroma (Foto 5) y glándulas uterinas (Foto 6.B). La expresión del REβ se observa en todas las estructuras del útero de la cerda NG (Foto 5).

Foto N°7: Técnica de Inmunohistoquímica en útero de cerda NG

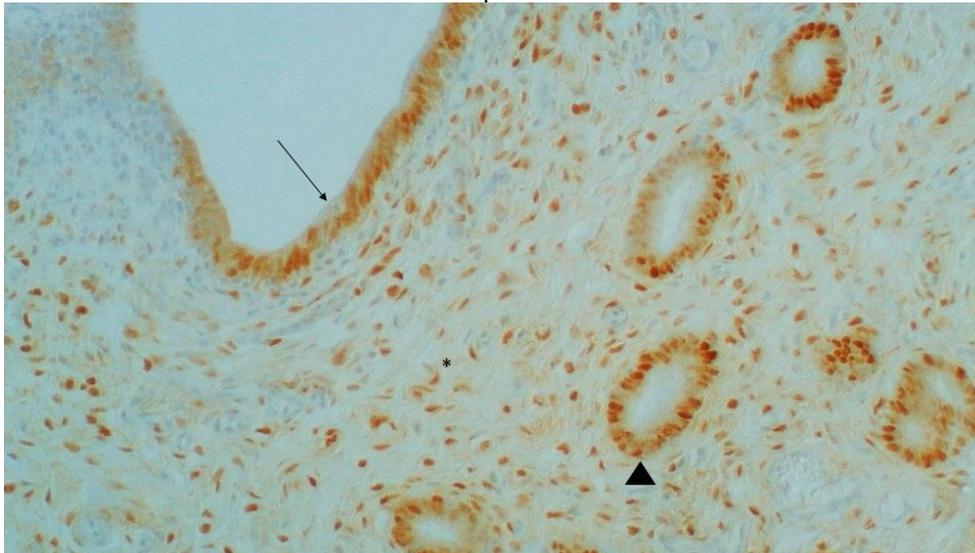


Foto N° 7: Expresión del RPA en cerdas NG en fase folicular por inmunohistoquímica. A- Expresión de RPA a 10x se observan expresión en EL (Flecha), EG (punta de flecha) y TC (asterisco)

Foto N°8: Técnica de Inmunohistoquímica en útero de cerda NG

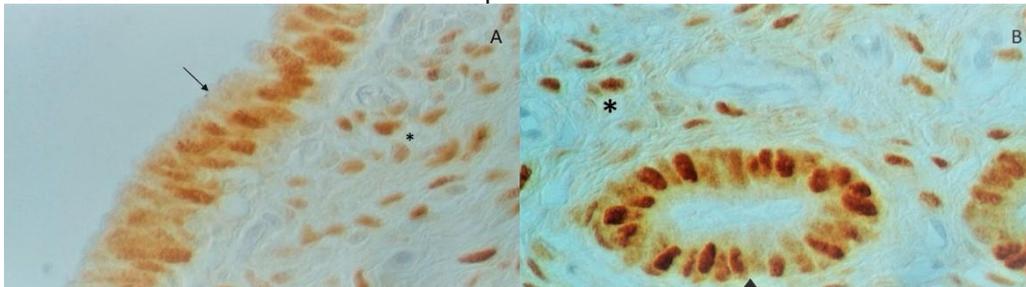


Foto N° 8: Expresión del RPA en cerdas NG en fase folicular por inmunohistoquímica A- Expresión de RPA a 40x se observan expresión en EL (Flecha) y TC (asterisco). B-Expresión del RPA en EG a 40x (punta de flecha) y TC.

Foto N°9: Técnica de Inmunohistoquímica en útero de cerda NG

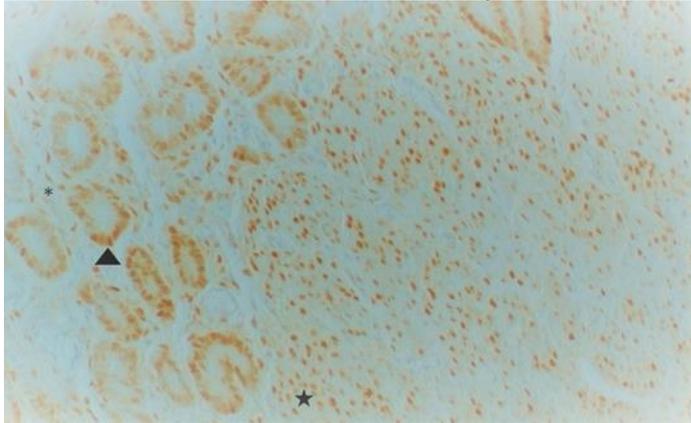


Foto N° 9: Expresión del RPA en cerdas NG en fase folicular por inmunohistoquímica. Se observa inmunomarcación de RPA en células musculares del miometrio (estrella), se usó como control positivo a 10x.

En cerdas NG en fase folicular se observa expresión del RPA en núcleos de células de EL (Foto 8.A). También se expresa en los núcleos de glándulas endometriales y células del tejido conectivo (Foto 8.B). La expresión de RPA en células musculares (Foto 9) se consideró como un control positivo. La expresión de este receptor se observa en todas las estructuras del útero de la cerda NG (Foto 7 y 9).

Foto N° 10: Tinción H-E y Técnica de Inmunohistoquímica en útero de cerda G

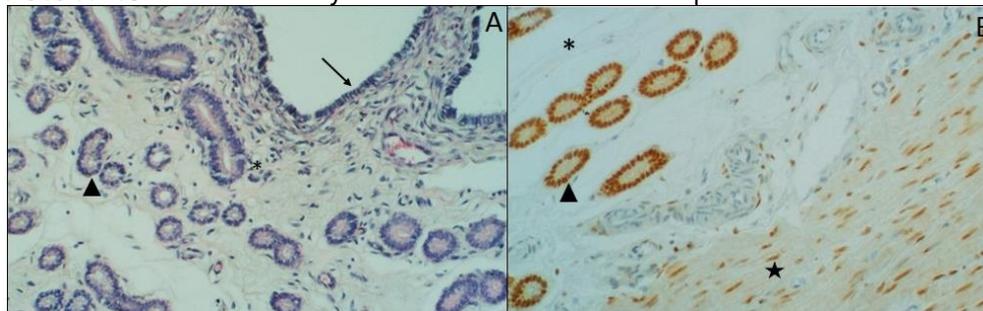


Foto N° 10: A- Tinción de H-E a 10x se observa EL (flecha), EG (punta de flecha) y TC (asterisco). B- Expresión del RPA en útero de cerda G de 15-17 dg a 10x en EG y miometrio (estrella).

Foto N°11: Tinción H-E y Técnica de Inmunohistoquímica en útero de cerda G

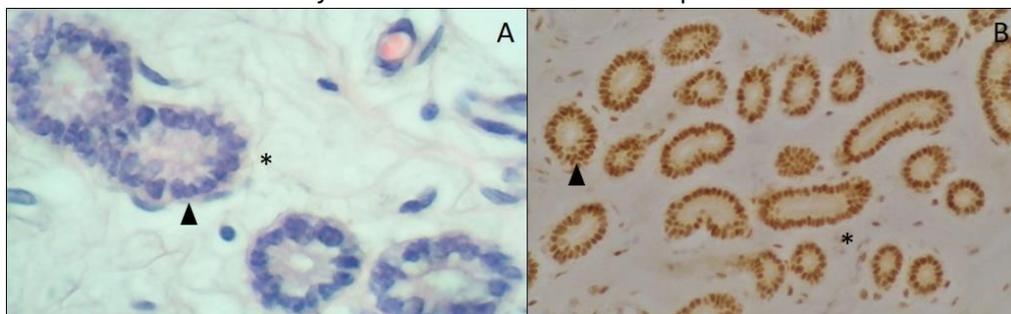


Foto N° 11: A-Tinción de H-E en útero se visualiza EG (punta de flecha) y TC (asterisco). B- Expresión de RPA en EG y TC.

Se observó la inmunoexpresión de RPA en el núcleo de las células miometriales (Foto 10.B). Se lo definió como un control positivo en las experiencias de IHQ ya que, en el

miometrio gestante, el RPA disminuye la motilidad uterina favoreciendo la gestación. En las hembras porcinas de 15-17 dg se halló expresión nuclear del RPA en epitelio glandular y tejido conectivo (Foto 11. B).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En acuerdo con Santos Vidal (2017), la técnica histológica convencional, con tinción de hematoxilina-eosina permite una descripción de las características del tejido uterino no gestante y gestante y, además, la evaluación de tejidos que no estén cursando ninguna patología subclínica. Mientras que la técnica de inmunohistoquímica permite localizar las moléculas que se propongan a analizar; en el caso particular de este trabajo los receptores nucleares esteroideos. La importancia de la identificación de la localización del receptor se basa en que permite analizar el establecimiento de las condiciones más relevantes para una implantación exitosa y qué estructuras participan en ello.

La progesterona y los estrógenos son hormonas que regulan los eventos moleculares que ocurren en un útero receptivo, ya que favorecen la fijación del embrión y aumentan la tasa de sobrevivencia prenatal en la especie porcina. Por lo tanto, la observación de la expresión de estas moléculas en el presente artículo técnico permitió conocer la ubicación de los receptores en diferentes tejidos uterinos endometriales y trofoblástico. Se identificó la expresión de los receptores en los tejidos blanco por acción de ligando, quienes, a través de su interacción, promueven respuestas celulares específicas permitiendo así una correcta implantación. Se sabe que las hormonas esteroideas y sus receptores están involucradas en eventos sucesivos como la elongación del *conceptus*, la implantación y la placentación a través de un diálogo molecular espacio - temporal específico y promueven la remodelación del endometrio y el trofoblasto (Vigliarcho M.,2020).

Respecto a la P4, ésta ejercería su acción sobre los RPA de glándulas y tejido conectivo del útero gestante. Mientras que los Es, además de regular la expresión de sus propios receptores REβ encontrados en trofoblasto, serían necesarios para el reconocimiento materno fetal durante la preñez temprana, como fue reportado por Bazer y Johnson (2014). Se sabe que P4 es la hormona de la gestación y que los Es son indispensables en el reconocimiento materno-fetal (Wooding and Burton, 2008). Sin embargo, no hemos encontrado expresión RPA en el epitelio uterino durante la implantación, esto sugiere que el útero receptivo permitiría la expresión de moléculas que intervienen en el anclaje y posterior adhesión e implantación de los *conceptus*.

En este período de gestación analizado se observó inmunomarcación nuclear del REβ en glándulas uterinas y células trofoblásticas, RPA en epitelio glandular y tejido conectivo. Respecto a cerdas NG se halló expresión de REβ y RPA en epitelio, estroma y glándulas del endometrio uterino. Estos resultados coinciden con Ka *et al* (2018) que encontraron expresión de REβ en epitelio luminal y glandular en el endometrio durante el ciclo estral y en la preñez en el trofoectodermo del *conceptus* sobre el día 12 de gestación, pero la función y la regulación no está completamente dilucidada en cerdos. Según los resultados obtenidos y en base a lo analizado para REβ en la especie porcina por Koehler *et al.* (2005) y los efectos de RPA en el ratón por Mulac-Jericevic and Conneely (2004), sugerimos que los Es fetales interactúan con los REβ en el trofoblasto y la P4 se liga a los RPA en el tejido conectivo endometrial para modular la expresión de moléculas de señalización y sus receptores relacionados con la implantación, el mantenimiento de la gestación y con la formación de la placenta materna y fetal.

En base a este estudio, proponemos que sería interesante analizar la presencia de otros receptores de estas hormonas como receptor estrógeno α y receptor de progesterona isoforma B durante la implantación, como también el efecto de su positividad o negatividad sobre la presencia de ciertas moléculas, como las moléculas de adhesión, factores de crecimiento y/o interleuquinas; ya que sus acciones son claves en la regulación de la correcta placentación durante este período.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barrales H., Cappuccio J., Williams S. Libro *"Compendio de clínica y sanidad de los cerdos: de la granja al laboratorio"* Capítulo 7: *"Diagnóstico de fallas reproductivas en producción porcina"*. 2004; p.187-203.
- Bazer F. W., Johnson GA. *Pig blastocyst-uterine interactions*. Differentiation. 2014; p. 87, 52-65.
- Betancourt Alonso M. A., Flores-Pérez F., Rosas-Velasco C., Pérez-Martínez M. *Papel de las citoquinas en la implantación embrionaria en mamíferos domésticos*. Artículo de revisión. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 2006.
- Braun R. *"Producción porcina el complejo educativo productivo de la actividad en Argentina"*. 2015; p.21-77.
- Celani M., Fernández Surribas J., Von Lawzewitsch, I. *Lecciones de Histología Veterinaria*. Volumen 1. Ed: Hemisferio Sur. Buenos Aires. Argentina. 1984; p. 36.
- Durlej M., Tabarowski Z., Slomcynska M. *Immunohistochemical study on differential distribution of progesterone receptor A and progesterone receptor B within the porcine ovary*. Anim Reprod Sci. 2010; p.121: 167-173.
- Freking B. A, Leymaster K. A, Vallet J. L., Christenson R. K. *Number of fetuses and conceptus growth throughout gestation in lines of pigs selected for ovulation rate or uterine capacity*. J Anim Sci. 2007; 85: 2093-2103.
- Hafez E., Hafez B. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ma Edición, Ed McGraw-Hill, México. 2003; p. 85.
- Iglesias D., Ghazen G. *"Estudios socioeconómicos de los sistemas agroalimentarios y agroindustriales: Análisis de la cadena de la carne porcina en Argentina"* Revista boletín N°12 Edición INTA Anguil y Balcarce. 2013; Cap. II.
- Ka H, Seo H, Choi Y, Yoo I, Han J. *Endometrial response to conceptus-derived estrogen and interleukin- β at the time of implantation in pigs*. J Anim Sci Biotechnol. 2018; 9:44.
- Koehler K. F., Helguero L.A., Haldosen L.A., Warner M., Gustafsson J.A. *Reflections on the Discovery and Significance of Estrogen Receptor β* . Endocr Rev. 2005; 26(3):465-478.
- Luna L.G. *Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces*. Institute of Pathology. McGraw-Hill Book Company. 1968.
- Mulac-Jericevic B., Conneely, O.M. *Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors*. *Reproduction*. 2004; 128: 139-146.
- Murray R., Bender D., Botham K., Kennelly P., Rodwell V., Weil A. Libro Harper Bioquímica Ilustrada Edición 28 .1996; p.406-444.
- Santos Vidal S. *Tinción de Hematoxilina-eosina* Trabajo final de Master Universitario en Ciencia y Tecnología Química Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Educación a Distancia. 2017
- Tang Y.Q., Li C., Sun X. J., Liu Y., Wang X. T., Guo Y.B. *Fructus Ligustris Lucidi modulates estrogen receptor expression with no uterotrophic effect in ovariectomized rats*. BMC Complement Altern Med. [internet]. 2018; 18 (1): 118. Disponible en: PubMed central.
- Velez, C. *Integrinas y su regulación por el Sistema immune durante la gestación porcina*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 2017.
- Vigliarchio M. *Determinación de receptores para estrógenos y progesterona en tejidos placentarios fetales y maternos porcinos, y su relación con la concentración sérica y tisular*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 2020.
- Wooding P., Burton G. *Comparative Placentation: Structures, Functions and Evolution*. Cambridge, United Kingdom, Ed. Springer. 2008; p. 105-114.

SECCIÓN ARTÍCULOS TÉCNICOS

Modelo experimental para evaluar compuestos gastroprotectores en ratones sometidos a estrés y tratados con indometacina
Toso, F.; Ardoino, S.M.; Hartfiel, L.E. y Benitez, V.P.
Pp. 28-34

Modelo experimental para evaluar compuestos gastroprotectores en ratones sometidos a estrés y tratados con indometacina

Toso, F.¹; Ardoino, S.M.¹; Hartfiel, L.E.¹ y Benitez, V.P.¹

¹Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa. Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF). Calle 5 esquina 116, General Pico (6360) La Pampa. Calle 116 y 5. ftoso@vet.unlpam.edu.ar

RESUMEN

Se describe un modelo experimental para evaluar el efecto gastroprotector de extractos vegetales en ratones sometidos a estrés y administrados con antiinflamatorios no esteroides (AINEs). Este modelo experimental reproduce casos clínicos en los cuales los animales que sufren estrés por dolor durante procesos inflamatorios, traumáticos o quirúrgicos desarrollan lesiones gástricas que se agravan cuando son medicados con AINEs con el objetivo de disminuir la inflamación y el dolor. Frecuentemente se administran antisecretores para prevenir las lesiones en la mucosa gástrica. Para investigar nuevos fármacos gastroprotectores, con mayor eficacia y menores efectos colaterales en estos casos clínicos, se requiere de un modelo experimental que lo reproduzca. Para lograr este objetivo, en este trabajo se describe un protocolo que combina dos reconocidos modelos experimentales en ratones. Uno de ellos induce úlceras por estrés provocado por hipotermia e inmovilización y el otro produce daño gástrico por administración de indometacina. La combinación de ambos métodos en un solo ensayo permite observar que los animales sometidos a estrés y tratados con indometacina sufren mayor daño gástrico que los sometidos a estrés o administrados con indometacina respectivamente. Considerando que los mecanismos involucrados en el daño gástrico producido por estrés son distintos a los provocados por AINEs, el protocolo propuesto es adecuado para seleccionar drogas que protejan la mucosa gástrica en animales que sufren estrés por dolor y que están siendo tratados con AINEs.

Palabras clave: Gastroprotector, AINEs, Antiulcerogénico, Modelo experimental Extractos Vegetales

Experimental model to evaluate gastroprotective compounds in mice subjected to stress and treated with indomethacin

ABSTRACT

An experimental model is described to evaluate the gastroprotective effect of plant extracts in mice subjected to stress and administered with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). This experimental model reproduces clinical cases in

which animals that undergo pain stress during inflammatory, traumatic, or surgical processes develop gastric lesions that are aggravated when they are medicated with NSAIDs in order to reduce inflammation and pain. Antisecretors are frequently administered to prevent gastric mucosal injury. To investigate new gastroprotective drugs, with greater efficacy and fewer side effects in these clinical cases, an experimental model is required to reproduce it. To achieve this goal, this work describes a protocol that combines two well-known experimental models in mice. One of them induces stress ulcers caused by hypothermia and immobilization and the other produces gastric damage by administration of indomethacin. The combination of both methods in a single test makes it possible to observe that animals subjected to stress and treated with indomethacin suffer greater gastric damage than those subjected to stress or administered with indomethacin respectively. Considering that the mechanisms involved in gastric damage caused by stress are different from those caused by NSAIDs, the proposed protocol is adequate to select drugs that protect the gastric mucosa in animals that suffer stress due to pain and are being treated with NSAIDs.

Keywords: Gastroprotective, NSAIDs, Antiulcerogenic, Experimental model Vegetable extracts

INTRODUCCIÓN

Las situaciones de estrés, como las que ocurren en animales politraumatizados, intervenidos quirúrgicamente o que cursan enfermedades inflamatorias se asocian a ulceración y hemorragia gastroduodenal en un contexto patogénico que se agrava con la administración de antiinflamatorios no esteroides (AINEs).

El estrés y los AINEs, aunque por distintos mecanismos, debilitan la barrera mucosa gástrica permitiendo que el ácido lesione la mucosa. Estos cuadros han sido estudiados en humanos hospitalizados. En estos pacientes se aplican protocolos terapéuticos que incluyen la administración profiláctica de drogas antisecretoras para prevenir las úlceras por estrés y evitar hemorragias digestivas altas (Betancur Jiménez, 2004) al mismo tiempo que se están empleando AINEs para prevenir o tratar estados febriles, reducir la inflamación y para proporcionar analgesia (Toms et al., 2009).

La administración rutinaria de drogas antisecretoras es discutida en medicina humana (Villatoro Martínez et al., 2012), pero en medicina veterinaria se justifica por la dificultad que presenta diagnosticar lesiones gástricas que cursan como gastritis asintomáticas, que según algunos estudios llega a un 70 % de los casos (Hernández et al., 2007). Algunos efectos colaterales de estas drogas se expresan a largo plazo, mientras que otros, como por ejemplo las infecciones entéricas, son un riesgo a corto plazo (Landeira-Fernandez, 2004). Estos efectos indeseables fundamentan la investigación de alternativas terapéuticas de nuevos gastroprotectores y los ensayos con extractos vegetales son los más investigados.

Teniendo en cuenta lo expuesto, para evaluar la eficacia de nuevos compuestos con posibles efectos gastroprotectores en estos casos clínicos, se describe un novedoso protocolo que combina dos conocidos modelos experimentales en ratones. Uno de ellos induce úlceras por estrés (ME) provocado por hipotermia e inmovilización y el otro causa daño gástrico por administración de indometacina (MI). Los mecanismos fisiopatológicos que provocan estos modelos experimentales son diferentes, aunque

finalmente ambos determinan un desequilibrio en la barrera mucosa gástrica. El ME, reduce la circulación sanguínea mucosal disminuyendo la producción de mucus y debilitando la barrera mucosa gástrica. Al mismo tiempo se produce un aumento de la motilidad gástrica que provoca la formación de múltiples úlceras que se ubican con preferencia en las crestas de los pliegues gástricos, más expuestas al efecto erosivo mecánico (Murakami et al., 1985). El desprendimiento de la barrera mucosa permite que el ácido y la pepsina ataquen la mucosa gástrica formando úlceras de distinta gravedad (Jacobson, 1992).

El modelo MI induce la formación de múltiples úlceras en los estómagos de ratas y ratones, con aspecto macroscópico similar a las que produce el modelo ME. Pero el debilitamiento de la barrera mucosa gástrica tiene su origen en el efecto inhibitorio de los AINEs sobre la síntesis de prostaglandinas (PG). Las PG producen un efecto citoprotector sobre la mucosa gástrica al aumentar, la secreción de mucus, la secreción de bicarbonato, el flujo sanguíneo y la restauración epitelial. Por lo tanto, la inhibición de PG altera los mecanismos de protección y permite que la pepsina y el ácido clorhídrico ataquen a la mucosa. La administración de indometacina en animales de experimentación también provoca un aumento de la motilidad gástrica produciendo un efecto erosivo mecánico. Este efecto determina la presencia de múltiples úlceras ubicadas en las crestas de los pliegues gástricos del mismo modo que las producidas por estrés (Takeuchi et al., 1999).

Es frecuente que junto con los AINEs se administren inhibidores de la secreción gástrica como antagonistas del receptor de la H₂ y de la bomba de protones, éstos producen una mejora al aumentar el pH gástrico retrasando la digestión y la formación de úlceras en la mucosa gástrica. Pero no aumentan los factores citoprotectores que contribuirían a prevenir el daño de la mucosa gástrica al reforzar la barrera mucosa gástrica (Betancur Jiménez, 2004).

El modelo de inducción de úlceras por estrés e indometacina (MEI) que se propone y describe en esta publicación, fue utilizado hace dos décadas en ensayos para evaluar el efecto gastroprotector de extractos vegetales obtenidos del Banco de Extractos Vegetales (BEV) en el Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos (CIDEF) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa (Toso y Skliar, 2000). No se encontraron antecedentes de otros autores que hayan empleado el Modelo MEI. Sin embargo se debe mencionar que Toso y Skliar, (2000) asociaron ambos métodos con otros propósitos. En primer lugar, el objetivo fue demostrar que la asociación de los dos modelos lograba inducir mayor daño gástrico cuando se emplean al mismo tiempo, y en segundo lugar, obtener información sobre los posibles mecanismos de acción implicados en el efecto gastroprotector de los extractos metanólicos y clorofórmicos obtenidos de *Centaurea solstitialis*. Es decir, para determinar si éstos mecanismos gastroprotectores estaban asociados o no a las prostaglandinas. En estos trabajos iniciales, los autores concluyeron que algunos extractos mostraban distinta eficacia para prevenir la formación de úlceras gástricas, dependiendo si eran desafiados empleando el método ME o MI. En ese momento, no se pensó que el Modelo MEI podría emplearse para probar nuevas drogas, más eficaces y con menores efectos colaterales que inhiban o atenúen el daño gástrico provocado por el estrés en animales que sufren dolor traumático y que se los administra con AINEs para controlar la inflamación, el dolor y la fiebre.

Los numerosos ensayos realizados en el CIDEF han permitido desarrollar un protocolo confiable que se describe en este trabajo con el objetivo de ponerlo a disposición de otros investigadores. Cabe destacar que los estudios mencionados fueron previamente evaluados por el Comité Científico, en algunos casos y por el CICUAL de la FCV – UNLPam, en otros. Con lo cual queda explícito que los animales involucrados en estos ensayos fueron tratados bajo protocolos avalados por estos organismos. En este Centro de Investigación se estudian las propiedades farmacológicas de extractos vegetales obtenidos de plantas nativas y naturalizadas recolectadas en la Provincia de La Pampa. Aunque el protocolo mencione como drogas a ensayar a extractos vegetales de administración oral, el protocolo, eventualmente, puede ser utilizado para probar otras drogas de origen sintético o semisintético que se administren por ésta u otra vía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Protocolo

Extractos vegetales: considerando que el objetivo de esta publicación es describir el método MEI se omitirán los detalles de la preparación y dosis empleadas de los extractos, los cuales han sido descritos por Steibel et al. (2007).

Los extractos se diluyen hasta un volumen de 0,5 ml con una solución de Carboximetilcelulosa (Ex) y se administran con ayuda de una sonda gástrica.

Animales de experimentación: se utilizan ratones *Mus musculus* de 28 – 30 g de peso de ambos sexos. Los animales se aclimatan durante 3 días con períodos de luz y oscuridad de 12 h disponiendo de alimento y agua *ad libitum*. 12 h previas al ensayo, los animales se trasladan a jaulas provistas de rejillas para evitar la coprofagia y se someten a ayuno de alimentos sólidos con libre acceso al agua.

Modelo Experimental: para ensayar un solo extracto se utiliza el procedimiento siguiente, aunque pueden agregarse en el mismo ensayo tantos Grupos Tratados como extractos u otras drogas se deseen probar.

Se forman al azar cuatro grupos de cinco ratones cada uno. El Grupo Control (GCEx) se administra con una dosis de 0,5 ml del excipiente (Ex) empleado para diluir el extracto por vía oral (VO) con ayuda de una sonda gástrica, el Grupo Control tratado con indometacina (GCI) se administra con una dosis de 5 mg/kg de indometacina vía subcutánea (SC) disuelta en un volumen total de 0,2 ml con una solución de bicarbonato de sodio al 4 % (IEx), el Grupo Tratado con el Extracto Vegetal (GTE) recibe una dosis VO de 0,5 ml del Extracto a ensayar disuelto hasta un volumen de 0,5 ml con el Ex y el Grupo Tratado con el Extracto más indometacina (GTEI) una dosis SC de 0,2 ml de indometacina y una dosis VO de 0,5 ml de Extracto.

La administración SC de indometacina y del excipiente empleado para diluirla en los grupos que corresponda, se realiza al iniciar el ensayo y transcurridos 30 minutos se procede a realizar el resto del esquema de administración VO como se indica en el Cuadro 1. Todos los grupos son sometidos a estrés utilizando el modelo ME.

Cuadro 1: Esquema de administración de drogas utilizado en el Método MEI

Drogas Grupos	Indometacina	Excipiente empleado para diluir la indometacina	Extracto vegetal	Excipiente empleado para diluir los extractos
GCEx		0		X
GCI	0			X
GTE		0	X	
GTEI	0		X	

Ref.: Las drogas marcadas con "0" fueron administradas vía SC al inicio del ensayo, las marcadas con "X" se administraron VO transcurridos 30 minutos después. GCEx: Grupo control administrado con el excipiente utilizado para diluir el Extracto vegetal (Ex) y con el excipiente empleado para diluir la indometacina (IEx). GCI: Grupo Control Indometacina administrado VO con el Ex y vía SC con idometacina. GTE: Grupo tratado con el Extracto administrado vía SC con el IEx y VO con el Extracto. GTEI; Grupo Tratado con Indometacina vía SC y VO con el extracto.

Inmediatamente después de completar el esquema de administración de drogas, todos los grupos de ratones se someten a estrés por hipotermia e inmovilización (Toso y Skliar, 2000). Los animales se colocan en jaulas de inmovilización y se sumergen en agua hasta el cartílago xifoides. La temperatura del agua debe regularse a $22 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ durante 4,5 h. Los ratones se sacrifican con CO₂, se extraen los estómagos e insuflan con solución fisiológica y se colocan en formol al 10 % durante 2 h. Los estómagos se abren por la curvatura mayor, se lavan cuidadosamente y fotografían para medir las úlceras gástricas.

RESULTADOS

Teniendo en cuenta que este artículo consiste en la descripción de un modelo experimental, no se presenta resultados, sino la forma de obtenerlos y cómo evaluarlos. *Registro y análisis de datos:* el daño gástrico se mide utilizando el programa de manejo de imágenes Scion Image Software (accesible en http://www.scioncorp.com/pages/scion_image_windows.htm). El analizador de imágenes permite circundar las úlceras gástricas convirtiendo píxeles en mm para obtener el área de las úlceras de cada estómago en mm². El porcentaje de inhibición de úlceras en los Grupos Tratados se calculó utilizando la fórmula $[(\text{AUGrupo Control o Testigo} - \text{AUGrupo Tratado}) / \text{AUGrupo Control o Testigo}] \times 100$ donde AU es el Área Ulcerada expresada en mm².

Evaluación de resultados

Para evaluar los resultados utilizando el modelo MEI, se compara el GCEx con respecto al GCI y el GCI con respecto al GCE y al GCEI. Para comparar los diferentes grupos se utilizó la prueba ANOVA y el Test Tukey para las comparaciones entre grupos considerando significativo un $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

El modelo MEI descrito en este trabajo emplea al mismo tiempo dos métodos conocidos para inducir úlceras. El propósito es reproducir los efectos de los procesos fisiopatológicos que inducen daño gástrico en situaciones de estrés, efecto que se muestra agravado en cuadros clínicos que requieren la administración de AINEs para

tratar la inflamación, el dolor y la fiebre (Betancur Jiménez, 2004; Toms, et al., 2009). En el modelo MEI propuesto se emplean dos grupos control de ratones, GCEX y GCI, para comprobar que efectivamente se indujo daño gástrico por estrés en el modelo ME y por acción de la indometacina en el modelo MI respectivamente. Si el modelo funcionó bien, debe esperarse que el GEI muestre mayor área ulcerada que cualquiera de los GCEX y GCI respectivamente. El mayor daño de la mucosa, que se estima por el área ulcerada de cada grupo, se debe a que los ratones previamente administrados con indometacina, como consecuencia de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, tienen disminuidos los factores citoprotectores. A esta condición se le suman los efectos del estrés que también disminuyen la secreción de mucus y bicarbonato. El aumento de la motilidad gástrica, presente en ambos modelos (Murakami et al., 1985; Takeuchi et al., 1999) ejerce un efecto erosivo desprendiendo la barrera mucosa mostrando mayor número de úlceras, las cuales también pueden tener mayor tamaño. Esta observación macroscópica puede comprobarse estadísticamente comparando las áreas ulceradas de los GCEX con respecto al GCI. Se espera que el GCI tenga un área ulcerada significativamente mayor que el GCEX.

Al comparar el GCI con respecto al GCE y al GCEI permite evaluar la eficacia de drogas gastroprotectoras en úlceras producidas en animales sometidos a estrés y también en animales sometidos a estrés y administrados con AINEs. De esta manera es posible obtener datos preliminares sobre los posibles mecanismos de acción implicados en la gastroprotección. Trabajos recientes llevados a cabo en el CIDEF empleando el Modelo MEI permitieron identificar especies vegetales con efecto inhibitorio sobre la formación de úlceras con el método ME, mientras que no evidenciaron eficacia en el método MI y viceversa. Esto llevó a pensar que algunos extractos necesitan la presencia de PG para actuar, mientras que otros, ejercerían un efecto protector directo sobre la mucosa gástrica o inhibiendo la motilidad y evitando el efecto erosivo mecánico (Toso, et al., 2019; Toso, et al., 2020).

CONCLUSIONES

Considerando que los mecanismos fisiopatológicos que inducen las lesiones gástricas en ambos modelos son distintos, la combinación de los dos métodos, permite en un solo ensayo evaluar el potencial uso de extractos vegetales, o eventualmente de otras drogas, en cuadros clínicos que cursan animales sometidos a estrés y tratados con AINEs.

El modelo MEI permite obtener datos preliminares sobre los posibles mecanismos de acción implicados en la gastroprotección.

El modelo MEI reduce el número de animales de experimentación, el tiempo de los ensayos y los costos operativos. Permitiendo evaluar varias drogas al mismo tiempo en un solo ensayo.

BIBLIOGRAFIA

- Betancur Jiménez, J. (2004). *Profilaxis de sangrado digestivo*. Revisión bibliográfica. Rev Colomb Cir. 19 (3): 168-173
- Hernández C.A., Gallón G., Restrepo L.F. (2007). *Análisis de biopsias gástricas endoscópicas en caninos*. Rev Col Cienc Pec. 20:250-259
- Jacobson, E.D. (1992). *Circulatory mechanisms of gastric mucosal damage and protection*. *Gastroenterology*. 102: 1788 - 1800

- Landeira-Fernandez J. (2004). *Analysis of the cold-water restraint procedure in gastric ulceration and body temperatura*. Physiology & Behavior 82: 827-833
- Murakami, M.; Lam, S.K.; Inada, M. (1985). *Pathophysiology and pathogenesis of acute gastric mucosal lesions after hypothermic restraint stress in rats*. Gastroenterology. 88: 660 – 665
- Steibel, P.E.; Troini, H.O.; Oriani, D.S.; Ardoino, S.M.; Toribio, M.S.; Boeris, M.A.; Toso, R.E. (2007). *Banco de extractos vegetales de plantas nativas y naturalizadas de la provincia de la pampa*. Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromaticas Vol. 6 (5)
- Takeuchi, K.; Suzuki, K.; Araki, H.; Mizoguchi, H.; Sugamoto, S. (1999). *Roles of endogenous prostaglandins and nitric oxide in gastroduodenal ulcerogenic responses induced in rats by hypothermic stress*. J. Physiol. 93: 423 – 431
- Toms, L.; Derry, S.; Moore, R.A.; McQuay, H.J. (2009). *Single dose oral paracetamol (acetaminophen) with codeine for postoperative pain in adults*. Cochrane Database Syst Rev. doi: 10.1002/14651858.CD001547.pub2
- Toso, F.; Toso, R.E.; Lara, M.L.; Marrón, Y.M.; Mondino, M.A. (2019). *Actividad gastroprotectora de Equisetum giganteum L. n.v. cola de caballo y Cortaderia selloana (Schult & Schult. f.) n.v. cortadera en ratones sometidos a estrés e indometacina*. Ciencia Veterinaria 21(1): 43 : 52
- Toso, F.; Ardoino, S.M.; Harfiel, L.E.; Herpsommer, M.E.; Alvarez, H.L.; Benitez, V.P.; Toso, R.E. (2020). *Evaluación de la actividad antiulcerogénica de Atriplex undulata D. Dietr. sobre estómagos de ratones bajo estrés y administrados con indometacina*. Vol. 22, Núm. 1: 13 : 22
- Toso, R.E.; Skliar M.I. (2000). *Efecto de la indometacina sobre la citoprotección de extractos de Centaurea solstitialis contra úlceras gástricas inducidas por estrés en ratones*. Ciencia Veterinaria Vol 2 (1): 16 – 20
- Villatoro Martínez, A.; Carrasco Nieva, M.; Mactzil Sánchez García, T. (2012). *Uso inapropiado de la terapia antisecretora gástrica en Urgencias*. Archivos de Medicina de Urgencia de México. 4 (1): 6-12

SECCIÓN ARTÍCULOS TÉCNICOS

Aplicación de tecnologías en un rodeo de cría: inseminación artificial a tiempo fijo y destete precoz en la zona del caldenal
Tobal, C.F.; Ferrán, A. M.; Moralejo, R.¹; Peratta, D.; Halac, J.M.; Hecker F.; Lamela. P. y Sierro, M.
Pp. 37-43

Aplicación de tecnologías en un rodeo de cría: inseminación artificial a tiempo fijo y destete precoz en la zona del caldenal

Tobal, C.F.¹; Ferrán, A. M.¹; Moralejo, R.¹; Peratta, D.¹; Halac, J.M.¹; Hecker F.¹; Lamela. P.¹ y Sierro, M.¹

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam. General Pico, La Pampa.
claudiotobal71@gmail.com

RESUMEN

La cría vacuna constituye una actividad de importancia económica y social en la provincia de la Pampa, desarrollada fundamentalmente sobre pastizales naturales, con limitaciones climáticas y edáficas que dificultan la producción. Con el objetivo de mejorar los índices reproductivos se implementó en un establecimiento ubicado en el departamento Toay, provincia de La Pampa, Argentina, un servicio que consistió en un tratamiento de sincronización de celo con inseminación a tiempo fijo y repaso con monta natural (IATF + T) en dos momentos de servicios. Se utilizó un rodeo de 180 vacas de razas británicas y sus cruas durante 3 años. El primer protocolo de inducción de celo y ovulación se realizó en vacas cabeza de parición con un mínimo de 40 días posparto mediante un dispositivo intra vaginal de progesterona (DIB) en el día 0 y una dosis de benzoato de estradiol (BE). El día 7, junto con el retiro del DIB, se aplicó una dosis de prostaglandina (PG) y una dosis de cipionato de estradiol (CI), el día 9 se realizó la IATF. Posteriormente ingresaron los toros (3%) para continuar en servicio natural hasta completar el período de 90 días de servicio. A las vacas restantes se realizó el mismo tratamiento 35 días posteriores a la primera IATF. El índice de preñez y destete incrementaron en un 38 y 31 % respectivamente, aumento el número de partos en el primer mes en 60 % y redujo en un 36% las pariciones en el último mes. Se concluyó que el sistema propuesto permite mejorar la eficiencia reproductiva de los rodeos en zona de cría con pastizales naturales y sostenerlas en el tiempo a pesar de las diferencias en el régimen pluviométrico anual.

Palabras claves: Cría, Manejo reproductivo, anestro posparto, IATF

Implementation of technologies in a breeding herd: fixed time artificial insemination and early weaning at the caldenal zone

ABSTRACT

Cow-calf operation is an important economic and social activity in La Pampa, Argentina, carried out mainly on natural grasslands with climatic and edaphic limitations that impair optimal performance. With the objective of improving reproductive results, an

experiment consisting of two heat synchronization treatments and fixed time artificial insemination (FTAI) plus natural mating (IATF + T), at a ranch located in Toay, La Pampa, Argentina. A herd of British-bred cows (n= 180) was treated for 3 years. The first heat and ovulation induction protocol used for FTAI was performed only in cows with at least 40 d postpartum, consisting of an intra vaginal progesterone device (Dib) on day 0 and a dose of estradiol benzoate (BE). On day 7, along with the removal of the progesterone device, a dose of prostaglandin (PG) and a dose of estradiol cypionate (Ci) were applied, ending on day 9 with the FTAI. Finally, bulls (3/100 cows) were introduced to complete a natural 90-d service period. To the remaining cows the same treatment was applied 35 d after the first FTAI. The rate of pregnancy and weaning increased a 38% and 31% respectively, the number of births at the first month increased a 60% and they decreased a 36% in the last month. It was concluded that the proposed system improves reproductive efficiency in cow calf system based on natural pastures and sustaining them over time, despite the differences in the annual rainfall regime.

Keywords: Breed, Reproductive management, anestrus postpartum, IATF

INTRODUCCIÓN

La cría vacuna constituye una actividad de importancia económica y social en la provincia de la Pampa, Argentina, desarrollada principalmente en zonas marginales con pastizales naturales y con limitaciones climáticas (Frank et al., 1998; Adema et al., 2001). En las últimas décadas el índice de destete de la provincia osciló entre un 60 a 62% (Anuario, 2016), estando por debajo de la media nacional, como consecuencia de la variabilidad en la productividad forrajera de los pastizales nativos.

El criador tiene como objetivo lograr un ternero por vaca por año como máxima eficiencia reproductiva. Para alcanzar este objetivo, durante la gestación (280 días) y los vientres deben aumentar sus reservas energéticas, pues tendrá solo 85 días para concebir nuevamente. De aquí que los servicios estacionados no debieran ser superior a 90 días de servicio. A este tiempo hay que descontar el período de recuperación del tracto reproductivo, que en condiciones pastoriles puede ser de entre 40 a 60 días y considerando que la duración promedio del ciclo estral es de $21 \pm$ días, cada vaca en el mejor de los casos tendrá 50 días para concebir, lo que significa de 2 a 3 oportunidades de servicio. En situaciones donde no es posible aumentar las reservas energéticas corporales durante el parto los puerperios son más prolongados, se acorta el período para concebir y en el peor de los casos puede atravesar todo el servicio en estado de anestro, reduciendo la tasa de preñez y la eficiencia reproductiva. La cría en La Pampa Arg. por lo general, se desarrolla en zonas áridas y semiáridas con pastizales naturales de bajo valor nutricional, y escasas precipitaciones. Estas limitaciones hacen que la zona tenga una mayor variabilidad interanual en la producción de MS y menor productividad potencial (Adema et al., 1995). La composición y la producción de los pastizales naturales son muy variables de acuerdo a la zona y a la época del año en promedio tienen una tasa de digestibilidad del 50 % y un contenido de proteína bruta (PB) de 7 % (Lentz et al., 2016) en contraposición con los máximos requerimientos de último tercio de gestación e inicio de lactancia cuyos requerimientos en PB son del 10 % y requerimientos de energía metabolizable de 21 Mcal (NRC, 1996) por día para una vaca adulta de raza británica con 420 kg de peso vivo. Montiel y Ahuja (2005) sostienen que la nutrición y la lactancia son los factores que más afectan la reanudación de ciclo ovárico

posparto, afectando la actividad del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal y la actividad ovárica, inhibiendo el desarrollo folicular. En condiciones de subnutrición, disminuye la condición corporal de la madre, produce menor cantidad de leche e induce al ternero a succionar con mayor frecuencia, lo que provoca pérdida de peso en ambos. Esto, junto al efecto de la lactancia, interfiere con la liberación hipotalámica de GnRH ocasionando una reducción de los pulsos de GnRH y LH, los folículos no llegan al tamaño preovulatorio por lo tanto no producen las concentraciones necesarias de estradiol para provocar el pico de LH y la ovulación, resultando en un anestro posparto más extenso (Williams et al., 1996; Witbank et al., 2002). En este sentido, el estado corporal al parto es el factor determinante de la actividad ovárica en el posparto y la fertilidad de los celos dependen además de la condición corporal y del nivel nutritivo durante el servicio (Carrillo, 2001)

Todos estos factores antes mencionados hacen que durante gran parte del año las vacas de cría presenten un balance energético negativo, lo cual determina una pobre condición corporal al parto e inicio del entore, generando de esta manera un largo período de anestro postparto y baja probabilidad de preñez en un servicio estacionado (Short, 1990). En los últimos años se han desarrollado diferentes protocolos de inducción y sincronización del celo y la ovulación para vacas en estado de anestro. Estos protocolos permiten realizar dos maniobras fundamentales en el manejo reproductivo, 1) la posibilidad de realizar inseminación artificial sin la necesidad de detectar celo, lo cual es problemático en sistemas extensivos (Bo et al., 2007) y, 2) la inducción de celo en animales que no están ciclando (Wheaton y Lamb, 2007). La aplicación de estos protocolos al inicio del periodo de servicio permite inseminar una gran proporción de animales e incrementar la cabeza de parición (Tobal, et al., 2019).

La competencia de la ganadería con otros rubros agropecuarios, requiere incrementar la productividad en los rodeos de cría, que a su vez sea rentable, sustentable y no deteriore el medio ambiente (Soca et al., 2007). En consecuencia, el objetivo del presente trabajo fue demostrar que se pueden incrementar los índices reproductivos aplicando en el uso de la tecnología de inseminación a tiempo fijo y destete precoz con un manejo aplicado en un rodeo de cría de la región semiárida de La Pampa, con la finalidad de adaptarlo a los modelos de cría de la región basados en el 100 % sobre pasturas naturales.

Materiales y métodos

El trabajo se realizó durante 3 años en un establecimiento ubicado en el departamento Toay, en la provincia de La Pampa; que cuenta con 1900 ha de monte de caldén y pastizal natural. Se utilizaron 180 vacas de razas británicas y sus cruzas, con 2 o más partos, un frame score de 4.5 a 5.5. La curva de parición correspondiente al año 0 es la resultante de un servicio con toro de 90 días de duración, a partir de aquí y por 3 años se implementó la (IATF + T). Todos los animales consumieron de manera extensiva, en los mismos potreros y durante todo el año con las mismas condiciones nutricionales en un sistema silvopastoril compuesto por una diversidad de especies de pasturas naturales y arbustivas típicas de la zona en estudio. Con una receptividad de 10 ha/a.

El servicio general para las vacas fue restringido a 90 días y estacionado en los meses de noviembre a enero. El servicio asistido se realizó en 2 momentos de acuerdo al estado reproductivo de los vientres y consistió en un tratamiento de sincronización de celo con inseminación a tiempo fijo y repaso con monta natural por el término de la

duración del servicio (IATF + T). La 1° IATF fue realizada durante la primera semana de noviembre, una vez finalizada, las vacas se enviaron a un potrero de pastura natural donde se introdujeron un 3% de toros para continuar con el servicio natural hasta fin de enero. La segunda IATF se realizó en la segunda semana de diciembre y posteriormente las vacas ingresaron al potrero junto con las vacas en servicio del primer grupo y permanecieron juntas hasta finalizar el servicio completo de 90 días. El protocolo de sincronización de celo para inseminar a tiempo fijo, se realizó con un mínimo de 40 días posparto y fueron apartadas por color de caravana y fechas probables de parto. Los tratamientos de inducción de celo, ovulación e inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) recibieron un dispositivo intravaginal de progesterona (0.5 g, i.v., Dib, Sintex S.A., Argentina) y una dosis de benzoato de estradiol (BE, 2.0 mg, i.m., Gonadiol, Sintex S.A. Argentina) el día 7, inmediatamente se retiró el dispositivo, se aplicó una dosis de prostaglandina (Cloprostenol, 0.125 mg., i.m., Ciclase DL, Sintex S.A.) y una dosis de cipionato de estradiol (1 mg, i.m.) Cipiosyn, Sintex S.A., Argentina) finalizando el día 9 con la IATF. El día siguiente ingresaron 6 toros para continuar en servicio natural hasta completar el período de servicio. La lactancia se interrumpió mediante destetes precoz, con un mínimo de 70 días de edad de los terneros y al momento de colocar los dispositivos en el rodeo de vacas. De esta manera todas las vacas recibieron una (IATF) con al menos un servicio de monta natural, sin requerimientos para lactación y con una duración de inicio a fin del servicio de 90 días. El diagnóstico de preñez se hizo mediante ultrasonografía 30 días de las IATF, y por tacto rectal + ecografía a 30 días de finalizado el servicio, en este momento se identificaron con caravanas color verde las preñadas por tacto rectal (mayores 90 y 60 días de gestación), la preñeces de 60 días se identificaron con caravana color amarilla y las de 30 días de gestación con caravana color rojo. De este modo quedaron identificadas por color, las cabezas y la cola de parición respectivamente, facilitando el manejo de selección de las vacas retiradas 20 días antes de la fecha probable de parto, las cuales integran el primer grupo de IATF para el próximo servicio y el primer destete precoz. Se tomaron los registros pluviométricos de manera mensual en los 4 años que duró el estudio para su posterior interpretación.

RESULTADOS

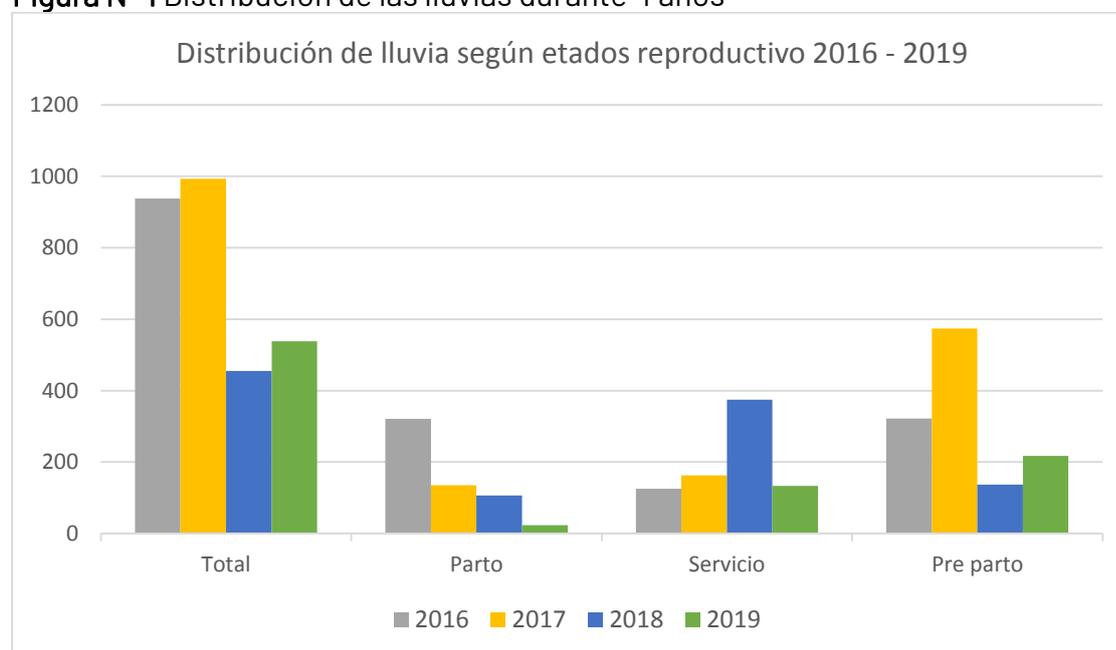
Tabla N° 1. Resultados de preñez logrados en 3 años en vacas.

Año	Preñez (%)	Parición (%)			Destete (%)
		Vacas	1° Mes	2° Mes	
0 (2016)	65.5	43	32	25	62.3
1 (2017)	83.6	44	38	18	79.5
2 (2018)	86.3	58	34	8	79.6
3 (2019)	90.5	69	22	9	86

El porcentaje de preñez en vacas se incrementó con respecto al año del inicio del trabajo. Durante 3 años se mantuvo esta tendencia, registrándose un aumento promedio del 38% en el índice de preñez con respecto al año inicial y la distribución de gestación también manifestó cambios importantes atribuidos a la IATF + T, observando una tendencia a incrementar los números de partos en los primeros 30 días y disminuyendo la cantidad de partos hacia el final del mismo. El mayor impacto fue en el primer año de aplicación del tratamiento sobre el año inicial, donde incrementó un

27.6% el porcentaje de preñez, además, redujo el 28 % los partos en el último mes de parición (Tabla N° 1). A lo largo de los tres años la tendencia a concentrar el parto en el primer mes se incrementó en 57%, representando en promedio un 33% superior respecto al servicio sin tratamiento (año 0). Al finalizar en trabajo se registró el mayor porcentaje de preñez (90.5 %), el mayor número de vacas que paren en el primer mes (69 %) representando incrementos del 38 y 60 % respectivamente, y una menor cantidad de vacas que paren al final de la parición (9 %) representando una disminución del 36 % con respecto al año inicial. Estos resultados encontrados en las concentraciones de los partos permiten lograr mayor cantidad de oportunidades de ser preñada. El índice de destete aumentó el 31% con respecto al año inicial, el mayor impacto se registró en el primer año un 27% de incremento con respecto al año inicial (0) Tabla 1.

Figura N° 1 Distribución de las lluvias durante 4 años



El total de lluvia anual fue mayor en los 2 primeros años (938 y 993 mm en 2016 y 2017, y menores en 2018 y 2019 (445 y 538 mm) respectivamente (figura 1). En 2018 el año de menor régimen pluviométrico, el 80 % se registró en los meses del servicio y el último año de estudio donde se observó los mayores índices reproductivos, se registró menor cantidad de lluvia caída en los meses de pre parto, parto y servicio comparado con los 2 primeros años.

DISCUSIÓN

Las tasas de preñez global son similares a los resultados observados por Vater et al. (2008) y de Nava et al. (2016), quienes compararon tres niveles de intensificación del manejo reproductivo en vacas con cría al pie, las tasas de preñez algo superior a las observadas en este ensayo, esto podría deberse a que no se utilizó un protocolo que incluyera hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Otros autores, no encontraron diferencias cuando se evaluó el efecto del cipionato de estradiol (CPE) y la (GnRH) y la combinación de ambas sobre la tasa de preñez en vacas sin ternero al pie. (Uslenghi, et al. 2016).

La IATF asociado al destete, (de Castro et al. 2006) observaron una diferencia del 10 % en la tasa de preñez en vacas con 60 días de pos parto, en anestro y con una CC de 4.5 (1-8). La mayor tasa de preñez fue para las vacas que se interrumpió la lactancia temporalmente con tablillas nasales (61.1 % vs 55.1 %). En este sentido, (Menchaca, et.al. 2005) encontraron diferencias significativas en el porcentaje de preñez, cuando aplicaron destete precoz a vacas con baja condición corporal y en anestro como resultado del servicio de IATF + toros. Así mismo, (Tobal, et al., 2019) observaron una tendencia similar en los resultados de preñez general y en la curva de parición algo superiores a los obtenidos en este ensayo, atribuidos a las diferencias en las características de manejo alimenticio y a los mayores índices de preñez inicial. Al respecto, en resultados obtenidos al norte de Uruguay, con la incorporación de IATF + repaso con toro y aplicando sistema de destete precoz, se observó por 8 años un incremento en la tasa de preñez general y una mayor cantidad de terneros nacidos en el primer mes. (Menchaca, et.al., 2013. En base a los registros de lluvia recogidos durante los 4 años en este estudio se observa que en los 2 primeros años 2016 y 2017, en forma excepcional, se registraron en promedio un total de 965.5 mm. Anuales, en 2018 y 2019 el registro anual fue (450 y 530 mm) representando un 47 % y 55 % respectivamente con respecto a los años anteriores. En base a este análisis es importante destacar que los índices de preñez y destete fueron en aumento, aún con el 50 % menos de lluvia respecto a promedio de los dos mejores años. En este sentido, en el año 3 donde se alcanza el mayor índice de preñez y destete, el registro de lluvia durante el parto fue de tan solo el 7 %, fueron similares durante el servicio y un 67 % en el preparto referenciado con el año 0.

CONCLUSIÓN

El sistema propuesto muestra ser una herramienta útil para mejorar la eficiencia reproductiva de los rodeos. La (IATF + T) aumenta el porcentaje de preñez global, logra mayor cantidad de preñeces tempranas, concentra las pariciones y alarga el intervalo entre parición e inicio de la siguiente estación de servicio. La planificación en la ejecución de las tareas de manejo del sistema (IATF + T) asociado con destetes precoz, permite lograr altos índices productivos en rodeos de cría alimentados con el 100 % en pastizales naturales en un servicio restringido en 90 días. Logra además, sostenibilidad de estos altos índices reproductivos en el tiempo, aún, en condiciones climáticas adversas.

BIBLIOGRAFÍA

Adema, E.; Martínez, H. y Montes, M. 1995. *Informe de suelo y vegetación campo anexo INTA Chacharamendi (L.P.)*. EEA Anguil INTA, Ministerio de Asuntos Agrarios (L.P.) Dirección de suelos y pastizales naturales.

Adema, E.; Gomez Hermida, V.; Buschiazzo, D.; Babinec, F.; Ibarguren, C. y Rucci, T. 2001. *Rolado de arbustos e intersiembra de Panicum coloratum en un pastizal natural de la Pampa*. Siembra Directa II. EdI INTA.

Anuario 2016. Estadísticas agropecuarias del Ministerio de la Producción de la Provincia de La Pampa. www.estadisticalapampa.gov.ar

De Nava, G., 2016. *Manejo reproductivo controlado en la cría: Resultados de 17 años de implementación de un sistema integrado de tecnologías reproductivas*. Octavas Jornadas Taurus de Reproducción Bovina.

- De Castro, T.; Menchaca, A.; Bonino, R.; y Peñagaricano, A. 2006. *Effects of suckling inhibition with nose plates associated to a timed insemination protocol in primiparous beef cows. Reproduction in Domestic Ruminants VI*, 64.
- Carillo, J. 2001. *Manejo de un rodeo de cría. Editorial centro regional Bs.As.* INTA 2da edición Pp. 506.
- Frank, E.; Llorens, E. y Cabral, D. 1998. *Productividad de los pastizales naturales de la provincia de La Pampa. Subsec. de Asuntos Agrarios*, Cambio Rural, INTA, SAGPyA.
- Lentz, B.C; Gambarte, M.; Perez, E.; Rabotnikof, C.M.; Zapata, R.R.; Petruzzi, H.J.; Morici, E.F.; Gallace, M.E.; Sawczuk, N. y Stritzler, N.P. 2016 R.AP.A. Vol. 36 Supl. 1: 295-411. National Research Council. 1996. *Nutrient Requirements of Beef Cattle. Seventh Revised Edition. USA.*
- Menchaca, A.; De Castro, T.; Chifflet, N. y Alvarez, M. 2005. *Uso combinado de IATF y destete precoz en vacas de cría en anestro posparto.* XXXIII Jornadas de Buiatría, Paysandú, Uruguay.
- Menchaca, A.; Nuñez, R.; De Castro, T.; Garcias Pintos, C. y Cuadro, F. 2013. *Implementación de programas de IATF en Rodeos de Cría. Seminario de Actualización técnica. Cría Vacuna. Serie Técnica N° 208.* INIA 2013
- Montiel, F. y Ahuja, C. 2005. *Body condition as suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle. Review.* Animal Reproduction science vol. 85. Issues 1 - 2.
- Short, R.E.; Bellows, R.A.; Staigmiller, R.B.; Berardinelli, J.G. y Custer, E.E. 1990. *Physiological mechanisms controlling anestrus an infertility in postpartum beef cattle.* Journal Animal Science, 68: 799 - 816.
- Soca, P.; Claramunt, M.; do Carmo, M. 2007. *Sistema de cría vacuna en ganadería pastoril sobre campo nativo sin subsidios: propuesta tecnológica para estabilizar la producción de terneros con intenciones de bajo costo y de fácil implementación.* Revista Ciencia Animal. Facultad de Ciencias Agronomicas. U. de Chile, 3: 3 - 22.
- Tobal, C. F.; Moralejo, R.; Sierro, M.; Perata, D.; Piccini, J.P.; Hecker, F. y Garcia, S. 2019. *Implementación de un Sistema integrado de tecnología reproductiva y de manejo en un rodeo de cría en la zona semiárida central de la provincial de la Pampa.* Revista Ciencia Veterinaria. UNLPam. Vol 21: 81 - 90.
- Uslenghi, G.; Cabodevilla, J. y Callejas, S.S. 2016. *Efecto del cipionato de estradiol y la GnRH sobre la sincronización de ovulaciones y la tasa de preñez a la IATF en vacas de cría sin ternero al pie.* Rev. InVet. 18.(2): 301-306.
- Vater, A.; Rodriguez Aguilar, S.; Otero Illia, M.; Cabodevilla, J. y Callejas, S. 2208. *IATF en vacas con Cría: uso de un dispositivo intravaginal con progesterone asociado a Cipionato de estradiol y GnRH.* XXXVI Jornadas Uruguayas de buiatria. Pag. N° 166. https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/116/JB2008_166-167.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Williams, G.L.; Gazal, O.S.; Guzman Vega, G.A.; Stanko, R.L. 1996. *Mechanism regulating suckling mediated anovulation in the cow.* Animal Reproduction Science, 42: 289 - 297.
- Witbank, M.C.; Gumen, A. y Sartori, R. 2002. *Phusiological Classification of anovulatory condition in cattle.* Theriogenology, 57: 21 - 52.