

Directorio

Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. José Narro Robles

Rector

Dr. Sergio Alcocer Martínez de Castro

Secretario General

Mtro. Juan José Pérez Castañeda

Secretario Administrativo

Dra. Rosaura Ruiz Gutiérrez

Secretaria de Desarrollo Institucional

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Dr. Francisco Trigo Tavera

Director

Dra. Silvia Elena Buntinx Dios

Secretaria General

L.C. Alfonso Ayala Rico

Secretario Administrativo

MVZ Verónica Fernández Saavedra

Secretaria de Comunicación

Ciencia Veterinaria

Volumen 10

Consejo Consultivo

Francisco J. Basurto Alcántara

Froylán Ibarra Velarde

Jorge López Morales

Ricardo Moreno Chan

Arturo F. Olguín y Bernal

Mario Pérez Martínez

Héctor Quiroz Romero

Héctor Sumano López

Francisco José Trigo Tavera

Raymundo Iturbe Ramírez

Liliana M. Valdés Vázquez

Gustavo García Delgado

CIENCIA VETERINARIA



Volumen 10

Editor

Ricardo Moreno Chan

Departamento de Microbiología e Inmunología
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.
E. mail: ricmorec@servidor.unam.mx



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MÉXICO 2007

Ciencia Veterinaria

Volúmen 10

Primera edición, 2007

DR© Universidad Nacional Autónoma de México.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Ciudad Universitaria.

México 04510, DF.

Hecho en México

ISBN 978-970-32-5044-8 (Serie)

ISBN 978-970-32-5045-5 (Volúmen)

Diseño editorial y formación electrónica: DCV F. Avril Braulio Ortiz

Corrección de estilo: Revista *Veterinaria México*

Queda rigurosamente prohibida, sin autorización escrita de los titulares del copyright, bajo las sanciones establecidas por las leyes, la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático.

Autores

M.V.Z., M.Sc. Juan Garza Ramos

Departamento de Microbiología e Inmunología
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.

M.V.Z., Ph.D., Antonio Morilla González

Departamento de Inmunología
CENID- Microbiología
INIFAP, SAGARPA.
Kilómetro 15 ½ Carretera México-Toluca
Palo Alto, 05110, México, D.F.
E-mail: amorilla@mailera.main.conacyt.mx

Dr. Marco Antonio Carvajal Velázquez

Elanco Salud Animal. Prolongación Av. Américas 1592, Piso 1
CP. 14620. Guadalajara, Jal. México.
E-mail: marco@elanco.com

Dr. Joel Hernández Cerón

Departamento de Reproducción
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.
E-mail: jhc@servidor.unam.mx

Dr. Carlos G. Gutiérrez Aguilar

Departamento de Reproducción
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.

M.V.Z., M. c., Dr. en C., Mario Pérez Martínez

Lab. de Investigación en Biología Tisular de la
Reproducción, "R.E. Lavielle".
Departamento de Morfología.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional autónoma de México
Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F.

M.V.Z., Jesús Aragón Hernández

Facultad de Agrobiología
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlaxcala, Méx.

Dra. Ofelia Mora Izaguirre

Lab. de rumiología y metabolismo nutricional
Secretaría de investigación. FESC-UNAM.

Correspondencia:

Blvd. B. Quintana 514-D
Colonia Arboledas
Querétaro, Qro.
CP. 76140

E-mail: ofemora2001@yahoo.com.mx

E-mail: mora@inb.unam.mx

Fax: +52 442 238 1032

M.V.Z. Hector Vera- Ávila

Centro Nacional de investigación en Fisiología Animal
Instituto Nacional de investigaciones forestales
Agrícolas y pecuarias, SAGARPA

Dr. Armando Shimada

Lab. de rumiología y metabolismo nutricional
Secretaría de investigación
Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán, UNAM

Dr. Jesús Antonio Álvarez -Martínez

Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias
en Parasitología Veterinaria

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y
Agropecuarias. Km. 11.4 Carretera Cuernavaca- Cuautla,
Jiutepec, Morelos. CP 62550.

Dr. Julio Vicente Figueroa -Millán

CENID., Parasitología Veterinaria
INIFAP, SAGARPA. Km. 11.4 Carretera Cuernavaca-Cuautla
Jiutepec, Morelos, CP 62550

M.V.Z., MCV., Miguel Ángel García Ortiz

CENID., Parasitología Veterinaria
INIFAP, SAGARPA. Carretera Fed. Cuernavaca- Cuautla, No. 8534 Col. Progreso. A.P.,
206 CIVAC. CP 62550. Jiutepec, Morelos
e-mail: garcía.miguel@inifap.gob.mx

M.V.Z., MC., Edmundo Enrique Rojas -Ramirez

CENID., Parasitología Veterinaria
INIFAP, SAGARPA. Carretera Fed. Cuernavaca-Cuautla No. 8534 Col. Progreso.
AP. 206
CIVAC., CP. 62550. Jiutepec, Morelos.
e-mail: rojas.edmundo@inifap.gob.mx

M.V.Z., Jesús Francisco Preciado- De La Torre

CENID., Parasitología Veterinaria
INIFAP. SAGARPA. Carretera Fed. Cuernavaca- Cuautla, No. 8534. Col. Progreso,
AP., 206
CIVAC., CP., 62550. Jiutepec, Morelos.
e-mail: preciado.jesús@inifap.gob.mx

M.V.Z., M. Sc., Ph.D. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Fisiología y
Mejoramiento Animal. INIFAP, SAGARPA.
Km. 1, Carretera a Colón -Ajuchitlán, Ajuchitlán, Querétaro.
e-mail: canto.germinal@inifap.gob.mx

M.V.Z., M.sc., Ph.D. Sergio Darío Rodríguez- Camarillo

CENID. Parasitología Veterinaria

INIFAP. SAGARPA.. Carretera Fed. Cuernavaca –Cautla, No. 8534. Col. Progreso.
AP. 206
CIVAC. CP, 62550, Jiutepec, Morelos.
e-mail: rodriguez.sergio@inifap.gob.mx

M.V.Z., Gabriela Sarahí Luna-Castro

CENID Parasitología Veterinaria, INIFAP.
CARR. Federal Cuernavaca-Cautla No. 8534
Col. Progreso, Jiutepec. C.P., 62550. Morelos

M.V.Z., Laura Elena Orozco Vega

C.E. Huimanguillo, CIR. Golfo Centro, INIFAP.
Km. 1 Carretera Huimanguillo- Cárdenas. Huimanguillo.
C.P. 86401. TABASCO.

DR. Carlos Agustín Vega Y Murguía

CENID. Parasitología Veterinaria. INIFAP.
Carretera Federal Cuernavaca-Cautla No. 8534
Col. Progreso. Jiutepec. C.P. 62550. Morelos.

M.V.Z., Patricia Ramírez Noguera

Campo 1. FES. Cuautitlán, UNAM.
Km. 2/5 Carretera Cuautitlán- Teoloyucan.
Cuautitlán Izcalli. C.P. 54700.
Estado de México.

M.V.Z., M. Sc., Carlos Ramón Bautista-Garfias

Centro Nacional de Investigación en Parasitología Veterinaria
INIFAP. SAGARPA. Km. 11 ½, Carr. Federal Cuernavaca-Cautla
Jiutepec, Estado de Morelos.

Prólogo

El volumen 10 -2007 de la serie Ciencia Veterinaria, siendo un órgano de difusión científica y tecnológica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, contiene información relativa a temas importantes para el desarrollo de la ganadería nacional, como son los factores asociados a la infertilidad de la vaca lechera en sistemas intensivos de producción, los de las vacunas vivas para el control de Anaplasmosis bovina y del cultivo *in vitro* tanto de *Anaplasma marginale* como de *Babesia bovis* y *Babesia bigémina* y su aplicación para la producción de vacuna contra la Piroplasmosis, que en algunas regiones de ganadería extensiva del país, son enfermedades limitantes del mejoramiento y desarrollo del hato mexicano en el campo.

El lector encontrará también, una excelente información de sanidad animal, acerca de los métodos para evaluar la bioseguridad en las granjas porcinas, así como, de los temas importantes relativos a los nuevos hallazgos en materia de inmunidad innata, de los mecanismos celulares y endocrinos que son afectados por la subnutrición en pequeños rumiantes y de los efectos que los fitoestrógenos tienen en la regulación endocrina del aparato reproductor de mamíferos.

Otro tema interesante que se consideró en el contenido de este volumen 10 -2007, es el relativo al de la Bioética, como disciplina de aprendizaje y concientización, que en el currículum de estudio de las escuelas y facultades de Medicina Veterinaria y Zootecnia, es conveniente para dotar a los profesionales, del conocimiento ético que debe normar su ejercicio en y frente a la sociedad.

En relación a la forma y contenido de cada uno de los artículos que se presentan, deberá comprenderse, que los únicos responsables son los autores de cada trabajo, a quienes se agradece su generosa participación en ésta obra. Se agradece también, a todos los miembros del Consejo Consultivo, por la revisión y crítica autorizada, que como una responsabilidad, aceptaron gentilmente realizar, en sacrificio de su tiempo.

Finalmente es justo reconocer al Sr. Dr. Francisco José Trigo Tavera, Director de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por el apoyo decisivo que otorgó, para el procesamiento y publicación del volumen 10 -2007 de la serie Ciencia Veterinaria.

Atentamente
El Editor

Índice

Autores	VII
Prólogo	XI

Bioética en la Educación Veterinaria

Juan Garza

Preámbulo	2
I Evolución histórica	3
1. Ética, moral, deontología, bioética	5
II. Surgimiento y evolución de la bioética	9
1. Bioética e innovación	12
2. Bioética y desarrollo sustentable	13
3. Organismos internacionales	14
III. Antecedentes de la bioética y evolución en México	15
1. La comisión nacional de bioética	16
2. Bioética e investigación	20
3. Rol de los académicos en investigación	20
4. Aplicación de la bioética en otros campos	23
IV. Antecedentes y evolución de la bioética en Medicina Veterinaria	23
1. Campos de aplicación en Medicina Veterinaria y Zootecnia	26
V. Educación de la bioética	28
VI. Evolución de la enseñanza de la Medicina Veterinaria en México	29
Otros aspectos de la bioética	36
a) Bioética y legislación	36
VII. Propuestas y retos	37
Referencias	39

Métodos para evaluar la bioseguridad en las Granjas Porcinas

Antonio Morilla-González

Marco Antonio Carvajal-Velázquez

I. Introducción	44
II. Evaluación e implementación de la bioseguridad	44
1) Derechos de los animales	44

2) Análisis de peligros y puntos críticos de control	45
3) Evaluación de la bioseguridad en granjas porcinas de México	46
4) Densidad porcina	49
5) Animales de reemplazo y semen	50
6) Vehículos	51
7) Desinfección de llantas	52
8) Secado de vehículos	52
9) Personal	54
10) Lavado y desinfección	55
III. Evaluación de campo para determinar la dilución del desinfectante ...	55
1) Superficies y equipo	56
A) Conteo de bacterias en unidades formadoras de placa por cm ²	56
B) Biolunimimetría (Bioluminiscencia- <i>Lighting test method</i>)	57
C) Determinación de proteína	57
IV. Evaluación de diferentes métodos de lavado y desinfección: En Instalaciones, vestimentas, botas, jeringas, agujas y frascos.	57
V. Fauna nociva: roedores, moscas	63
VI. Conclusiones	65
Referencias	67

Factores asociados con la infertilidad en la vaca lechera en sistemas intensivos de producción

Joel Hernández Cerón

Carlos G. Gutiérrez Aguilar

I. Introducción	72
II. Algunas características fisiológicas de las vacas de alta producción	74
III. Producción de leche e infertilidad	75
1. Número de vacas por hato	77
2. Inicio de la actividad ovárica posparto	78
3. Alteraciones hormonales	79
4. Genética	79
5. Nutrición	81
6. Estrés calórico	82
7. Estrés oxidativo	83
8. Detección de estros y momento de la inseminación artificial	84
IV. Conclusiones	85
Referencias	86

Los fitoestrógenos y sus efectos en la regulación endocrina del aparato reproductor de mamíferos domésticos

Mario Pérez Martínez

Jesús Aragón Hernández

I. Introducción.	94
II. Estudios en animales de laboratorio.	95
III. Estudios en rumiantes	98
IV. Estudios en animales de compañía	100
V. Conclusiones y perspectivas de investigación.	101
Referencias.	103

Mecanismos celulares y endocrinos afectados por la subnutrición en Pequeños Rumiantes

Ofelia Mora

Héctor Vera-Ávila

Armando Shimada

Resumen: español e Inglés.	108
I. Introducción.	109
1. Algunos aspectos actuales de la ganadería de pequeños rumiantes en México.	109
2. Tipos de restricción nutricional o alimentaria.	110
II. Efectos de la subnutrición en el tubo digestivo y otros tejidos	111
1. Efectos sobre la mucosa intestinal	112
2. Efectos sobre el transporte intestinal de iones.	112
3. Efectos sobre la permeabilidad intestinal	113
4. Efectos sobre la absorción de nutrimentos	113
5. Efectos en el hígado.	114
6. Efectos en el tejido adiposo	115
III. Efecto de la subnutrición sobre el eje hipotalámico-pituitario-gonadal . .	122
IV. Conclusiones	126
Referencias	128

Cultivo *in vitro* de *Babesia bovis* y *Babesia bigémina* y su aplicación para la producción de vacuna

Jesús Antonio Álvarez Martínez

Julio Vicente Figueroa Millán

I. Introducción.	138
II. Distribución geográfica	138
III. Ciclo biológico de <i>Babesia</i> en la garrapata.	139

IV. Desarrollo en el bovino.....	139
V. Antecedentes del cultivo <i>in vitro</i>	140
VI. Control de la babesiosis bovina a partir de inmunógenos.....	142
VII. Importancia y aplicaciones del cultivo <i>in vitro</i>	143
VIII. Vacunas vivas atenuadas derivadas del cultivo <i>in vitro</i> en México	144
IX. Perspectivas	147
Referencias.....	148

Vacunas vivas en el control de la *Anaplasmosis bovina*.

Situación en México

Miguel Ángel García-Ortiz

Edmundo Enrique Rojas Ramírez

Jesús Francisco Preciado de la Torre

Germinal Jorge Cantó Alarcón

Sergio D. Rodríguez Camarillo

I. Introducción.....	156
II. Vacunas inactivadas controladas	157
III. Vacunas vivas no controladas	159
IV. Vacunas vivas controladas.....	160
IV. Desarrollo de una vacuna de baja virulencia en México	161
VI. Perspectivas	165
Referencias.....	167

El cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale*: ¿Evolución o involución?

Gabriela Sarahi Luna Castro

Laura Elena Orozco Vega

Carlos Agustín Vega y Murguía

Sergio- D. Rodríguez -Camarillo

Patricia Ramírez Noguera

I. Introducción.....	174
II. El agente causal: <i>Anaplasma marginale</i>	175
III. El proceso de infección por <i>Anaplasma marginale</i>	177
IV. Cultivo de <i>Anaplasma marginale</i> en eritrocitos de bovino.....	179
V. Cultivo de <i>Anaplasma marginale</i> en células de artrópodo.....	188
VI. Cultivo de <i>Anaplasma marginale</i> en otro tipo de células	192
VII. Discusión y conclusiones	196
Referencias.....	201

La inmunidad innata: nuevos hallazgos*Carlos Ramón Bautista Garfias*

I. Introducción.....	210
II. Componentes de la inmunidad innata o natural	210
III. Células de la inmunidad innata.....	211
IV. La inflamación.....	212
V. Defensinas y cathelicidinas	213
VI. Galectinas.....	214
VII. Quimiocinas y citocinas	214
VIII. Proteínas de choque térmico.....	215
IX. Proteína C reactiva	215
X. El sistema del complemento	216
XI. Los receptores tipo-Toll	217
XII. Proteínas de reconocimiento de peptidoglicano	220
XIII. Otras familias de reconocimiento de patógenos: NLR y RLR.....	220
XIV. Evasión de la respuesta inmune innata por organismos patógenos.	220
XV. Manipulación de la inmunidad innata.....	221
XVI. Conclusiones	222
Referencias.....	223

Volumen 9, 2003-4

Contenido

Estacionalidad reproductiva en ovejas.

Porras-Almeraya, L. A. Zarco- Quintero, y J. Valencia-Méndez.

Técnicas de clonación en embriones.

María Del C. Navarro-Maldonado., A. Rosado-García., H. Fernando-Serrano.

Investigaciones sobre la aplicación de técnicas moleculares en el diagnóstico y control de la babesiosis bovina.

J. V. Figueroa Millán., J. A. Álvarez Martínez

Babesiosis bovina: Características relevantes de la respuesta inmune.

D. García-Tapia., J.A. Álvarez Martínez., J.V. Figueroa Millán., C.A. Vega y Murguía.

Inmunología e inmunoprofilaxis de la Anaplasmosis bovina.

S.D. Rodríguez-Camarillo., M.A. García-Ortíz., R. Aboytes-Torres., G.J. Cantó-Alarcón., y Robert Bariqye.

La Fiebre Porcina Clásica endémica en México.

A.Morilla-González., y M.A. Carvajal-Velázquez.

Las Enfermedades Virales emergentes de los cerdos.

A. Morilla-González.

Actividad secretora del oviducto de mamíferos domésticos durante la fertilización y el desarrollo embrionario temprano.

S.R. Anzaldúa Arce., M. Pérez-Martínez., M.A. Cerbón Cervantes., y I. Camacho-Arroyo.

Adhesión de actinobacillus pleuropneumoniae a componentes de matriz extracelular de cerdo.

Enriquez-Verdugo., D. Godinez-Vargas., R. Martínez Zúñiga., J. de J. Serrano-Luna., Mireya de la Garza., R. Hammer-Barrera, y A.L. Guerrero-Barrera.

Situación actual de la Encefalopatía Esponjiforme Bovina y la variante de la Enfermedad de Creutzfeldt Jacob en el hombre.

R. Moreno-Chan., y L.M. Valdés-Vázquez

Bioética en la Educación Veterinaria



Juan Garza

“La conciencia es el mejor juez que tiene un hombre de bien”,

José de San Martín

Preámbulo	2
I. Evolución histórica	3
1. Ética, moral, deontología, bioética.....	5
II. Surgimiento y evolución de la bioética	9
1. Bioética e innovación.....	12
2. Bioética y desarrollo sustentable.....	13
3. Organismos internacionales	14
III. Antecedentes de la bioética y evolución en México	15
1. Comisión Nacional de Bioética	16
2. Bioética e investigación.....	20
3. Rol de los académicos en investigación	20
4. Aplicaciones de la bioética en otros campos.....	23
IV. Antecedentes y evolución de la bioética en medicina veterinaria	23
1. Campos de aplicación de la bioética en medicina veterinaria	26
V. Educación de la bioética.....	28
VI. Evolución de la enseñanza de la medicina veterinaria en México....	29
a) Bioética y legislación.....	36
VII. Propuestas y retos.....	37
Referencias	39

Preámbulo

La Bioética constituye “la disciplina científica que estudia los aspectos léticos de la medicina y la biología en general, así como las relaciones del hombre con los restantes seres vivos”. La Enciclopedia de Bioética, editada en 1978, la define como el “estudio sistemático de la conducta humana en el área de las ciencias de la vida y la atención de la salud, en cuanto dicha conducta es examinada a la luz de los principios y valores morales”; otra definición es la “aplicación de la ética a las ciencias de la vida” (1). La palabra Bioética es un compuesto entre *bios* que significa vida y *ethos* que significa hábito, comportamiento o carácter. El término responde a una aspiración de fusionar la ciencia con las humanidades, que de hecho no están completas si no se analizan y aplican juntas como la dimensión humanística del quehacer científico.

La bioética surge ante la necesidad de contar con un medio para orientar la toma de decisiones respecto de los dilemas morales de la vida, particularmente en el campo de la salud. El término data de 1970, pero en tres y media décadas ha evolucionado en diversas direcciones, según la naturaleza de los grupos de estudio.

Destacan al menos tres concepciones distintas que mediante consensos estimulados por organismos internacionales y expertos han confluído en un mejor entendimiento. Una visión amplia con cabida al ser humano y a la biosfera; una visión exclusiva de la medicina y la ética con base filosófica; y otra visión más relacionada con la doctrina filosófica de las relaciones entre humanos y aspectos médicos. La primera opción ha prevalecido y en ella la bioética analiza los temas torales de la medicina veterinaria y zootecnia: respeto a las diferentes formas de vida, preservación de los recursos naturales, aplicación racional de la tecnología, desarrollo sustentable y respeto entre las personas, pueblos y culturas son ahora los temas adicionales de discusión que la bioética ha permitido actualizar. Por ello se ha dicho que la bioética ha rescatado a la filosofía aplicada.

La reciente aprobación por la UNESCO de la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos (2), adopta la visión más amplia, afín a su definición inicial. México ya se había adelantado a esa visión en diversos foros y documentos, entre ellos destacan el Código de Bioética para personal de salud, las propuestas de México a las consultas de la UNESCO

y el decreto Presidencial de 2005, que declara a la Comisión Nacional de Bioética como órgano desconcentrado (3).

En el presente ensayo se describen: *a)* Los antecedentes de la bioética desde la historia hasta su inicio formal en 1970; *b)* cómo ha evolucionado en las diferentes disciplinas particularmente de la salud y ambiente; *c)* la perspectiva internacional a partir de la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos de la UNESCO en 2005; *d)* su situación en México desde la perspectiva de la Comisión Nacional de Bioética; *e)* cómo se incorporó en la medicina veterinaria y zootecnia; *f)* su inclusión formal y explícita en los planes de estudio universitarios; *g)* retos.

A pesar de que no ha habido un desarrollo armónico de los caminos hacia la adopción y adaptación de la bioética a nuestra sociedad, se han generado esfuerzos notables de acuerdo con iniciativas dispersas. En México se dispone de estudios y propuestas sobre bioética en enunciados, tratados, leyes, reglamentos, normas, códigos, publicaciones, grupos de estudio, tanto en el área de la salud como en otros espacios de los sectores público, académico, privado y social. En medicina veterinaria y zootecnia se ha incorporado también la bioética, aunque no se ha diseminado aún en la forma deseable. Se enfatiza que la incorporación de la asignatura Seminario de Bioética dentro del nuevo plan de estudios de la carrera de medicina veterinaria y zootecnia, en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) obedece a una noble misión: coadyuvar al desarrollo de una cultura bioética en medicina veterinaria y zootecnia.

Finalmente se describen algunos de los retos por resolver para que la bioética en el vasto campo de la medicina veterinaria y zootecnia, deje de ser una utopía y se convierta formalmente en una herramienta no sólo para la solución de problemas, sino para los estudios prospectivos, la planeación, la construcción de una mejor sociedad que combata la pobreza, logre equidad y alcance el bien común en equilibrio con la naturaleza dentro de un verdadero desarrollo sustentable.

I. Evolución histórica

La medicina y dentro de ella los responsables de velar por la salud de los animales fueron las primeras disciplinas en las que sus miembros estaban

sujetos a regulaciones jurídicas muy antiguas. El primer texto conocido de "legislación veterinaria" data de 2300 a.C., se trata del código de "Eshuna", de la antigua Babilonia, que tipifica normas para la prevención de la rabia. "Si el perro está rabioso se le llama la atención al dueño, si éste no hace caso de la advertencia y resulta que el perro muerde y mata a alguien, el dueño del perro pagará dos tercios de *misma* (412 g de plata), si mata a un esclavo pagará 15 *sekeles*". Entre las referencias antiguas mejor conocidas y estudiadas también de Babilonia, destaca el Código de Hammurabi, piedra negra (diorita) de dos metros de altura por casi uno de diámetro, que data del reinado del Hammurabi, hace cuatro milenios (reino de 2067 a 2025 a.C.).

La piedra pulida está escrita, en gran parte, por escritura cuneiforme sumeria y acadia. Los avatares de la piedra con el código de Hammurabi desde su descubrimiento en 1902 hasta su ubicación actual en el museo del Louvre, en París, los narra en forma completa y amena Pérez Tamayo (4). La escritura contiene 282 leyes administrativas; de la 215 a la 227 trata de leyes relacionadas con la medicina. Para los propósitos de esta publicación destacan la 224 y la 225, pues están relacionadas con la práctica de quienes entonces se dedicaban a la cura de animales:

- 224.** *Si el "mounai-sou" (médico de los bueyes o de los asnos) ha tratado de una herida grave a un buey o un asno y lo ha curado, el dueño del buey o asno dará al médico como salario un décimo (de siclo) de plata.*
- 225.** *Si ha tratado a un buey o a un asno de una herida grave y ha ocasionado su muerte, dará la cuarta parte de su precio al dueño del buey o del asno.*

De acuerdo con Majno un *siclo* de plata pesaba 8.5 g.

Hubo mandatos éticos y ordenanzas similares en China, India y Egipto.

El documento mejor conocido es el Juramento de Hipócrates,, referente ético de la práctica médica occidental durante más de veintitrés siglos. Se atribuye a Hipócrates de Cos (450 a.C.) el haber roto con la causalidad natural de la enfermedad y su carácter místico-religioso. El renacimiento de los conceptos del juramento de Hipócrates y de su época fueron rescatados por Galeno de Pérgamo (129-216 d.C.) cuyo pensamiento

dominó la medicina occidental durante quince siglos, lapso en que sufrió adecuaciones de acuerdo con la evolución cultural y creencias (5).

Respecto de los *médicos veterinarios* y sus antecesores, en España destaca que en el siglo II con Alfonso X, el Sabio, se establecieron leyes y ordenanzas. Posteriormente fueron ratificadas por los Reyes católicos en el siglo XVI. Dichas leyes y ordenanzas del Honrado Consejo de la Mesta de Pastores se refieren a ganados dolientes y al arte de la Albeitería.

La *albeitería* consiguió alcanzar la categoría de profesión oficial, se ejercía bajo la organización de tribunales examinadores, veedores y la real protección para sus titulados. Estas reglas para su ejercicio como albéitares fueron establecidas por el tribunal del Protoalbeyterato.

En Nueva España el tribunal del Protoalbeyterato fue implantado en el siglo XVI.

El libro *Albeitería*, de Juan Sánchez de Peralta, es el *primer libro de ciencia veterinaria escrito en América*, alrededor de 1575-1580. En el prólogo de la edición facsimilar editada por Quesada Bravo, en 1953, se narra el amor, respeto y veneración que se tenía a los caballos, pues éstos hacían a sus señores "caballeros" ("*El respeto del hombre hacia los animales es inseparable del respeto de los hombres entre ellos mismos*").

1. Ética, moral, deontología, bioética

Para un mejor entendimiento del porqué de la bioética, de su evolución, conviene revisar sus orígenes etimológicos y conceptuales:

La *ética*, del griego *ethos*, costumbre, comportamiento; se entiende como la filosofía del bien y del mal. Aristóteles la impulsó en gran medida con sus estudios sobre la racionalidad humana. Como rama de la filosofía se le considera ciencia normativa, pues se encarga de la conducta humana y es diferente de las ciencias formales, como la lógica y las matemáticas, y de las ciencias empíricas, como la química y la física. Empero, las ciencias empíricas sociales (psicología) confluyen en el estudio de la conducta social. La Ética es una disciplina filosófica cuya tarea consiste en fundamentar los distintos sistemas de ideas morales que justifican las acciones del hombre. Se encarga de las acciones consideradas "buenas". La ética incluye elección en libertad y con responsabilidad de la elección.

La *moral*, del latín *moris*, que significa costumbre, hábito, es un sistema de opiniones, representaciones, normas o evaluaciones sobre la re-

gulación de los actos de los individuos. Norma las relaciones de los hombres con sus congéneres. La moral refleja y fija a través de los principios y normas o reglas de conducta, las exigencias que la sociedad plantea al hombre en su vida cotidiana.

La *deontología*, de la palabra *denotes* que significa deber, es la ciencia o tratado de los deberes, que se estipulan en códigos, juramentos y documentos afines.

La *bioética*, definida en el preámbulo de este ensayo, es un campo multidisciplinario, que impulsa a un actuar correcto por las partes implicadas, es un movimiento de transformación en la sustancia y en el estilo de las decisiones y una reflexión sistemática en las prácticas de salud, medio ambiente, ramas agropecuarias, relaciones entre humanos y entre éstos y los demás seres vivos, de acuerdo con sus *principios* y *valores*.

Los principios de la bioética son: *a)* Beneficencia; *b)* no maleficencia; *c)* justicia; *d)* dignidad; *e)* equidad; *f)* autonomía; *g)* solidaridad; *h)* veracidad.

La Red latinoamericana de bioética de la UNESCO ha señalado que los principios básicos no son suficientes para el análisis apropiado de los macroproblemas, por lo que ha añadido otros principios complementarios (6).

La bioética representa un nuevo territorio del saber, constituye un instrumento de la teoría y el método. No es ética religiosa, no es rígida ni dogmática, no se basa en mandamientos o prohibiciones, no es un conjunto de afirmaciones relativas y subjetivas.

La bioética tiene como fundamento la deliberación racional, define criterios para la toma de decisiones razonables y razonadas, no considera que existe una verdad única, ofrece métodos para analizar casos y de acuerdo con las circunstancias y cultura identificar las diferencias y encontrar acuerdos, busca formas de cooperación para llegar a soluciones consensuadas.

Los *valores* pueden ser expresados de diferente forma y circunstancia. Por ejemplo, en el Plan de Desarrollo 2005-2009 de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México, se plantea promover: excelencia, integridad, respeto, equidad y solidaridad. Parece un número reducido de valores, pero una revisión cuidadosa de sus definiciones permite ver que cada definición engloba a varios valores adicionales:

- ❑ **Excelencia:** Lograr con compromiso, voluntad y efectividad lo mejor de nosotros para la superación permanente en lo individual, institucional y comunitario, para la salud pública y animal, la producción de alimentos inocuos de alta calidad y el desarrollo agropecuario sustentable.
- ❑ **Integridad.** Actuar con rectitud y honestidad, rindiendo siempre cuentas claras, manteniendo congruencia entre lo que pensamos, decimos y hacemos, buscando el bien común, al cumplir en forma ética, responsable y transparente nuestras obligaciones con convicción y dentro de la normatividad institucional y la legalidad vigente.
- ❑ **Respeto.** Reconocer en la Facultad y en la sociedad el valor de las personas y aceptar sus diferentes ideas, enfoques y percepciones, sin discriminación alguna, así como cuidar el ambiente y promover el bienestar de los animales.
- ❑ **Equidad.** Establecer condiciones y mecanismos justos que permitan el acceso de toda persona a las oportunidades académicas, profesionales y de desarrollo social, sin más limitación que las propias capacidades y el esfuerzo personal.
- ❑ **Solidaridad.** Actuar individual y colectivamente con compromiso y sensibilidad ante las necesidades de nuestros semejantes, nuestra institución y nuestro país."

En un esfuerzo por educar para la integridad, se ha propuesto impulsar en el ámbito escolar en todos los niveles nueve valores: honestidad, responsabilidad, respeto, equidad, compasión, expansión de los límites morales (más allá de la familia y el núcleo social primario), transmisión de habilidades para tomar decisiones, enseñanza de valentía moral y desarrollo de una cultura de integridad.

La enseñanza de valores no se puede comprar o contratar, requiere de la participación de padres, educadores, empleados, directivos, alumnos, hijos, vecinos, compañeros. El esfuerzo presupone de un verdadero compromiso de todos y nunca olvidar que hay que predicar con el ejemplo, siempre.

En la búsqueda de contar con guías que impidan caer en situaciones indeseables se han descrito los *pecados capitales* que inicialmente

incluyen a los seis tradicionales: soberbia, envidia, ira, gula, pereza y lujuria.

Cantú los actualiza conservando sólo la codicia y agregando crueldad, adulterio, fanatismo, deshonestidad, hipocresía, codicia y egoísmo.

Comte-Sponville en su *Diccionario filosófico* enlista como nuevos pecados: egoísmo, crueldad, cobardía, mala fe, suficiencia, fanatismo e indolencia.

Savater (7) oferta nuevos pecados: impuntualidad, crueldad, vanidad (exhibicionismo), fundamentalismo, consumismo (que involucra avaricia, envidia y gula), egoísmo, falsedad. Asimismo, menciona a Konrad Lorenz, quien denuncia ocho pecados capitales de nuestra sociedad: sobrepoblación, devastación del espacio vital, competencia entre los hombres, extinción de los sentimientos, deterioro del patrimonio genético, tradición demolida, adoctrinamiento fundamentalista y armas nucleares.

Ghandi, por su parte, tiene su versión: riqueza sin trabajo, placer sin conciencia, conocimiento sin carácter, comercio sin moral, ciencia sin humanismo, culto sin sacrificio y política sin principios.

Desde el punto de vista médico, Pérez Tamayo (4) refiere los pecados capitales de los médicos, propuestos por Asher y Sánchez Medal, a ellos les anota su opuesto, proponiendo con cierta ironía las virtudes:

Pecados	Virtudes
Oscuridad	Claridad
Crueldad	Caridad
Mala educación	Buena educación
Superespecialización	Subespecialización
Amor a lo raro o espanofilia	Amor a lo común
Estupidez común	Sentido común
Pereza	Diligencia
Afán de lucro	Voto de pobreza
Desorientación	Orientación
Discriminación	Equidad
Barbarismo del lenguaje	Uso correcto del lenguaje

Estas reglas de conducta son aplicables a cualquier profesión y aceptables por la humanidad. De acuerdo con los patrones culturales y sociales, la lista puede ser incompleta.

II. Surgimiento y evolución de la bioética

A mediados del siglo XX se gestó un movimiento social producido por abusos de la medicina y la ciencia; esos hechos favorecieron el surgimiento de la bioética, entre otros, los juicios de Nuremberg y la aprobación de la Carta de los derechos humanos de la ONU en 1948 (8). Entre ellos, los procesos de democratización, avance en los derechos humanos, reivindicación de los derechos de las minorías y la autonomía personal, la preocupación en la investigación apropiada en los animales y seres humanos y la conciencia ecológica.

Los momentos de la bioética incluyen la secularización del mundo, legitimación de distintos puntos de vista, cambios de paradigmas hacia la autorregulación colectiva, identificación de los principios básicos para regular la investigación y la atención médica y la crisis de valores derivada de la manera en que se ejerce el poder.

Autoritarismo, totalitarismo y falta de autonomía civil

Los hechos técnicos y científicos que tuvieron impacto en el surgimiento y aceptación de la bioética incluyen nuevos paradigmas en las concepciones sobre la vida y la muerte, la tecnología aplicada al área médica y a la producción pecuaria intensiva (biotecnología), la aparición de enfermedades emergentes, la globalización y sus impactos dispares en diferentes sectores sociales, el esclarecimiento del genoma humano, la ingeniería genética y los alimentos y animales transgénicos, los impactos negativos en el medio ambiente, el crecimiento desordenado de los asentamientos humanos, las explotaciones agrícolas y pecuarias, el desarrollo industrial; el calentamiento global y la pérdida de biodiversidad.

La bioética incluye un proceso de toma de decisiones que utiliza el método deliberativo que se basa en la discusión fundamentada, razonada y racional, acepta la diversidad de opiniones, no busca verdades absolutas, involucra a los afectados en las decisiones, analiza caso por caso, identifica los puntos de conflicto y busca acuerdos mínimos para la convivencia social.

La bioética auxilia a la toma de decisiones basadas en la razón y no en creencias; según Gracia (9) debe ser:

- ❑ *Secular*, no religiosa, para alcanzar en nuestra sociedad heterogénea acuerdos racionales mínimos aceptables para todos y que no estén basados en creencias.
- ❑ *Pluralista*, aceptar todos los enfoques y posturas posibles e intentar acuerdos universales.
- ❑ *Autónoma*, con normas y preceptos que no sean impuestos a los individuos desde fuera, sino sean producto de su propio carácter y discernimiento.
- ❑ *Racional*, que analice caso por caso, que no presuponga *a priori* y que medite sobre las consecuencias posteriores de la decisión.
- ❑ *Universal*, para que ayude a tomar decisiones más allá de los convencionalismos morales.

La evolución de la Bioética permite identificar diferentes etapas: a) Bioética centrada en el *bienestar del individuo*, discusión de códigos (ética médica); b) nuevas formas de relación *médico-paciente* y sociedad-medio ambiente; c) estructura, financiamiento y organización de los *servicios de salud* y de producción primaria e industrial; d) bioética de la *salud de la población y de la biosfera*.

Bioética institucional

La orientación de la bioética ha evolucionado de una atención individual a otra de poblaciones y su madurez se demuestra cuando se ha institucionalizado. La bioética está pasando de ser un tema de estudio de expertos filósofos con base médica o médicos con base filosófica, a una bioética para todos (previa preparación formal o propia dirigida), ya que *todos enfrentamos dilemas* y requerimos tener una herramienta auxiliar que nos permita tomar las mejores decisiones para la sociedad, para el bien común.

El discurso bioético como puente de entendimiento

En la sociedad hay visiones distintas frecuentemente encontradas entre las racionalidades de los diferentes actores. Las discrepancias en el lenguaje entre las demandas de los usuarios y la oferta de los sistemas y servicios de salud, entre las finalidades de los investigadores y las expectativas de los planificadores y personas comunes y esencialmente en la identificación de

los "reales" problemas y dilemas que amenazan el bienestar. Las contradicciones entre las racionalidades económica, científica, terapéutica, etcétera, proponen diferentes soluciones a la práctica sanitaria; como consecuencia, surge el discurso bioético como incitación al diálogo y al consenso.

La heterogeneidad de las visiones se debe a sus orígenes (Filosofía, ciencia, medicina), formas de articulación (multi, inter, transdisciplinaria), campo de aplicación (individual-micro o colectiva, de poblaciones o macrobioética), formas de presentación (normativa, clínica, social). Como consecuencia de lo anterior (6) se ha propuesto que hay varias bioéticas, entre ellas: neutral, descriptiva, crítica, socialmente comprometida, de intervención. Ante las visiones con orientaciones diferentes, la bioética pretende servir de puente entre disciplinas, credos, nacionalidades, instituciones y personas.

Se ha insistido en que a pesar de la pluralidad social y el multiculturalismo, no se apliquen dobles estándares como enfatiza la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos de la UNESCO, que no es ley, es declaración de consenso, pero que señala los mínimos de cumplimiento obligado en cualquier circunstancia.

Temas de controversia y temas olvidados por la bioética

En la segunda mitad del siglo XX muchos de los principales problemas éticos de la humanidad eran médicos, por lo que el surgimiento de la bioética le dio ocupación práctica a una disciplina filosófica eminentemente teórica y que estaba ausente de los problemas reales.

Los temas de la bioética están señalados en la Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos de la UNESCO, por lo que se enuncian los principales: seres humanos, persona, autonomía, grupos vulnerables, diferencias culturales, dimensión biológica, psicológica, social, responsabilidad social, diversidad, justicia, equidad, pluralismo, vulnerabilidad humana, medio ambiente, biosfera, biodiversidad.

Los *temas de controversia* que abordó inicialmente la bioética incluyen los conflictos de excepción al inicio y fin de la vida y, en general, la atención de las necesidades de pacientes en mal estado. El listado reúne estos tópicos: donación de órganos y su trasplante, incluyendo xenotransplantes, eutanasia (la decisión de mantener o interrumpir en determinado momento los medios que prolonguen artificialmente la vida del enfermo), medicina paliativa, reanimación en caso de paro cardiaco, fecundación *in*

vitro y, en general, técnicas de fecundación asistida, donación de óvulos y espermatozoides, congelamiento de gametos y de embriones humanos, clonación, selección del sexo del embrión, ingeniería genética (es decir, modificación del patrimonio genético, sea para curar enfermedades, sea con propósitos eugenésicos o con otros fines), intervenciones sobre el genoma; inseminación artificial, aborto provocado, anticoncepción, diagnóstico prenatal, estatus jurídico del embrión, operaciones de cambio de sexo, esterilización masculina y femenina, veracidad del médico con el enfermo, sufrimiento de los animales, etcétera (10).

Lamentablemente los estudios y atención de la bioética no han abordado adicionalmente, en la mayoría de los grupos de estudio, otros *temas olvidados* a pesar de que está claramente demostrado que hay decisiones de salud pública, de producción y disponibilidad de alimentos inocuos, de cuestiones ambientales como calidad del aire, calidad y disponibilidad del agua, servicios básicos de saneamiento ambiental (una tercera parte de los mexicanos no disponen de agua potable y drenaje o letrinas), de zoonosis, pérdida de la biodiversidad, industrias y procesos contaminantes, sobreexplotación de la biosfera, cuya problemática cotidiana presenta dilemas que requieren de la bioética para ser adecuadamente atendidos.

Los problemas olvidados afectan a millones de individuos, en tanto que los temas de controversia, que están de moda, afectan sólo a cientos o acaso miles de seres.

1. Bioética e innovación

La bioética no debe ser refugio de los conservadores, sino palanca de apoyo para la evolución razonada, armónica y con equidad de la sociedad. Sin embargo, algunos grupos la han intentado usar para evitar cambios que sean contrarios a sus creencias. Algunas instituciones académicas privadas han impulsado a la bioética, en parte para intentar frenar avances en temas de controversia como clonación y otros enlistados por diversos autores. Se entiende que la sociedad, la comunidad y la familia traten de mantener la estabilidad y frenar los cambios, las innovaciones, sobre todo cuando las experiencias demuestran que el desarrollo, los bienes, el empleo, los servicios, los avances científicos y tecnológicos no se distribuyen con equidad a toda la población y se generan desequilibrios, distorsiones, presiones sociales y se afecta el medio ambiente. La importancia de la

educación radica en crear certidumbre para el cambio, la innovación, para abandonar lo establecido, lo acostumbrado, pero siempre que se logre un cambio constante, crecientemente favorable. Hay que inducir los cambios para que sean positivos, para que induzcan desarrollo para todos y no sólo crecimiento para unos cuantos, para que beneficien a toda la sociedad.

Los modelos de organización social tienden a perpetuarse ante el temor, no infundado por cierto, de que los cambios representan un riesgo. El trabajo en equipo y con atención especial a los grupos vulnerables de la sociedad da certidumbre a los procesos de aplicación de políticas públicas con mejor impacto en la sociedad.

Ante dilemas, muchos toman decisiones que protegen sus intereses, lo que provoca antagonismo, egoísmo y pérdida de valores. El resultado es que a pesar del progreso aparente hay mayor inequidad.

La desigualdad que aqueja a nuestra sociedad es provocada cuando los avances científicos y tecnológicos son accesibles sólo a grupos privilegiados de la sociedad; todos debemos comprometernos a evitar las distorsiones y, para el caso de que ya se han presentado, remediarlas (11).

En virtud de que toda acción relacionada entre humanos y entre humanos y la naturaleza o biosfera es susceptible de analizarse y definirse con el enfoque bioético, esta disciplina se ha ampliado de su espacio original y es ahora necesariamente multidisciplinaria, interdisciplinaria, transdisciplinaria y ante problemas complejos, intersectorial y multiinstitucional.

2. Bioética y desarrollo sustentable

El crecimiento demográfico, el desarrollo económico y la preservación del medio ambiente se dirigen en sentidos opuestos y se generan distorsiones, por lo que en busca del bien común el informe Brundtland de 1987 instrumentó el término *desarrollo sustentable* adoptado por la Comisión Mundial del Medio Ambiente y Desarrollo (12). El desarrollo sustentable satisface las necesidades actuales sin poner en riesgo la capacidad de generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades. El desarrollo, para que sea sustentable, requiere de la integración de las tres dimensiones: económica, social y medioambiental, en forma indisociable.

La economía es un elemento importante a tomar en cuenta en las decisiones, pero no el único. Muchas distorsiones sociales se han provocado por decisiones macroeconómicas contrarias a la *justicia distributiva* que

no toman en cuenta las repercusiones negativas de mediano y largo plazos en razón de las condiciones sociales, ambientales, sanitarias, tomando en cuenta a los grupos vulnerables.

Ha prevalecido hasta ahora una visión sectorial de los problemas y las políticas orientadas a su atención y solución han empleado indicadores independientes para el medio ambiente, la economía y la sociedad; los problemas se han visto como si estuvieran en compartimentos separados, con frecuencia las soluciones han resultado parciales y contraproducentes.

Al buscar el desarrollo, a menudo no se tiene cuidado de analizar y prever las consecuencias de los impactos, el deterioro ambiental se genera por la suma de las acciones negativas colaterales promovidas por la expansión agropecuaria, pesquera, industrial, por el crecimiento urbano, por las grandes obras de ingeniería cuando provocan daño a los ecosistemas, a la armonía social y que frecuentemente son trastornos accidentales en aras de un crecimiento económico. Para lograr el desarrollo sustentable se requiere que las acciones respeten el medio ambiente, sean socialmente equitativas y económicamente viables.

3. Organismos internacionales

Ante el surgimiento de los problemas y las posibilidades de su atención por la bioética, los organismos internacionales, especialmente los vinculados al sistema de la Organización de las Naciones Unidas, han creado grupos de estudio para apoyar a los países a hacer mejor uso de la bioética:

- La Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS) reunió a grupos de expertos para que discutieran el tema y desarrollaran una agenda común, editó en 1990 una publicación pionera, *Bioética, temas y perspectivas*, y en 1998 creó el Programa Regional de Bioética de la OPS, dirigido por Lolás en asociación con la Universidad de Chile.
- La Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) ha desarrollado vertientes de la bioética en varias direcciones. Destacan los grupos de estudio denominados Comité internacional de bioética y el Comité intergubernamental de bioética. Las principales declaraciones emitidas incluyen: Declaración universal del genoma humano y los derechos humanos, de 1997; Declaración internacional de datos genéticos humanos, de

2003. A nivel regional, la UNESCO, en mayo de 2003, constituyó en Cancún, México, la Red Latinoamericana y del Caribe de Bioética, para atender a más de 525 millones de habitantes; ésta ha impulsado a la bioética con reuniones de expertos realizadas en México y en otros países, así como publicaciones varias. También se ha preocupado por formar recursos humanos en bioética. Mención aparte merece la Declaración universal sobre bioética y derechos humanos adoptada por aclamación el 19 de octubre de 2005 (2).

- ❑ La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) ha incluido los aspectos éticos en producción, semillas, tecnología, ecología y pobreza (13).
- ❑ La Organización Mundial de la Salud Animal (OIE), constituyó un Comité internacional que organizó una conferencia mundial que emitió recomendaciones para adoptar directrices para el bienestar animal y las ha incluido en el Código Zoonosanitario Internacional 2006 (14).

III. Antecedentes de la bioética y su evolución en México

La bioética, como inicialmente la concibió Potter hacia 1970, tiene su origen en la ética, la ciencia, el humanismo y los valores de estas ramas del conocimiento (15). En México, dichos valores entre nuestros antepasados estaban bien arraigados, como lo demuestra Rocha (16); es grato reconocer el profundo pensamiento de los *aztecas* en torno a temas como dignidad de la persona, libertad, traición, tradición, virtud, vicio, autodeterminación, mujer, familia. Las descripciones encontradas en los códices Mendocino, Telleriano-Remensis y Florentino, destacan lo mucho que los aztecas tenían cómo valores universales. Desde esos tiempos, los mexicanos nos movemos en forma ambivalente entre la ignorancia, el desprecio y el olvido a nuestras raíces, así como el reconocimiento de nuestra fortaleza original y mestiza.

Por lo anterior, no debe sorprendernos que los esfuerzos seminales para divulgar los principios de la bioética en México hayan contado con se-

guidores esperanzados de encontrar en esta disciplina opciones para limitar ambiciones personales y canalizar acciones hacia el bienestar común.

1. Comisión Nacional de Bioética

La promoción visionaria de la Bioética como un instrumento conceptual primordial para guiar las decisiones en el sector salud, se inició con la constitución de la CNB tanto por el doctor Jesús Kumate, quien presidía el Consejo de Salubridad General (CSG), como por Manuel Velasco Suárez y sus seguidores. La creación de la CNB se llevó a cabo el 30 de marzo de 1992 en el CSG. Desde ese espacio se pugnó por renovar la misión del médico y defender los derechos del paciente, impulsando siempre el respeto a la dignidad humana para dar calidad a la vida.

México fue el primer país de América Latina que contó con una Institución gubernamental para promover la bioética a nivel nacional.

La bioética no es fácilmente comprendida por los ultraespecialistas, expertos en un componente, pero aún incapaces de enfocar los problemas de forma sistemática, integral, interdisciplinaria. Su comprensión se facilita con la madurez que alcanzan quienes han luchado por superar las condiciones de la sociedad y tienen visión y compromiso social marcados. En bioética destacan aquellos que tienen perspectivas, disciplinas y enfoques amplios.

Hombres de ciencia con visión de filósofos y filósofos con compromiso social, preocupados por mejorar el presente y construir un mejor porvenir fueron los pioneros en México. Su preocupación por la bioética surgió del contrasentido entre el deslumbrante progreso producto de la ciencia en beneficio de la humanidad y algunas aplicaciones inadecuadas, abusivas, dañinas a los enfermos e inequitativas para la sociedad.

En 2002, por acuerdo presidencial, la CNB se independiza del CSG y se constituye con carácter permanente como órgano desconcentrado de la Secretaría de Salud.

Algunas de las actividades relevantes desarrolladas por la CNB desde su creación, incluyen reuniones ordinarias del cuerpo directivo, sesiones académicas, seminarios, talleres y congresos nacionales y latinoamericanos y del Caribe, así como la promoción para la conformación de comités de bioética en servicios de salud e instituciones académicas y, de manera destacada, la conformación de las primeras comisiones estatales de bioética.

Los académicos de la CNB participaron en congresos y sesiones académicas tanto en México como en el extranjero, incluyendo sesiones en la Academia Nacional de Medicina en 1992, 1993, 2004 y 2005.

Los congresos de bioética promovidos por la CNB y difundidos con la edición de sus memorias, se realizaron entre 1994 y 2003, en cinco ocasiones, en la ciudad de México y uno en las ciudades de Guanajuato, Guadalajara, Tuxtla Gutiérrez, en 2002, y Monterrey, en 2003, respectivamente.

Debido al fallecimiento del doctor Velasco Suárez, en 2002 el doctor Cano Valle retoma las actividades de la secretaría ejecutiva con nuevo ímpetu. Sus acciones iniciales consistieron en ampliar la convocatoria a nivel institucional e impulsar un enfoque holístico. Se orientó a pasar de la etapa inicial de difusión de una mera bioética descriptiva, hacia una bioética analítica y estratégica.

La bioética inicialmente estaba orientada sólo a la salud individual, como parte de la medicina clínica, pero dejaba fuera el rol creciente de la salud pública, del medio ambiente, del sector rural, de la pobreza, áreas en las que se toman las grandes decisiones que afectan, para bien o para mal, a poblaciones enteras. Como consecuencia de lo anterior, se buscó pasar de la bioética orientada exclusivamente a atender a individuos enfermos en mal estado, a una bioética orientada a establecer políticas públicas para beneficio de las mayorías.

En febrero de 2003, en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, el Consejo Nacional de Salud acordó que en cada entidad federativa se integrase una Comisión Estatal de Bioética. En forma interina, el doctor Juan Garza Ramos ocupó en junio de 2003 la Secretaría Ejecutiva de la CNB; después de que se creó el Instituto Nacional de Medicina Genómica y desapareció la Comisión Nacional del Genoma Humano, el doctor Guillermo Soberón tomó la responsabilidad en agosto de 2004; en este contexto, la CNB se convirtió, en septiembre de 2005, en órgano desconcentrado de la Secretaría de Salud (3).

La Comisión Nacional de Bioética (CNB) ha realizado acciones normativas, consultivas, de investigación, educación, información y difusión, así como la edición de los Códigos de Bioética y de Conducta para el Personal de Salud, con el fin de difundir entre la sociedad y los profesionales, técnicos y auxiliares de la salud los principios y valores que deben regir el ejercicio de su actividad, fomentando el respeto y observancia de los

principios éticos en los servicios de salud; difusión de la bioética mediante *Summa Bioética*; seminarios, uno de ellos sobre "Prospectiva de la bioética" y el otro sobre "Bioética, desarrollo sustentable y salud"; asimismo, promovió la Conferencia Internacional "Responsabilidad Científica y Bioética: Llamado a los Científicos", organizada en 2003 por la Comisión Nacional de Bioética y el Movimiento Universal por la Responsabilidad Científica (MURS), Rama México.

De las discusiones y recomendaciones de los seminarios y eventos y de la realidad misma de las condiciones de nuestro país, se desprendió la necesidad de construir un modelo de organización tipo "Red nacional de bioética" que permita un desarrollo estratificado de las acciones que impulsen de manera articulada y coherente a la bioética.

Se busca lograr la articulación de la bioética en los diferentes niveles de atención a la salud (central, estatal, en las unidades operativas de salud y en otras instituciones como las educativas y de investigación). El modelo de la "Red Nacional de Bioética" presentado en los foros de discusión de expertos convocados por la UNESCO en el camino a desarrollar la Declaración de los Derechos Humanos y Bioética; responde además al acuerdo del Consejo Nacional de Salud en el sentido de que "se creará en cada entidad federativa una Comisión Estatal de Bioética".

La Red Nacional de Bioética se concibe como un sistema organizado normativo, consultivo, de información, difusión, enseñanza e investigación de la Bioética en la cual se integrarían las acciones de las comisiones y comités en sus diferentes niveles.

Operan crecientemente en muchos espacios *comités de bioética* que tienen como propósito apoyar a quienes deben tomar las mejores decisiones ante problemas y dilemas, grupos de estudiosos que se apoyan en los principios y valores de la bioética para servir mejor a la sociedad.

La necesidad y conveniencia de contar con grupos organizados para el conocimiento, discusión, análisis, recomendaciones, operación y emisión de políticas sobre temas de índole diversa de interés para la sociedad data de la antigüedad. Para quienes toman decisiones de índole profesional o tienen posiciones directivas, escuchar opiniones y recomendaciones de expertos resulta necesario y útil.

Las características de las comisiones y comités de bioética incluyen: ser independientes del cuerpo de gobierno de la institución; estar consti-

tuidos en forma interdisciplinaria por personal de reconocida probidad y criterio e incorporar la participación de personal de salud, representantes de los trabajadores y personas externas a la institución (miembros de la sociedad civil: abogados, pacientes o familiares); asesorar a otros comités de la institución (análisis de casos, investigación, morbilidad, higiene y seguridad, transplantes, calidad de la atención); coordinarse con la Comisión Nacional de Bioética, las comisiones estatales y los comités institucionales, según sea el caso, para armonizar sus tareas; las comisiones podrán organizarse de manera idónea de acuerdo con las particularidades y prioridades: autonomía, condiciones geográficas, políticas económicas. Sus programas y acciones estratégicas pertinentes se han de jerarquizar para hacerlos congruentes con las necesidades sociales prioritarias a fin de promover la armonía y el desarrollo social.

Cuando los comités de bioética se dedican a la atención de problemas de salud pública, desarrollo social, combate a la pobreza, educación, cultura, ciencia y tecnología, producción y abasto de alimentos inocuos, preservación y uso racional del medio ambiente, del agua, la biodiversidad, cuando su objeto de estudio va mucho más allá de la atención a individuos, cuando la responsabilidad de la bioética es hacia las poblaciones, se les ha llamado comités de macrobioética (2).

La Ley General de Salud y la legislación mexicana obliga a la creación de comités institucionales y de investigación sobre temas de bioética en diversas instituciones con enfoques varios (Ley General de Salud: Arts. 100, 316; Reglamento en materia de investigación para la salud: Art. 14 y demás relativos).

Además, la bioética resulta primordial en otros esfuerzos como los educativos, ambientales, alimentarios, normativos y de protección social. Se requiere que la población en general y en particular los servidores de la salud, hagan conciencia de que la bioética incluye la medicina pero rebasa sus linderos, se necesita difundir sus alcances, integrar la red de comisiones de bioética en las instituciones sanitarias y de educación y lograr que las instituciones que aplican, investigan, enseñan bioética o requieren de ella para la toma de mejores decisiones, formen parte de dicha red.

La bioética requiere entrar en una etapa de diseminación académica, profesional e institucional; ahora debe estimular acciones y programas

para propiciar el desarrollo de valores y actitudes en los servidores públicos y privados de la salud y campos afines.

Se estima que para mejorar la atención médica y en salud es necesario, indispensable e impostergable la creación de comités de bioética en las unidades hospitalarias, así como comités en otros espacios de salud, académicos y de toma de decisiones, públicos o privados, que tendrían como funciones esenciales educar, aconsejar y dar directrices sobre los conflictos, dilemas y deliberaciones para alcanzar un verdadero desarrollo humano.

2. Bioética en investigación

Debe asegurarse, que cumpla con las disposiciones de la OMS y de otros organismos internacionales y con las leyes, reglamentos y normas mexicanas, no debe producir efectos dañinos en los seres sujetos de investigación, sean aquéllos físicos, psicológicos y sociales, pero tampoco daños económicos ni políticos (17).

La ciencia es objetiva y tiene normas éticas y protocolos que deben adecuarse a las condiciones nacionales y regionales, las de los países centrales no siempre se pueden aplicar en Estados periféricos o semiperiféricos. La barrera educativa provoca que la problemática fundamental esté constituida por la diferencia de información entre el médico-investigador y el enfermo-investigado. Otros casos son la experimentación farmacológica, la utilización de elementos prohibidos en otros países o la experimentación como promesa de otorgar servicios de salud.

La aplicación de las normas bioéticas en la investigación en seres humanos, debe hacerse y practicarse todo el tiempo, que se acepten por convicción y no por imposición.

3. Rol de los académicos en investigación

Ha habido confusión en el sector académico del mundo, y de México en particular, ya que algunos sectores consideran que la ciencia sólo puede estar orientada a la obtención de nuevo conocimiento; quienes se dedican a la aplicación del conocimiento a la solución de problemas, son considerados por el sector "purista" como "no científicos" y de hecho son menospreciados y excluidos de los programas de apoyo a investigadores, como el Sistema Nacional de Investigadores (SNI). Científicos distinguidos han expresado la necesidad de establecer un *nuevo contrato social* de las comunidades académicas.

micas que implica que la comunidad de ciencia y tecnología habrá de invertir además de su tradicional atención a la investigación básica, un creciente esfuerzo a la búsqueda de respuestas a problemas de la sociedad, en especial aquellos orientados en lograr un desarrollo crecientemente sustentable (18). En el Foro internacional entre la CNB y el MURS sobre Responsabilidad Científica y Bioética, se recomendó que la comunidad académica participe en la toma racional de decisiones, de políticas públicas (19).

Integrar un modelo que permita una fluida canalización tanto de las demandas sociales hacia los sectores científicos como de las aportaciones de las comunidades a la solución de sus problemas y que éstas se distribuyan con equidad a todos los sectores. La ciencia no sólo debe desarrollar nuevos conocimientos, además debe orientarse a la solución de problemas, que esta aplicación busque el beneficio colectivo, que la ciencia se desarrolle con responsabilidad, fueron otras propuestas. Se incluyó una llamada de alerta, de precaución, no se trata de hacer las cosas diferentes sino mejor. No todo cambio es crecimiento, no todo movimiento es un avance, procurando lo mejor a menudo estropeamos lo que está bien.

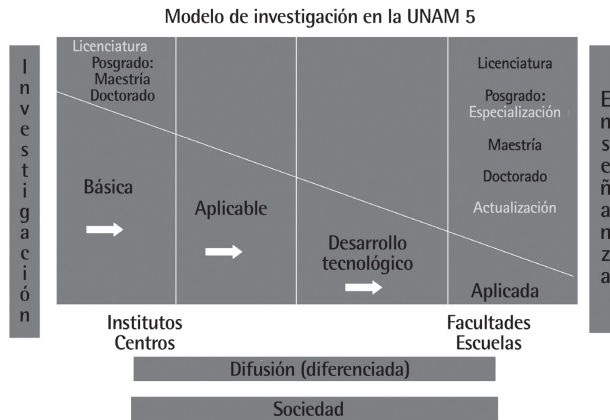
Esta problemática está siendo abordada por la comunidad mundial de científicos y en diversas sesiones convocadas por la UNESCO; en este contexto, el Consejo Internacional para la Ciencia (ICSU) se ha adoptado que la ciencia tiene diferentes objetivos y dimensiones: *a)* Ciencia para el conocimiento, conocimiento para el progreso; *b)* ciencia para la paz; *c)* ciencia para el desarrollo; *d)* ciencia en la sociedad; *e)* ciencia para la sociedad.

Con esa clasificación, los científicos que realizan sus actividades en cualquiera de los campos señalados deberían tener el mismo reconocimiento de sus comunidades, instituciones y la sociedad.

Siendo la bioética un campo emergente, los grupos de estudio que la impulsan en el mundo son predominantemente académicos y los principios que la rigen se conocen y aplican en forma desarticulada, dispersa y con una cobertura parcial, debido a que los intereses corresponden a individuos. Las instituciones son las que deben desarrollar sus trabajos para que sean creativos, rigurosos, relevantes, pertinentes, de acuerdo con prioridades y que retroalimenten a los contenidos educativos.

Los científicos de México se han caracterizado con valiosas excepciones por trabajar de manera inconexa, descoordinada; para que sus esfuerzos dispersos y aislados tengan congruencia, por ello este autor ha

propuesto un modelo para la investigación en la UNAM, aplicable al resto del país, que eslabona los esfuerzos de la investigación básica, aplicable, el desarrollo tecnológico y la innovación junto con la formación de recursos humanos desde los niveles de licenciatura hasta el doctorado.



El impacto en la sociedad y en la naturaleza de la ciencia y de la tecnología impone responsabilidades y deberes no sólo a científicos, tecnólogos e innovadores, sino también a gestores, profesores y comunicadores de la ciencia, tanto como a los responsables de las políticas públicas y privadas sobre la ciencia y la tecnología, a los gobernantes, a los empresarios e industriales y a los miembros de la sociedad civil.

La ciencia y la tecnología dependen de la sociedad que las sostiene, y la afectan tanto que no hay justificación ética para que los ciudadanos queden al margen de la discusión y de la gestión de las políticas de desarrollo, y de vigilancia y control de los riesgos que generan. Lo que justifica a la ciencia y a la tecnología es su contribución al bienestar de los seres humanos, a la satisfacción de sus necesidades, mientras no produzcan daños innecesarios a los animales ni al ambiente.

México tiene científicos que requieren abordar a la ciencia con emoción y con la conciencia de nuestros valores morales, dar certeza, certidumbre en el modelo de la ciencia que se aplique en México, ciencia por el conocimiento, por la paz, por el desarrollo, en la sociedad, que busque el beneficio colectivo, dentro de lo previsible, lo necesario y lo posible, que la ciencia se desarrolle con responsabilidad, es el contenido de esta propuesta.

4. Aplicaciones de la bioética en otros campos

En México la bioética surgió dentro de la medicina en el sector salud y filosofía (20), pero pronto se diseminó a otras disciplinas, educación, medio ambiente, odontología, biomedicina y medicina experimental y medicina veterinaria y zootecnia (21-23).

En el *sector privado*, las industrias farmacéutica transnacional y nacional han incorporado a la bioética en sendos comités de bioética, influenciadas por sus corporativos y el entorno que genera la competencia, en lo referente a los aspectos médicos, de investigación y otros espacios.

Otro tanto ha ocurrido en las empresas en lo referente a los aspectos administrativos en los que por corrupción y falta de transparencia imperantes, se introdujeron temas de bioética con gran aceptación. Las bolsas de valores del mundo exigen ahora que las empresas cumplan requisitos de transparencia y controles internos. Los elementos objeto de estos análisis sobre el comportamiento empresarial incluyen largas listas, como ejemplos: los fines de las empresas, su responsabilidad social, organización, equilibrio entre sus dimensiones social (seguridad laboral, salarios, prestaciones, mercadotecnia), económica, legal, fiscal, ambiental, desde los puntos de vista de trabajadores, directivos, accionistas, usuarios o consumidores, Está de moda, diría afortunadamente, la *certificación de las empresas* en lo administrativo y aún más allá, como *industrias limpias*, o *industrias socialmente responsables*.

Otro tanto ha ocurrido con las dependencias de los *sectores público*, federal, estatal, municipal y organismos paraestatales. En el gobierno federal, los cambios recientes en la Secretaría de la Contraloría que fue transformada a Secretaría de la Función Pública, así como la creación del Instituto Federal de Acceso a la Información (IFAI) corresponden al cambio administrativo, estructural y legal que se vive en el mundo y en nuestro país.

IV. Antecedentes y evolución de la bioética en medicina veterinaria

Además de las relaciones históricas en la medicina antigua ya descritas, los conceptos de *una sola salud y una sola medicina* (24), obligan a aplicar las inquietudes surgidas en el medio de la salud humana al campo de la me-

dicina veterinaria. En efecto, las une de manera clara la salud pública veterinaria con sus estudios comunes de zoonosis, enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), medicina experimental, biomedicina, saneamiento ambiental, entre otros.

En la medicina experimental, los estudios con animales de laboratorio han provocado expresiones de alerta por el respeto que merecen los seres que han permitido los principales avances médicos.

Las preocupaciones por desarrollar una buena medicina se enriquecieron cuando surgieron expresiones de respeto y aprecio a los animales que en aras de la ciencia frecuentemente eran sometidos a crueldades innecesarias. Algunos dichos lo documentan: “La cuestión no es si los animales pueden razonar ni tampoco si pueden hablar, sino ¿pueden sufrir?”, según Jeremy Bentham, hacia 1780. En México destaca: “La protección a los animales forma parte esencial de la moral y de la cultura de los pueblos civilizados”, expresada por Benito Juárez, en 1849.

Algunos hitos históricos sobre los esfuerzos por aumentar el respeto y evitar la crueldad a los animales incluyen:

- ❑ **1822:** Ley del Parlamento británico prohibiendo el trato cruel a los animales de tiro.
- ❑ **1876:** La ley británica sobre la crueldad para con los animales regula la experimentación animal.
- ❑ **1938:** Primera normativa elaborada por la agencia Food and Drug Administration, exigiendo la investigación, durante un mes, en ratas de cualquier producto destinado al tratamiento de seres humanos.
- ❑ **1951:** Christine Stevens funda en Estados Unidos de América el Animal Welfare Institute.
- ❑ **1959:** William M.S. Russell y Rex L. Burch proponen en *The Principles of Humane Experimental Technique* la regla de las “tres R” de la experimentación animal: reemplazar los animales por métodos alternativos *in vitro*, reducir racionalmente el número de animales utilizados en cada experimento y refinar las técnicas para evitarles a éstos, en lo posible, cualquier sufrimiento.
- ❑ **1966:** Se aprueba en los Estados Unidos de América la Animal Welfare Act.

- ❑ **1978:** Declaración Universal de los Derechos del Animal por la UNESCO.
- ❑ **1979:** El H. Consejo Técnico de la FMVZ-UNAM aprueba la Guía para el buen trato de los animales de experimentación y enseñanza.
- ❑ **1981:** Ley de protección a los animales para el Distrito Federal. *DOF*. Enero 7 de 1981.
- ❑ **1985.** Se publica en el *DOF* la Ley General de Salud, que establece comités de ética en investigación que incluyen el cuidado de los animales de experimentación.
- ❑ **1993:** Se publica en el *DOF* la Ley Federal de Sanidad Animal que incluye el capítulo III. Del trato humanitario, cuidado zosanitario y técnicas de sacrificio de animales. Artículo 17.
- ❑ **2006:** La OIE edita dentro del Código Zosanitario Internacional el Anexo 3.7.1. Introducción a las directrices para el bienestar de los animales.

Como se ha señalado, reglamentos y guías para el buen trato de animales de experimentación y enseñanza se han publicado en muchos países del mundo (14, 25).

En México, el liderazgo de la primera escuela de medicina veterinaria de América desde 1853 se ha hecho evidente por sus iniciativas en este campo como en otros. En 1978, el H. Consejo Técnico de la FMVZ de la UNAM aprobó la Guía para el buen trato de los animales de enseñanza y experimentación.

El impulso de algunos profesores líderes por dar buen trato a los animales ha trascendido el campo profesional tradicional de la medicina veterinaria y zootecnia. Schnaas y Schunemann, en la Academia Nacional de Medicina, hicieron presentaciones impulsando el rol de nuestra profesión en la biomedicina y buscado su superación (26). Otros MVZ, miembros de dicha Academia, han seguido su ejemplo.

La Academia Veterinaria Mexicana también ha realizado acciones de impulso a la incorporación de la bioética al quehacer científico y profesional, entre ellas destaca la reunión interdisciplinaria e institucional convocada junto con la Academia de la Investigación Científica, por sus presidentes, Aréchiga y Garza, en 1991, para el buen trato de los animales de experimentación.

Schunemann ha dedicado su vida y obra a causas tan nobles como la introducción de métodos apropiados de sacrificio en rastros, que finalmente se han reflejado en la legislación y en otros temas no menos importantes relacionados con nuestra responsabilidad para con los animales.

En este sentido, el papel de las sociedades de protección de animales ha sido buscar también el respeto y protección de los animales pero de manera emocional, compasiva, en ocasiones alejada de los fundamentos científicos. Han determinado que se debe proteger a todos los animales, sin separar a aquellos que por ser responsables de la producción o transmisión de enfermedades y no vivir en equilibrio con el resto de los seres vivos, son nocivos para la salud animal, la salud humana o el equilibrio ecológico. Los ejemplos más evidentes están en los animales transmisores de enfermedades (murciélagos hematófagos infectados con virus rábico e insectos como mosquitos), parásitos (cisticercos), reptiles venenosos (27).

La obligación de respeto a los animales tiene un fundamento científico y ha quedado cubierta en el cuerpo legislativo construido en los años recientes en leyes, reglamentos y normas, en los ámbitos nacional e internacional (25, 28).

1. Campos de aplicación de la bioética en medicina veterinaria y zootecnia

Incluyen, entre otros, bienestar animal, individual, colectivo, biomedicina, investigación, enseñanza, producción, medio ambiente, fauna, salud pública veterinaria, economía, administración, industria, comercio. Si todas las relaciones entre el hombre con sus semejantes y entre los humanos y el resto de los seres vivos son objeto de estudio y análisis por la bioética, se entiende que las actividades profesionales de la medicina veterinaria y zootecnia estén comprendidas.

El *riesgo ambiental de actividades pecuarias* merece mención especial, basta señalar que algunos de los impactos ambientales más graves ocurren por los residuos en alimentos, la contaminación que los hace no inocuos, impactos negativos por inadecuada operación de granjas, corrales de engorda, rastros, empacadoras, industria peletera, cadáveres de animales muertos o sacrificados en epidemias, desechos de la industria farmacéutica cuando no son sometidos a los tratamientos y manejo señalados en las leyes, reglamentos y normas. La mayoría de las enfermedades

emergentes que aquejan a las regiones del mundo y amenazan en convertirse en pandemias son zoonosis. Algo similar ocurre con los agentes infecciosos que pueden utilizarse en bioterrorismo. Su aparición se explica por alguna de las siguientes causas o sus combinaciones: calentamiento global, invasión por humanos o animales productivos de territorios de reserva de la biodiversidad, caza de fauna silvestre, globalización, migración y viajes de personas, animales y mercancías pecuarias, hacinamiento de personas y de personas con animales de distintas especies juntas, mercados de animales vivos, carencia de saneamiento básico y de bioseguridad, entre otros aspectos.

La preocupación de los líderes profesionales por impulsar un ejercicio profesional ejemplar les ha motivado a organizarse en diferentes formas. Una de ellas es a través de un Comité de Honor y Justicia, otra modalidad ha sido preparar y publicar códigos. Destacan el Código de ética profesional del MVZ en México, de 1999, y el Código de ética y bioética del MVZ de la Federación de Colegios y Asociaciones de Médicos Veterinarios Zootecnistas de México.

Especial mención puede hacerse a la aplicación de la bioética a la solución de dilemas en los zoológicos de la ciudad de México. Ante el estado lamentable en que se encontraba la colección por descuidos inaceptables y falta de decisiones científicamente sustentadas (29), se creó una Comisión de Bioética para asesorar a la Dirección General de Zoológicos del Gobierno del Distrito Federal, de reciente conformación, en la toma de decisiones sobre los animales que debían conservarse, desecharse e impulsar su reproducción. La Comisión fue integrada con representantes de diversas instituciones académicas, normativas, expertos, y sus resultados fueron tan favorables que en la reorganización de 2001 se incluyó en la estructura una Dirección de Área de Bioética. Las funciones y recomendaciones de dicha Comisión se orientan a asegurar que estos museos vivos, que son de los más visitados del mundo, cumplan en equilibrio las funciones básicas: educación, investigación, conservación y recreación.

Otras profesiones también tienen sus propios códigos que regulan el ejercicio profesional tendiendo un puente entre los aspectos legislativos y los compromisos de los profesionales con la sociedad. Prácticamente todas las profesiones de la salud tienen sus códigos vigentes, ya que en este campo las exigencias sociales son vastas.

En la profesión médico veterinaria hay especial interés por impulsar estos temas. En recientes congresos y reuniones de la Academia Veterinaria Mexicana, de la Fed.MVZ, del Consejo Técnico Consultivo Nacional de Salud Animal (Conasa), de la AMEFMVZ, AMMVEB y otras destacados organismos se han incluido presentaciones sobre temas de bioética.

V. Educación de la bioética

La educación, seguida por el ejemplo, es el principal elemento contra la corrupción y simulación que aquejan a la sociedad.

Impulsar la enseñanza de la bioética en las distintas carreras del área de la salud, fue una tarea fundamental de la CNB en sus primeras etapas. Se impulsó una Liga Estudiantil de Bioética, que en muchas universidades estimuló a los propios académicos a atender esta disciplina. El resultado es que en muchas carreras la bioética se ha integrado formalmente en los planes de estudios como asignatura y como contenidos de bioética integrados a las asignaturas del plan de estudios, en otros casos, como asignatura extracurricular o como seminarios de integración.

La enseñanza de la bioética permitirá estandarizar perfiles profesionales y planes de estudio por carrera en el país, lo que será un máximo ético dentro del ideal de la educación profesional.

Para que la enseñanza de la bioética sea útil y aprehendida realmente por los estudiantes, es necesario que los conocimientos y habilidades éticos se enseñen en sincronía y se integren a los conocimientos, habilidades, actitudes y competencias profesionales; además, las instituciones académicas deben ser congruentes con sus planteamientos.

Las evaluaciones de la enseñanza de los temas de la bioética se toman en cuenta en los procesos de acreditación y certificación en varias carreras de la salud, entre ellas medicina, odontología, enfermería y ahora también en medicina veterinaria y zootecnia; *el Consejo Nacional de la Educación de la Medicina Veterinaria y Zootecnia (Conevet) ya recomienda la inclusión de la asignatura de bioética en el primer semestre en todas las facultades y escuelas de MVZ de México (30).*

Atendiendo a la importancia creciente de la bioética en diversos ámbitos del mundo contemporáneo, como son la atención médica y hospitalaria, la investigación genética y biomédica, los avances de la

tecnología en general y de la biotecnología, en particular, el Programa de Posgrado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, ofrece en la UNAM, desde 1999, los estudios de maestría y doctorado en ciencias con campo de estudio principal en bioética. Este posgrado tiene como entidades participantes a las facultades de Medicina, de Filosofía y Letras y de Psicología. El título otorgado es maestría o doctorado en ciencias. Todos los postulantes necesitan cursar un propedéutico. También participan en él tutores del Instituto de Investigaciones Filosóficas, del Instituto de Investigaciones Jurídicas, de la Facultad de Psicología y de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, todas de la UNAM.

VI. Evolución de la enseñanza de la medicina veterinaria en México

En el periodo 1853-1929, la enseñanza de la veterinaria en México se hizo primero en la misma institución académica, en conjunto con la de agricultura y a partir de 1916 se independizó como Escuela Nacional de Veterinaria, y en 1918 como Escuela Nacional de Medicina Veterinaria, cambio de denominación de gran trascendencia, al hacer explícitos dentro de la profesión los aspectos médicos y de salud pública, pero aún dentro del Ministerio de Agricultura y Fomento.

Al incorporarse a la Universidad Nacional Autónoma de México en 1929, la riqueza de la interdisciplina, el diálogo con los temas científicos y humanistas, enriquecieron el compromiso social de la institución y sus egresados. Como institución y profesión universitarias, los estudiantes se formaron con juicio orientado a satisfacer las necesidades de la sociedad además de impulsar los aspectos productivos, médicos y de la higiene y salud pública. Al celebrarse los 25 años como institución independiente, Sarvide, en 1941, narró la búsqueda del beneficio colectivo, la utilidad social de la profesión, la capacitación para actuar juiciosamente en la resolución de los problemas. Todos estos propósitos forman parte de la bioética actual, pero no estaban explícitamente reflejados en los nombres de las asignaturas, sino distribuidos en los diferentes contenidos programáticos.

En 1969 se incorporaron en el plan de estudios de la carrera las asignaturas de Filosofía de la medicina veterinaria y zootecnia, Historia de la medicina veterinaria y zootecnia, Teoría de la dialéctica y la retórica con contenidos claramente orientados a imbuir el humanismo en los estudiantes. En 1979 se inició la enseñanza para preparar a los futuros egresados a contender con los graves rezagos tecnológicos y sociales en el medio rural con la asignatura de Extensionismo.

En el plan de estudios de 1993 esas asignaturas desaparecieron y sus contenidos se concentraron en la materia de Introducción a la medicina veterinaria y zootecnia para dar a los alumnos desde el primer semestre una panorámica de lo que representa el campo de trabajo y las responsabilidades de los egresados de la carrera. Los temas de corte humanístico estaban incluidos en dicha asignatura.

En el plan de estudios aprobado por el Consejo Académico del área de la Ciencias biológicas y de la salud, de la UNAM en 2005, se ha incluido como asignatura independiente Seminario de bioética.

El origen de la incorporación de esa asignatura como materia independiente se sustenta en el trabajo creciente institucional sobre los temas de esta disciplina y el carácter excepcional, pionero de profesores comprometidos, como Aline Schunemann y Aurora Velázquez, ambas profesoras eméritas de la UNAM. Además, el H. Consejo Técnico de la Facultad comisionó al autor de este escrito a la Comisión Nacional de Bioética (CNB) en 2002 y desde ahí, después de dirigir un seminario de bioética, salud y desarrollo sustentable, y como encargado de la Secretaría Ejecutiva de la propia CNB de la SSA, propuso al Dr. Luis Zarco, presidente del H. Consejo Técnico de la Facultad, en enero 21 de 2004, la incorporación de manera explícita en el plan de estudios de una asignatura de bioética.

Desde hace más de 15 años se puso a discusión si la bioética debería ser una materia independiente en los planes de estudio universitarios. En algunas carreras como la de medicina, la solución ha sido incorporar los temas de bioética dentro del curso de Historia de la medicina. En otras carreras como medicina veterinaria y zootecnia, la solución ha sido tener una asignatura como seminario de bioética. La discusión estriba en que en una sociedad tan tecnificada como la actual, los temas filosóficos pudieran resultar áridos y, por tanto, susceptibles de rechazo por la comunidad estudiantil.

Cuando se hizo la consulta a la comunidad de la FMVZ para la modificación del plan de estudios, se ratificó la propuesta en junio 14 de 2004, con una guía temática de tipo teórico-práctico para que los alumnos recibieran los fundamentos de la bioética como puente del saber entre las ciencias y las humanidades y aprendieran a analizar los dilemas éticos que se presentan en los diferentes campos del ejercicio profesional. De acuerdo con la legislación universitaria, los profesores de la nueva asignatura deben ser inicialmente los de la asignatura equivalente en el anterior Plan de estudios.

El enfoque consiste en preparar a los futuros MVZ como actores sociales para que puedan debatir de manera ordenada los dilemas relevantes para lograr su esclarecimiento, de manera que identifiquen los diferentes enfoques, señalando las vías para alcanzar consensos o acercamientos. Como señala Soberón: "Se trata de encontrar puentes de entendimiento, fórmulas aceptables para una convivencia tolerante, respetuosa de las divergencias, en beneficio de la sociedad". Se pretende desarrollar una actitud de reflexión, deliberación y discusión multicultural, multidisciplinaria e intersectorial de temas relevantes inherentes a la vida humana, animal y a la biosfera, en un clima de pluralidad, tolerancia y respeto. La bioética en medicina veterinaria y zootecnia procura impulsar la vocación social que atienda los dilemas que se generan a partir de la polarización económico-cultural de nuestra sociedad y del enorme impacto que tienen los altos índices de pobreza de un porcentaje inadmisiblemente de mexicanos y dar prioridad a la atención de los grupos que se encuentran en desventaja, que son vulnerables.

La descripción de la asignatura de Seminario de bioética puede consultarse en:

http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/p_estudios/Asignaturas/Obligatorias/2o%20semestre/SEMINARIO%20DE%20BIOETICA.doc

Los temas que señala el temario que actualmente sirve de guía didáctica en forma resumida incluyen:

1. PROGRAMA DE LA ASIGNATURA: Seminario de Bioética.
2. SEMESTRE: Segundo.
3. CICLO: Básico.

4. AREA: Medicina y salud animal, producción y economía pecuaria, salud pública, protección del ambiente y cuidado de los ecosistemas.
5. ÁREA: CARÁCTER: Obligatorio.
6. CLAVE: 1214
7. HORAS/SEMANA/SEMESTRE:
Teóricas: 1 Prácticas: 1
7.1 CRÉDITOS: 3
8. MODALIDAD: Seminario.
8.1 TIPO DE ASIGNATURA: Teórico-práctico.
9. ASIGNATURAS CON LAS QUE HAY SERIACIÓN:
Antecedentes:
Manejo y Aprovechamiento de los Recursos Naturales;
Comportamiento, Manejo y Bienestar Animal.
Subsecuentes:
Nutrición Animal; Marco Legal de la Medicina Veterinaria y Zootecnia.
10. OBJETIVOS GENERALES:
 - Fomentar el desarrollo del espíritu humanista en la profesión veterinaria.
 - Al finalizar el curso el alumno adquirirá una conciencia de respeto hacia todas las formas de vida, desarrollará habilidades para analizar y resolver los problemas éticos que se presentan en la práctica profesional, y estará mejor capacitado para tomar decisiones responsables, que beneficien tanto al ser humano como a los animales.

Bibliografía

Metodologías de la enseñanza y de aprendizaje:

- Se permite la invitación a expositores con amplio conocimiento del tema.
- Exposición del profesor (oral, con imágenes y videos)

- ❑ Lecturas comentadas y noticias periodísticas relacionadas con los temas.
- ❑ Revisión y estudio de casos.
- ❑ Discusión guiada en grupos.
- ❑ Solución de problemas teóricos y prácticos.
- ❑ Analogías.

Prácticas

Consistirán en lecturas y planteamientos de casos en los que el alumno se enfrentará a dilemas éticos que se presentan en el ejercicio cotidiano de la medicina veterinaria y zootecnia.

Dichos casos se analizarán y discutirán en equipos, posteriormente se expondrán ante el resto del grupo junto con propuestas bien fundamentadas de las soluciones que sean éticamente adecuadas.

La impartición del seminario debe evitar un desarrollo disparado en virtud de que algunos docentes están motivados para hacer un énfasis muy elevado en la aplicación de la bioética orientada al buen trato y bienestar de los animales. Esto último es correcto, pero las aplicaciones de la bioética son mucho mayores a ese importante campo, por lo que los profesores deben abordar otros temas relevantes que requieren un análisis bioético, como inocuidad de alimentos, aplicación de fármacos, vacunas, antiparasitarios, mercadotecnia, atención a clientes, grupos vulnerables, pobreza, salud pública veterinaria. La decisión del H. Consejo Técnico de la FMVZ-UNAM, en 1993, para que quienes impartieran Introducción a la medicina veterinaria y zootecnia fueran personas con experiencia, dentro y fuera de la UNAM, con visión amplia de la problemática y campo de acción del gremio (varios exdirectores y funcionarios universitarios, gubernamentales y del sector privado) es, por supuesto, igualmente válida para la impartición del Seminario de bioética.

Desde el punto de vista didáctico, los grupos deben ser reducidos, ya que se trata de un seminario en el que los alumnos juegan un papel primordial y se requiere estimularles para que participen activamente en el desarrollo de la clase.

Las leyes, normas, códigos, enseñanza, reglamentos de la FMVZ, otras entidades académicas de la UNAM como el IIBM (31), conforman un

cuerpo doctrinario y legal que sirve de base para enfrentar algunos retos aún pendientes.

La formación en bioética no termina con la impartición del seminario de bioética en el segundo semestre. En las materias aplicadas desde la propuesta original de enero de 2004 se estableció que “en las asignaturas aplicadas de los campos clínico, de producción animal, de ecología, de economía y administración y de salud pública se incluyan estudios de casos que permitan a los alumnos realizar análisis ordenados para la solución práctica de dilemas que habrán de resolver una vez que ejerzan como MVZ”. Reuniones periódicas del personal académico responsable de la enseñanza de la bioética y de las aplicaciones de la bioética, armonizan la impartición de los temas tanto en el seminario de bioética como su aplicación en el resto de las disciplinas mediante estudios de casos.

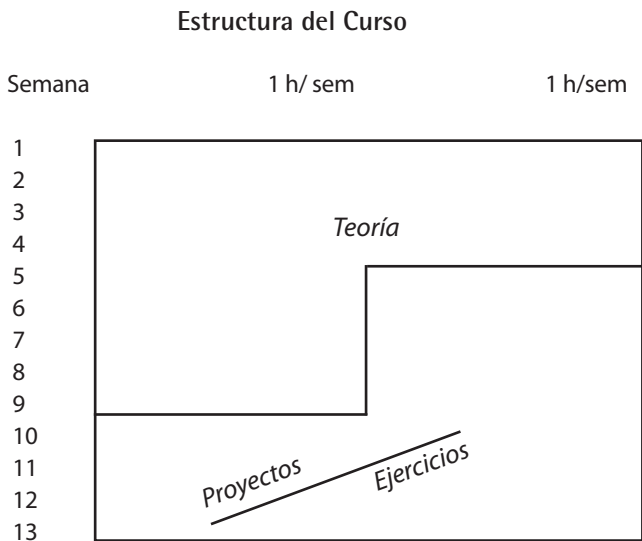
Para el caso de la FMVZ-UNAM, la aprobación de la bioética con la *modalidad de seminario* permite a los alumnos aprender el abordaje de método de estudio de casos en forma práctica, que puede ser sobre dilemas sencillos simulados o participando en el análisis de situaciones reales bajo una guía que permita alcanzar las mejores recomendaciones de acuerdo con las circunstancias para cada uno de los casos analizados; por ejemplo, sobre el perfil de las condiciones sanitarias de alimentos expendidos en la zona metropolitana de la ciudad de México.

El *estudio de caso* implica una metodología que facilita la solución de problemas aparentemente complejos, que pueden ser analizados de manera secuencial, de preferencia por un equipo de trabajo que puede constituir un comité permanente o temporal, según corresponda, para analizar un caso o diversos dilemas que se presenten en una institución o comunidad. Rollin (32) incluyó en su libro sobre ética médico-veterinaria un importante número de casos que requieren adaptarse y enriquecerse con las condiciones que ocurren en Latinoamérica y otros países en desarrollo. Las estrategias didácticas de la técnica de estudio de casos se pueden consultar en varias publicaciones (33, 34) y en la aplicación a la enseñanza de las ciencias en la Universidad de Buffalo en:

<http://ublib.buffalo.edu/libraries/projects/cases/case.html>

La estructura académica para la enseñanza de la bioética está aún en desarrollo, como ejemplo se muestra en la figura el modelo desarrolla-

do en Dinamarca, que está siendo adoptado y adaptado en otros países de la Unión Europea (35).



En la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM se ha establecido la sana tradición de que los futuros egresados al concluir los trámites para su titulación lean el juramento profesional y se comprometan a cumplirlo permanentemente. Este documento ha evolucionado de acuerdo con los cambios en la visión y misión de la profesión médico veterinario zootecnista. La versión actual es la siguiente:

Consciente de la obligación que acepto como profesional, en este momento solemne, juro que emplearé mis conocimientos y habilidades en beneficio de la sociedad, a través de la protección y cuidado de la salud de los animales, procurando siempre su bienestar y salvaguardando la salud pública y la seguridad e inocuidad alimentarias.

Me esforzaré en incrementar, dentro de lo posible, la producción animal y en conservar

los recursos naturales, evitando el deterioro ecológico.
Cumpliré con la legislación, los reglamentos
y las normas que nos rigen.
Transmitiré con generosidad mis experiencias y
conocimientos a los miembros de esta profesión y
a sus aspirantes. Acepto la obligación de mejorar
continuamente mis conocimientos y competencias
profesionales. Guardaré gratitud a mi Facultad
y a mi Universidad.
Me conduciré con honradez, dignidad y prudencia,
observando siempre los principios éticos, a fin
de llevar con honor el título de Médico Veterinario
Zootecnista que ahora recibo de la Universidad
Nacional Autónoma de México.

*Propuesto por la Comisión de exdirectores y profesores eméritos y aprobado por
el H. Consejo Técnico de la FMVZ-UNAM en diciembre de 2005.*

Otros espacios de la bioética

La Academia Nacional de Medicina, la Academia Veterinaria Mexicana, la Academia Nacional Mexicana de Bioética, el Colegio de Bioética, A.C., son algunas de las organizaciones no gubernamentales que se han constituido específicamente o tienen grupos organizados para el estudio y la promoción de la bioética en México. En todas ellas han destacado egresados de la medicina veterinaria y zootecnia.

a) Bioética y legislación

La bioética propone decisiones, recomendaciones, soluciones prudentes, no sanciona, su actuar no es deontológico. Sin embargo, se complementa con la legislación, que establece compromisos y determina cuáles son de carácter obligatorio; ambas deben sumarse. En este contexto, ciertos sectores de la sociedad, en particular algunas empresas y ciertos profesionales, no cumplen con las disposiciones y lamentablemente las posibilidades de la autoridad para hacer cumplir las disposiciones no se ejercen por un sinnúmero de motivos. Ahí surge una oportunidad para la bioética, para

que más allá de lo que establecen las leyes, de hacer las cosas bien, correctas por obligación, surge una necesidad intrínseca del ser humano por hacer lo correcto, lo bueno, no necesariamente lo conveniente para uno mismo o los intereses que representa, sino para el bien común; ahí entra la aplicación de la bioética por convicción. Todos tenemos en nuestro ser un contrapeso y una guía para hacer el bien, para aplicar genuinamente a la bioética; se trata de la conciencia. Sin embargo, quienes están preparados profesional y académicamente tienen las metodologías, capacidades y sensibilidad para hacerlo de manera apropiada.

VII. Propuestas y retos

Se propone a los profesionales de la medicina veterinaria y zootecnia e instituciones relacionadas con esta disciplina, que faciliten y se integren redes del capital social, hoy desarticulado, que se incluya en su forma de trabajo siempre la atención a los principios de la bioética, que se formen y trabajen los comités o grupos de trabajo como verdaderos contrapesos de los sectores poderosos, de los intereses creados, los que procuran influir en su beneficio propio.

En particular, la aplicación de la bioética permite:

- ❑ Atraer a los diversos actores e instituciones públicas y privadas para que se sumen al diálogo, la discusión, la deliberación, y tomen sus decisiones con fundamento bioético.
- ❑ Sugerir que grupos de trabajo, como el Comité institucional, para el cuidado y uso de los animales de experimentación (CICUAE) de la FMVZ-UNAM evolucione a un comité de bioética formal, y que directamente o mediante un subcomité *ad hoc* atienda las necesidades de los aspectos de enseñanza y no sólo los de investigación.
- ❑ Consolidar la institucionalización de la bioética, formando comités de bioética, iniciando en facultades y escuelas de medicina veterinaria y zootecnia, instituciones académicas, de investigación, organizaciones gremiales, formando una red de bioética en medicina veterinaria y zootecnia.

- ❑ Promover la divulgación de guías informativas, esquemas de organización de los comités de bioética, diseñar una metodología de ponderación de elementos éticos para la toma de decisiones, orientaciones metodológicas para integrar expedientes y desarrollar los casos de estudio.
- ❑ Impulsar que las políticas públicas en el campo de la medicina veterinaria y zootecnia y afines, se definan de acuerdo con los principios de la bioética, buscando equidad social.
- ❑ Lograr que la bioética se incorpore a los esfuerzos del quehacer cotidiano para la toma de decisiones a nivel institucional, empresarial, gremial, individual y que las políticas públicas evolucionen a políticas de Estado; es decir, que sean adoptadas y seguidas por toda la sociedad.

Los valores humanos y la ética deben convertirse en una fuente de movilización política y contribuir al cambio social. Kliksberg(36) ha publicado la agenda ética pendiente en América Latina.

El mayor reto es lograr en el mediano plazo que la Bioética llegue a ser además de un objeto de estudio, una herramienta para la mejor toma de decisiones y a través del conocimiento colectivo trascienda en todos los servidores de la salud y campos relacionados, por los académicos investigadores y educadores y por los usuarios de los servicios y se aplique en las decisiones ante los dilemas cotidianos. Se buscan cambios de actitud que se reflejen más allá del conocimiento y rompan la brecha entre ideas y acciones.

Sólo una llamada de alerta, de precaución, no se trata de hacer las cosas diferentes sino mejor. No todo cambio es crecimiento, no todo movimiento es un avance, procurando lo mejor a menudo estropeamos lo que está bien. Se trata de pasar de las propuestas a las soluciones. Sabiduría es conocer lo que se debe hacer pero virtud es hacerlo, la acción es más significativa que las palabras. La propuesta busca transformar positivamente el rumbo más allá de la ingenua idea de administrar las inercias o de construir a base de discursos un futuro imaginado, una realidad virtual.

Recordando con orgullo a nuestros antepasados, esta frase de sor Juana Inés de la Cruz, nos indica el rumbo: "No es saber, saber hacer discursos sutiles, vanos, que el saber consiste sólo en elegir lo más sano".

 **Referencias**

1. **Lolas F.** Temas de Bioética. Editorial Universitaria. Chile. pp. 107. 2002.
2. UNESCO (Organización de las Naciones Unidas para la Educación y la Cultura). 2005.
www.unesco.org/shs/bioethics
3. Diario Oficial de la Federación. 7 de septiembre de 2005.
4. **Pérez-Tamayo R.** Ética médica laica. Fondo de Cultura Económica y El Colegio Nacional. México. pp. 335. 2002.
5. **Aréchiga H.** La bioética y la formación científica del médico. Gac. Med. Méx. 137: 375-386. 2001.
6. **Garrafa V, Kottow M y Saada A.** Coord. Estatuto epistemológico de la bioética. Inst. de Inv. Jurid. UNAM y Red latinoamericana y del caribe de bioética, UNESCO. México. 2005.
7. **Savater F.** Los siete pecados capitales. Ed. Debate. 2006.
8. **Palmero O, y Garza J.** Derechos humanos: declaraciones, resoluciones y recomendaciones internacionales. CIESS (Centro Interamericano de Estudios de Seguridad Social). Cuadernos técnicos 1. 1992.
9. **Gracia D.** Fundamentos de bioética. Eudema. 1989.
10. **Rivero-Weber P, y Pérez-Tamayo R.** Ética y bioética. Nexos 37 (343): 23-27. 2006.
11. **Garza J.** Bioética, desarrollo sustentable y salud. Summa Bioética Núm. Extraord. 47-55. 2002.
12. **Brundtland H.** Development and international economic co-operation: Environment. World Commission on Environment and Development. United Nations General Assembly A/43/427. 1987.
13. **Macer D.** Ethical opportunities in global agriculture, fisheries and forestry; and FAO. Summa bioética. 1 num. esp. 43-45. 2003.
14. **OIE (Organización Mundial de Salud Animal).** Código zoosanitario internacional. Anexo 3.7.1. Introducción a las directrices para el bienestar de los animales. 2006.
http://www.oie.int/esp/normes/mcode/es_titre_3.7.htm

15. **Kraus A, y Cabral A.** La bioética. Tercer Milenio. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes. México, pp 64. 1999.
16. **Rocha A.** Los valores que unen a México. Libro 1: del México prehispánico. Fundación México Unido. México. 2003.
17. **CIOMS (Council for International Organizations of Medical Sciences).** Guías operacionales para comités de ética que evalúan investigación biomédica. TDR/PRD/ETHICS/2000.1. OMS Ginebra. 2000.
18. **Olivé L.** Filosofía, ciencia, tecnología y sociedad. Deberes de los científicos, de los tecnólogos y de las instituciones. Summa bioética 1, num. esp. 72-74. 2003.
19. **Garza J, Moreno JA, y Torres JL.** Reseña de la Conferencia Internacional "Responsabilidad científica y bioética: llamado a los científicos". Summa bioética 1, num. esp. 49-64. 2003.
20. **González J.** Genoma humano y dignidad humana. Ed. Anthropos. 2005.
21. **Aluja A.** La ética en la investigación científica y en la enseñanza con animales vertebrados. En Aluja M y Birke A (coords). El papel de la ética en la investigación y la educación superior. Fondo de Cultura Económica: México, 2004.
22. **Garza J.** Bioética y salud pública. El caso de la rabia en México. Boletín ANMB 1 (1): 12-21. 2003.
23. **Vanda B.** La experimentación biomédica en animales en los códigos bioéticos. LAB-acta 15: 69-73. 2003.
24. **Garza J.** Cooperación internacional en enfermedades epidémicas. Zoonosis, hacia una sola salud. Foro interacadémico en problemas de salud global. Asociación Latinoamericana y España de Academias Nacionales de Medicina. P. 93-104. México. 2006.
25. **Demers G, Griffin G, De Vroey G, Haywood J, Zurlo J, y Bedard M.** Harmonization of Animal Care and Use Guidance. Science 312: 700-701. 2006.
26. **Schunemann A.** El buen uso de los animales de experimentación. Gac. Méd. Méx. 131: 49-63. 1994.
27. **Acha PN, B Szyfres.** Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y animales. Vol. 1-3. 3a ed. Organización Panamericana de la Salud. Washington DC. 2003.

28. **Diario Oficial de la Federación.** Ley Federal de Sanidad Animal. 25 de julio de 2007.
29. **Monteverde E.** El bestiaro de Chapultepec. Milenio Abril 12, p. 42-45. 1998.
30. **Ramírez R y Berruecos JM.** Perspectivas de la educación veterinaria en México. Las primeras décadas del siglo XXI. CONEVET. México. 2006.
31. **Laclette JP.** Código ético para investigación biomédica. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM. 2005.
32. **Rollin B.** An introduction to Veterinary Ethics. Theory and cases. Iowa State University Press. 1999.
33. **Martínez A y Musitu G.** El estudio de casos para profesionales de la acción social. Nancea de ediciones. Madrid. 1995.
34. **Ogliastri E.** El método de casos. Serie cartillas para el docente. ICESI. Publicaciones del CREA. Cali, Colombia. 1998.
35. **Hansen T, Christiansen SB, Dich T y Sandoe P.** Teaching ethics to first year veterinary students in Denmark. The Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen, Denmark. 2001.
36. **Kliksberg B.** La agenda ética pendiente de América Latina. Fondo de Cultura Económica y Banco Interamericano de Desarrollo. 2005.

Métodos para evaluar la Bioseguridad en las Granjas Porcinas



Antonio Morilla-González
Marco Antonio Carvajal- Velázquez

I.	Introducción	44
II.	Evaluación e instrumentación de la bioseguridad.....	44
	1. Derechos de los animales.....	44
	2. Análisis de peligros y puntos críticos de control	45
	3. Evaluación de la bioseguridad en granjas porcinas de México ..	46
	4. Densidad porcina	49
	5. Animales de reemplazo y semen.....	50
	6. Vehículos	51
	7. Desinfección de llantas	52
	8. Secado de vehículos.....	52
	9. Personal	54
	10. Lavado y desinfección	55
III.	Evaluación de campo para determinar la dilución del desinfectante	55
	1. Superficies y Equipo.....	56
	A) Conteo de bacterias en unidades formadoras de placas (UFP) por cm ²	56
	B) Bioluminimetría (Bioluminiscencia- <i>Lighting test method</i>).....	57
	C) Determinación de proteína	57
IV.	Evaluación de diferentes métodos de lavado y desinfección, en instalaciones, vestimentas, botas, jeringas, agujas y frascos	57
V.	Fauna nociva: Roedores, moscas.....	63
VI.	Conclusiones.....	65
	Referencias.....	67

I. Introducción

La bioseguridad se define como el conjunto de acciones que se instrumentan en una explotación, para que los cerdos estén menos expuestos a los agentes de enfermedades, además de que sus productos y subproductos sean inocuos para los humanos y otros animales, y que no afecte la ecología de la región ni a los humanos que la habitan. En las décadas de 1960 y 1970 la bioseguridad se limitaba a tener la granja cerrada, y el personal o visitantes cambiarse el overol y las botas para entrar, aunque los vehículos entraban a las instalaciones, y en un mismo día el veterinario visitaba varias granjas (1). El incremento del tamaño de las granjas y la necesidad de que los productos y subproductos de los animales sean inocuos y que la explotación no afecte el entorno, han hecho que se adopten otras medidas de bioseguridad.

Hay varios manuales que ayudan a impulsar la bioseguridad en las granjas porcícolas, que se basan en la experiencia y opinión de los productores y veterinarios (2-4). Debido a que hoy los protocolos se han empezado a revisar y evaluar científicamente (5), el objetivo de este trabajo consiste en presentar algunas de las metodologías y los resultados que se han obtenido. La información será de utilidad para que los técnicos mejoren sus programas de bioseguridad.

II . Evaluación e instrumentación de la bioseguridad

1. Derechos de los animales

La manera como se reconoce que los animales de una explotación se encuentran en buenas condiciones es cuando se observa que están sanos y ganan peso. Así, cuando se aplica un programa de bioseguridad deben cuidarse los derechos de los animales (6, 7):

- Acceso al agua y buena alimentación.
- Lugar donde puedan descansar y protegerse del medio ambiente.
- Mantenerlos sanos y atender cualquier enfermedad inmediatamente.
- Suficiente espacio para que expresen su comportamiento normal y compañía de animales de la misma especie.
- Mantenerlos libres de estrés y miedo.

2. Análisis de peligros y puntos críticos de control

El método más recomendable para impulsar la bioseguridad en la granja es el análisis de peligros y puntos críticos de control (APPCC)-(HACCP, *Hazard Analysis and Critical Control Points*). Está diseñado para prevenir la incidencia de problemas, pues establece controles en las diferentes etapas del sistema de producción donde pudieran surgir situaciones riesgosas o críticas y no sólo al final del proceso. El método se puede instrumentar en una granja de cualquier tamaño, se recomienda:

- ❑ Tener un responsable encargado de la bioseguridad, de preferencia médico veterinario, entrenado en bioseguridad, y que sólo realice esa función.
- ❑ Involucrar al dueño y a todo el personal.
- ❑ Describir el proceso de bioseguridad.
- ❑ En un diagrama de flujo, anotar cada proceso para que se cumpla con los objetivos o productos de la empresa. Éstos pueden ser criar animales sanos, que la granja no contamine y cumplir con la política de buen vecino.
- ❑ Describir qué es un punto crítico de control (PC) como el momento durante el proceso en que existe un riesgo, e involucrar al personal para que señale cómo se controla.
- ❑ Para cada punto de control se debe instrumentar:
 1. Análisis de riesgos. Se define como riesgo la probabilidad de que ocurra un peligro microbiológico, químico o físico para la salud de los humanos y animales, los consumidores, los operarios, el equipamiento de la granja y el medio ambiente.
 2. Identificar los puntos críticos de control que puedan controlarse para eliminar el riesgo o reducirlo a un nivel aceptable para garantizar los objetivos del proceso.
 3. Establecer los límites críticos que separan lo que es aceptable y seguro, de lo que no lo es. Se definen como los valores máximo o mínimo hasta donde un riesgo físico, químico o biológico deba ser controlado en un PC para prevenir, eliminar, o reducir a un nivel aceptable un posible riesgo que afecte el proceso.

Deben ser fácilmente detectables y medibles, pues constituyen el sistema de alarma para actuar rápidamente.

4. Vigilancia. En cada PC se debe aplicar la forma de darle seguimiento.
5. Medidas de control. Son acciones correctivas que se efectúan cuando se ha detectado que un PC no cumple con los criterios establecidos.
6. Sistemas de registro y archivo. Todos los eventos y procedimientos que se realicen se deben registrar en hojas apropiadas y archivarlas. Para el caso de que aparezca un problema, será más fácil determinar su posible causa y controlarlo.
7. Auditoria o verificación. Consiste en la certificación de que los procedimientos establecidos en los PC en la explotación están instrumentados y funcionando. Para que la bioseguridad sea efectiva, es recomendable que sea impulsada y evaluada por personal especializado de la granja o personas externas a ésta.

3. Evaluación de la bioseguridad en granjas porcinas de México

Existe la norma 20:80 que indica que si se controla 20% de los PC más importantes, se controla el 80% restante o la mayoría (8). En los Cuadros 1 A, B, C y D, se anotaron los PC más importantes y se hizo una encuesta para cuantificar la frecuencia con que estaban aplicados en 120 granjas de nuestro país. Se anotó que estaba impulsado el PC cuando se efectuaba; por ejemplo, en ocasiones estaban contruidos los pediluvios, pero no contenían agua ni desinfectante, entonces se anotaba que no había.

CUADRO 1. A

Frecuencia con que estaban aplicados los puntos críticos de control más importantes para evitar la entrada de gérmenes a la pira, en 120 granjas de más de mil hembras

Puntos críticos de control	Granjas	%
Se da entrenamiento sanitario al dueño y al personal	5	4.2
La explotación se localiza a más de 3 km de otras pjaras	8	6.7
Existe una barda perimetral externa a más de 20 m de la barda que rodea la granja.	3	2.5
La densidad de población porcina en el municipio donde se encuentra la granja es menor a 10 cerdos/km ²	2	1.7

Puntos críticos de control	Granjas	%
La pira de origen de los reemplazos y semen tiene certificado libre de Aujeszky	87	72.5
Se ponen en cuarentena a los animales de reemplazo, antes de ser introducidos a la granja.	72	60
Se efectúa la serología al inicio, cada mes y al final de la cuarentena.	34	28.3
El centro de inseminación se localiza a más de 3 km de la granja.	6	5
Cada seis meses se analiza que los machos del centro de inseminación estén libres de PRRS, Aujeszky y Ojo Azul.	8	6.7
La zona de lavado y desinfección de vehículos se localiza a más de 1 km de la granja.	2	1.7
Se lava con agua a presión la carrocería, llantas y parte inferior del vehículo	2	1.7
Al chofer del vehículo se le proporcionan botas o cubrebotas y overol.	0	0
La zona de carga y descarga de la granja se localiza en el perímetro externo de la cerca.	27	22.5
La zona de carga y descarga de la granja se lava y desinfecta cada vez que se utiliza.	96	80
Los empleados utilizan vestimentas y botas de la granja.	92	76.7
Hay comedor en la granja y se verifica que los empleados no introduzcan comida a las instalaciones.	9	7.5
Los visitantes a la granja utilizan vestimentas y botas de la granja.	98	81.7

(Carvajal y Morilla, datos no publicados)

CUADRO 1.B

Frecuencia con que estaban instrumentados los puntos críticos de control más importantes para reducir la contaminación de la pira, en 120 granjas de más de mil hembras

Puntos críticos de control	Granjas	%
Cada caseta tiene sus propias palas, escobas y carretillas	16	13.3
A la entrada de cada caseta hay un lavador de botas y un pediluvio con desinfectante	6	5
El personal de maternidades se lava las manos o cambia los guantes, entre cada parto	0	0
Los animales se manejan en grupos con el sistema todo dentro/todo fuera.	7	5.8
Los cadáveres se eliminan inmediatamente.	28	23.3

Puntos críticos de control	Granjas	%
Los cerdos enfermos se sacrifican.	15	12.5
Se utiliza una aguja por cada animal para las inyecciones	0	0
No se utilizan tejidos para inmunizar a las hembras	27	22.5
La temperatura del refrigerador nunca pasa de 10°C	3	2.5
No hay perros ni gatos en las instalaciones	34	28.3
Se controlan los roedores con cebos	120	100
Las ventanas de las casetas y bodegas tienen malla pajarera	14	11.7
Se efectúa control de moscas dos veces a la semana	0	0
Se analiza el alimento que esté libre de micotoxinas	88	73.3
Se clorina el agua.	92	76.7
Se efectúa y analiza un seroperfil completo de las enfermedades de la pira una vez al año.	8	6.7

(Carvajal y Morilla, datos no publicados)

CUADRO 1.C

Frecuencia con que estaban impulsados los puntos críticos de control más importantes para evitar la contaminación de la carne, en 120 granjas de más de mil hembras

Puntos críticos de control	Granjas	%
El alimento no contiene productos de origen animal	4	3.3
No se alimentan a los cerdos con desperdicios de comida	120	100
Se prohíbe el uso de antibióticos un mes antes del sacrificio.	0	0
Se evalúa que no haya personal con teniasis.	0	0

(Carvajal y Morilla, datos no publicados)

CUADRO 1.D

Frecuencia con que estaban implementados los puntos críticos de control más importantes para que la pira no contamine el medio ambiente, en 120 granjas de más de 1000 hembras

Puntos críticos de control	Granjas	%
Existe una caja aislada de la granja para colocar los despojos de los animales.	0	0
Los despojos de animales se entierran, incineran o transforman en composta.	105	87.5
Las excretas van a una laguna de oxidación o se hace composta.	116	96.7

(Carvajal y Morilla, datos no publicados)

Los resultados de la encuesta concordaron con otras llevadas a cabo en México y que también demuestran que el nivel de bioseguridad en las granjas porcinas es muy bajo. Por ejemplo, Estrada *et al.* (9) informaron que en 43 granjas porcinas del altiplano, de una escala de 1 (mala) a 5 (excelente), las granjas de pie de cría tuvieron un nivel de bioseguridad de 3.4 y las comerciales de 2.5. Mújica (10) informó que la bioseguridad en 24 granjas en Morelos, México, en tres (12.5%) era elevada, en 16 (67%) era media y en cinco (21%) era baja; asimismo, Zamora *et al.* (11) notificaron que en 18 granjas de Hidalgo, México, en tres (17%) tuvieron un nivel elevado, en 12 (67%) medio y en tres (17%) bajo. En Chile, España y Bélgica también se ha informado que el nivel de bioseguridad en las granjas era deficiente y existía el peligro de que se difundiera alguna enfermedad exótica en caso que entrara al país (12-15).

4. Densidad porcina

Es común que una piara se contamine con los gérmenes que hay a su alrededor confirmando el dicho de que “en la piara existen las enfermedades que tiene el vecino”. Esto implica que las enfermedades infecciosas se difunden en una región alcanzando en ocasiones todo el país. Entre los ejemplos se encuentra el de PRRS en México, el brote de FPC en Holanda, en 1997/1998. En Taiwán, en 2000, cuando apareció el virus de la fiebre aftosa se tenían registradas 26000 granjas porcinas y la velocidad con que se difundió el virus se calculó en 260 granjas cada día (16). De manera semejante, Lozada *et al.* (17) evaluaron la difusión del virus de FPC en una zona porcícola de México localizada en el altiplano, donde en cuatro meses alcanzó la mayoría de las granjas.

Es recomendable que la explotación se localice en una región donde la densidad de población no sea mayor de 10 cerdos/km² y esté a por lo menos 3 km de distancia de otras granjas o fuentes de contaminación.

Algunos métodos para evaluar la densidad porcina de la región y la localización de la granja son:

1. La densidad de la población porcina en el municipio donde se halla la granja se obtiene dividiendo el número de cerdos en el municipio entre los kilómetros cuadrados del municipio. La SAGARPA en 1988 consideró que el promedio nacional era de siete cerdos/km², en Veracruz en 2002 se encontró una concentración promedio de

22 cerdos/km². Gómez *et al.* (18) informaron que en varias zonas de Jalisco, Guanajuato y Michoacán la concentración variaba de 194 a 334 cerdos /km². Lozada *et al.* (17) en una encuesta hecha en 2001 en una zona de Guanajuato, cuantificaron alrededor de cinco mil cerdos/km². En el ámbito internacional, en Taiwán había 1 922 cerdos/km² antes del brote de fiebre aftosa.

2. Se puede tener una perspectiva desde las posibles fuentes de contaminación para la piara mediante: <http://www.google.com/downloads/>. Se puede hacer un mapa de riesgos en donde se localiza la explotación y se calcula la distancia a otras granjas, poblaciones, rastros, basureros, ciudades, carreteras de elevado tránsito, entre otros (19).
3. Efectuar visitas periódicas en los alrededores de la granja para buscar explotaciones de cerdos, rastros, basureros, poblaciones, etc. De manera práctica, existe peligro de contaminación si desde la explotación se pueden ver otras explotaciones de cerdos, incluyendo las de traspaso.

5. Animales de reemplazo y semen

La introducción de cerdos de reemplazo y el semen a una piara es la forma más común de introducir gérmenes patógenos, por lo que deben seguirse los siguientes pasos:

1. Solicitar certificado oficial de libre de enfermedad de Aujeszky en la piara de origen, así como los resultados de la serología para conocer si la piara está infectada con Ojo Azul, FPC, GTC-CRP y PRRS, entre otras enfermedades. Para el caso de semen se deben solicitar los resultados de cada lote con RT-PCR para detectar virus de PRRS.
2. Poner en cuarentena los reemplazos en instalaciones fuera de la granja y efectuar serología. Con la aparición del virus de PRRS la cuarentena debe de ser por lo menos de tres meses, pues aunque los animales se compran seronegativos, durante la cuarentena pueden desarrollar anticuerpos y nuevamente tornarse seronegativos. En el Cuadro 3, donde se presentan los resultados de la evaluación serológica de un lote de seis machos que eran seronegativos al virus de PRRS cuando se compraron. Debido a que se iban a utilizar en una granja libre de PRRS, se sometieron a cuarentena. Cuando entraron

eran seronegativos, pero durante la cuarentena algunos desarrollaron anticuerpos y al final de nuevo fueron negativos, por lo que se descartó el lote.

CUADRO 3

Resultados de la evaluación serológica durante 120 días de seis machos en cuarentena

Animal	Días de cuarentena			
	1	45	90	120
1	0*	0	0	0
2	0	0.6	0	0
3	0	0	0	0
4	0	1.1	0.5	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0

** Valores S/P obtenido por medio de la prueba de ELISA (datos no publicados)*

6. Vehículos

Los vehículos fácilmente pueden transportar gérmenes que provocan brotes muy costosos. El brote de fiebre porcina clásica en Holanda durante 1997-1998 parece ser que se debió a un camión que se contaminó en Alemania, y debido al invierno riguroso no pudo ser lavado adecuadamente y acarreó el virus a Holanda. Se demostró que 24% de la difusión del virus en Holanda sucedió mediante los transportes, para detenerlo se sacrificaron casi 13 millones de cerdos con costo aproximado de 3.2 miles de millones de dólares (20). En México en una piara localizada en una región libre de FPC ocurrió un brote pues los camiones transportaban cerdos de engorda a un rastro fuera del estado, donde llegaban animales infectados de FPC. Debido a una falla en el lavado y desinfección de los camiones, el virus fue introducido a la piara con graves consecuencias económicas (21).

Para evitar que los vehículos de cualquier tipo entren a las instalaciones de la granja, debe haber un estacionamiento alejado de la entrada de la unidad, una zona de lavado y desinfección de vehículos y otra de carga y descarga retirada de la granja.

7. Desinfección de llantas

Para desinfectar las llantas de los vehículos en la granja se puede poner un rodoluvio con desinfectante. Recientemente se introdujo un aparato para limpiar las llantas; el chofer los activa antes de entrar y al salir de la granja y rocía durante 15 segundos a un minuto un desinfectante sobre las llantas. Amass *et al.* (22) evaluaron su efectividad utilizando agua sola o agua conteniendo 2% de un desinfectante formulado con ácidos orgánicos, peróxidos, surfactantes y amortiguador inorgánico estabilizado (Virkon S). Utilizaron el aparato con dos rociadores por llanta, que vertieron 500 mL por 15 segundos a 45 psi sobre el dibujo de la llanta y las paredes. Los resultados mostraron que rociando sólo agua no hubo disminución del número de bacterias y sólo se eliminaron cuando se adicionó el desinfectante y se dejó actuar por 30 segundos.

8. Secado de vehículos

Los vehículos se deben lavar y desinfectar en una zona específica localizada a por lo menos un kilómetro de la granja. Se ha determinado que un factor esencial para la descontaminación de los vehículos es permitir que se sequen durante uno o dos días. Debido a que los vehículos se quedan parados varias horas o días y representa un costo, se desarrolló el secado asistido térmicamente para acelerar el proceso (23, 24). Para evaluar este sistema se utilizó un modelo de contaminación viral y bacteriano. De manera experimental se contaminó el equivalente a la caja de un camión con 5×10^5 TCID₅₀ de virus de PRRS, se lavó, desinfectó y se secó utilizando cuatro métodos; consistieron en introducir aire caliente a 71°C por 30 minutos (SDC), un ventilador, sólo lavado sin secar y secado toda la noche. La sobrevivencia del virus fue evaluada mediante toma de muestras con hisopos a diferentes tiempos que se probaron por RT-PCR; además se introdujeron cerdos centinelas susceptibles a las cajas 7 y 14 días después, permanecieron por dos horas y luego se determinó la infección por medio del aislamiento del virus en cultivos celulares. Los resultados se presentan en los cuadros 4 y 5.

CUADRO 4

Efecto sobre la viabilidad del virus de prrs evaluada por RT-PCR, de cuatro tratamientos para secar la caja de camiones que transportan cerdos.

Tratamiento	Tiempo de secado				
	0 min	10 min	20 min	30 min	8 horas
SDC ¹	10/10*	7/10	0/10	0/10	NSH
Ventilador ²	10/10	9/10	6/10	6/10	NSH
Lavado ³	10/10	10/10	10/10	10/10	NSH
Secado ⁴	10/10	NSH	NSH	NSH	10/10

¹ Secado y descontaminación por calor. Se introdujo aire caliente a 71°C por 30 minutos para hacer más rápido el proceso de secado del vehículo.

² Ventilador. No se usó calor, sólo aire por 30 min.

³ Sólo lavado a 300 psi por 72 segundos a 20°C sin permitir que se seque.

⁴ Lavado y se dejó secar toda la noche (8 horas). NSH = No se hizo.

* Muestras donde se detectó el virus/total de muestras (23, 24).

CUADRO 5

Efecto sobre la viabilidad del virus de PRRS, evaluada con cerdos centinelas y cultivos celulares, de cuatro tratamientos para secar la caja de camiones que transportan cerdos.

Tratamiento	Cerdos centinelas *	Aislamiento en cultivos celulares
SDC ¹	0/3	Negativo
Ventilador ²	2/3	Positivo
Lavado ³	3/3	Positivo
Secado ⁴	0/3	Negativo

¹ Secado y descontaminación por calor. Se introdujo aire caliente a 71°C por 30 minutos para hacer más rápido el proceso de secado del vehículo.

² Ventilador. No se usó calor sólo aire por 30 min.

³ Sólo lavado a 3 000 psi por 72 segundos a 20°C sin secar posteriormente.

⁴ Lavado y se dejó secar toda la noche (ocho horas).

* Los cerdos se introdujeron en las cajas por dos horas y se probaron 7 y 14 días después (23, 24).

Pieters *et al.* (25) evaluaron el secado asistido térmicamente (SDC) en relación con la disminución de la concentración de bacterias. Después de lavar la caja del camión colocaron gel contaminado con bacterias y los sometieron al secado y descontaminación por calor por 120 minutos. Luego determinaron la concentración residual de bacterias (Cuadro 6).

CUADRO 6

Promedio de la concentración de bacterias después del tratamiento

Bacterias	Tratamiento CFU/ mL		
	No SDC	SDC 1	SDC 2
<i>S. suis</i>	1.78×10^{10}	2.32×10^6	2.03×10^4
<i>E. coli</i>	9.13×10^{10}	9.5×10^8	7.58×10^5
<i>S. typhimurium</i>	4.93×10^{10}	2.55×10^7	8.0×10^9

(25).

La conclusión fue que el secado con aire caliente fue rápido y eficaz para eliminar la contaminación del virus de PRRS y, en el caso de las bacterias, fue capaz de reducir al menos dos logaritmos la concentración en la caja de los camiones.

9. Personal

Empíricamente se ha sospechado que el personal puede acarrear gérmenes patógenos dentro de la granja en sus vestimentas, calzados, manos sucias, etc. Álvarez *et al.* (26) notificaron que fue posible transmitir el virus de la gastroenteritis a cerdos susceptibles, por medio de una persona que estuvo en contacto con cerdos infectados por 10 minutos, dos veces al día, diariamente por dos semanas, y no efectuaba ninguna medida de bioseguridad. En otro experimento, Amass *et al.* (27) inocularon cerdos con *E. coli* enterotoxigénica, luego que éstos presentaban diarrea, los empleados los manipulaban y después atendían a cerdos susceptibles. Demostraron que el lavado de las manos no impedía la transmisión, fue necesario que los trabajadores se bañaran y cambiaran la ropa. Concluyeron que las bacterias contaminaban además de las manos, el pelo, piel y vestimentas del trabajador. Un resultado semejante informaron Batista *et al.* (28), quienes

demonstraron que para impedir que se transmitiera *M. hyopneumoniae*, fue necesario que los trabajadores se cambiaran la ropa y las botas después de haber manipulado animales enfermos, pues de otra manera infectaban a los cerdos susceptibles.

10. Lavado y desinfección

Las instalaciones, instrumentos y vehículos deben ser lavados y desinfectados para eliminar a los gérmenes y evitar que infecten otros animales. Se considera que la mayoría de las enfermedades de los animales son dependientes de la cantidad de microorganismos, por lo que al reducir el grado de exposición por medio del lavado y desinfección del ambiente, los cerdos crecerán mejor y de manera más saludable.

Los gérmenes son excretados por los animales dentro de medio orgánico como el excremento, orina, secreciones nasales, saliva, se mezclan con desechos de comida y pasan al agua donde continúan protegidos por el medio orgánico. Así, para limpiar y desinfectar un objeto importa el lavado con agua y jabón o detergente, pues se elimina más de 95% de la contaminación. Los jabones y detergentes neutralizan las cargas eléctricas, despegan la biopelícula de materia orgánica donde se encuentran los gérmenes en las superficies y con el agua del enjuague se elimina. Luego se procede a la desinfección, que elimina el 5% restante de gérmenes. Cuando el objeto tiene materia orgánica los desinfectantes se neutralizan y no son eficaces contra los gérmenes. Para que los desinfectantes sean eficaces se utilizarán de manera correcta. Además se debe evaluar el procedimiento cuantificando el nivel de contaminación por diversos métodos.

III. Evaluación de campo para determinar la dilución del desinfectante

Para determinar si están bien hechas las diluciones en baños de botas, rodoluvios y paredes, se pueden utilizar kits: Dilution Testing Kits, que evalúan la concentración de desinfectantes y detergentes como Biosolve, HD3, Virudine, Longlife 250S, Virkon S, Hyperox, Ambicide, DSC 1000, Farm Fluid S y Traywash.

A) Superficies y equipo

Para determinar la concentración de bacterias residuales existen varios métodos:

A. *Conteo de bacterias en unidades formadoras de placa (UFP) por cm².*

Así, se utiliza un hisopo empapado en solución salina fisiológica estéril, que se pasa sobre 10 cm² de las superficies y utensilios desinfectados como comederos, bebederos, pisos, paredes, etcétera; se coloca en un tubo estéril; se siembra en placas de cultivo. En el mercado se consiguen placas RODAC (Replicate Organism Detection and Counting-BD Diagnostic Systems, Sparks, Maryland, USA) para determinar bacterias aeróbicas en el ambiente. Se pueden utilizar con D/E Neutralizing Agar (BD Diagnostic Systems) que neutraliza el desinfectante residual. Se incuban a 37°C por 48 horas (<http://www.bd.com/ds/>); se cuenta el número de colonias; este procedimiento se repite diez veces.

La desventaja es que tarda 48 horas para obtener los resultados. El objetivo es que después de lavar, se tenga una concentración de 10³ UFP/cm² en la superficie que se va a desinfectar y después de ello que la cuenta bacteriana no exceda de 1 UFP/cm² (29, 30).

El Cuadro 7 presenta los límites críticos para la concentración de organismos después del lavado y desinfección de acuerdo con DuPont Animal Health Products (<http://www.antecint.co.uk/main/spanish.htm>).

CUADRO 7

Límites críticos de concentración de bacterias después del lavado y desinfección

	Satisfactorio	Dudoso			No satisfactorio
Pisos (UFC)	0-100	100-500	500-1000	1000-2500	+2500
Paredes, postes, comederos y bebederos (UFC)	0-10	10-50	50-100	100-300	+ 300
<i>Salmonella</i>	Negativa	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva

UFC = Unidades formadoras de colonia por cm².
<http://www.antecint.co.uk/main/spanish.htm>

B. Bioluminimetría (Bioluminiscencia-Lighting test method)

Cuantifica la adenosina-trifosfato residual (ATP) sobre una superficie con un luminímetro en una muestra tomada con un hisopo (BioControl Systems, Inc. www.biocontrolsys.com). El ATP se halla en bacterias, hongos, parásitos, pero no en virus. La luminimetría, en teoría, debe correlacionar con la cantidad de microorganismos. La ventaja es que el resultado se obtiene 11 segundos después que la superficie de la muestra fue obtenida (31).

C. Determinación de proteína

Con este método se cuantifican los niveles de proteína de las superficies, como indicador de residuos contaminantes. Un incremento de color indica más proteína y los resultados se obtienen en casi 20 minutos. BioClean (Biovet, St. Anthony, Minnesota) es una prueba que utiliza este método (<http://www.biovet.ca> consultado el 26 de agosto de 2006).

Cuando se compararon ambos métodos se halló que la bioluminimetría era muy sensible pero poco específica y la concentración de proteína era altamente específica pero poco sensible (32).

IV. Evaluación de diferentes métodos de lavado y desinfección

Instalaciones

Para mejorar la limpieza se humedecen superficies, objetos, equipo, e instalaciones antes de empezar el lavado; el agua a presión funciona bien en superficies ásperas pero no en las muy lisas como PVC, plásticos laminados o acero galvanizado, porque el agua rápidamente se desliza, sin que arrastre la mugre (33). Se ha demostrado que el uso del agua a presión para lavar los pisos de las jaulas de parición tuvo el mismo efecto en el grado de limpieza, comparado con la adición de un detergente (34). Además el agua caliente con detergente ayuda a la reducción del número de bacterias (Cuadro 8).

CUADRO 8

Número de bacterias presentes en las casetas después de diferentes pasos de limpieza y desinfección

Proceso	Bacterias viables/cm ²
Caseta después de sacar a los cerdos	50 000 000
Lavado con agua fría	20 000 000
Lavado con agua caliente y detergente	100 000

Modificado de 35.

En estudios en México, Jasso evaluó la contaminación del bebedero, fosa y pared de una caseta de destete después de que fue lavada sólo con agua, encontró que el bebedero y la fosa eran los más contaminados (Cuadro 9).

CUADRO 9

Medición de la contaminación mediante luminimetría de diversas superficies de la caseta de destete sólo lavada con agua

Superficie	Contaminación
Bebedero	28 367
Fosa	25 987
Pared	6 527

Jasso A., datos no publicados.

Hurnik (36) usó 40 corrales para evaluar el tiempo que tomó al empleado, número de bacterias residuales y ganancia de peso de los animales utilizando diferentes protocolos de lavado. Determinó que cuando se humedecía el local antes de lavar, el empleado ahorró 39% de tiempo, con el uso de detergentes 12%, y con agua caliente 23%. Cuando se combinaron los tres procedimientos se ahorró casi la mitad del tiempo (Cuadro 10).

CUADRO 10

Efecto de humedecer el local antes de lavarlo, utilizar detergente y agua fría o caliente sobre el porcentaje de tiempo que ahorra el empleado

Humedecer	Procedimiento		Ahorro de tiempo (%)
	Detergente	Agua	
No	No	Fría	0
No	Si	Fría	12
Sí	No	Fría	39
Sí	Sí	Fría	47
No	No	Caliente	23
No	Si	Caliente	32
Sí	No	Caliente	38
Sí	Sí	Caliente	46

36.

Una vez lavadas las casetas se evaluaron dos desinfectantes (1 y 2) y se determinó el número de colonias bacterianas. Se notificó que la desinfección redujo la contaminación residual y el desinfectante 1 fue mejor que el 2 (Cuadro 11).

CUADRO 11

Efecto de la desinfección sobre el número de colonias bacterianas residuales.

Desinfectante	Promedio de colonias bacterianas/ hisopo
Ninguno	28.4
1	13.2
2	19.6

36.

Posteriormente se comparó el efecto de los procedimientos de lavado y desinfección de los corrales sobre los días al mercado de los cerdos y se encontró que el uso de detergentes y desinfectantes redujo los días al mercado (Cuadro 12).

CUADRO 12

Efecto del uso de detergentes y desinfectantes para lavar los corrales sobre los días que tardaron los cerdos para alcanzar 110 kg

Método de lavado	Días al mercado (25 kg a 110 kg)
Sin desinfectante	98.14
Desinfectante 1	95.40
Desinfectante 2	95.11
Detergente sólo	95.59
Detergente y desinfectante 1	92.96
Detergente y desinfectante 2	92.66

36.

Los estudios de Jasso se evaluaron por bioluminimetría, y diferentes procedimientos de limpieza y desinfección. Realizó también hisopado de comederos, bebederos, fosas y paredes de casetas de destete y de jaulas de maternidad que fueron sólo lavadas o lavadas y desinfectadas. Los resultados se miran en los cuadros 13 y 14.

CUADRO 13

Efecto de dos desinfectantes sobre el grado de contaminación en corrales de engorda determinada por bioluminimetría

Superficie	Sin lavar		Desinfectado con sosa cáustica		Desinfectado con Farm Fluid S	
	Luminimetría (a)	%	Luminimetría	%	Luminimetría	%
Piso (slats)	13 463	100	3 663	-73	477	-96.5
Piso (cemento)	44 286	100	7 212	-84	197	-99
Cortina	6 454	100	4 243	-34	274	-96
Techo	18 949	100	6 912	-63	719	-96
Pared	4 223	100	1 060	-75	305	-93
Bebedero	24 487	100	15 589	-36	3 704	-85
Comedero	27 171	100	43 988	+162	7 554	-72

(a) Unidades relativas de luz (Jasso A., datos no publicados).

CUADRO 14

Efecto de varios procedimientos de lavado y desinfección sobre la reducción del nivel de contaminación en las instalaciones de una granja de cerdos determinada por bioluminimetría

Superficie	Lavada con sólo agua		Lavado con agua y un detergente (Biosolve)		Lavada con agua y desinfectada con TH4+®		Lavada con agua y desinfectada con Farm Fluid S	
	Luminimetría (a)	%	Luminimetría	%	Luminimetría	%	Luminimetría	%
Piso (slats)	4 970	100	1 273	-74	8 548	+172	1 173	-76
Pared	4 241	100	1 453	-66	2 685	-37	934	-78
Bebedero	4 110	100	1 283	-69	4 956	+120	813	-80
Bebedero lechón	1 960	100	1 246	-36	6 185	+315	912	-53
Comedero	8 573	100	5 448	-36	6 348	-26	966	-89

(a) Unidades relativas de luz (Jasso A., datos no publicados).

Jasso concluyó que en las condiciones en que se efectuaron los trabajos el mejor resultado se obtuvo con Farm Fluid S. Llamó la atención la falta de actividad de la sosa cáustica, quizá se debió a que no se lavó y la materia orgánica neutralizó la actividad del desinfectante.

El efecto de la contaminación reflejó un mal crecimiento de los cerdos. Esto se observó cuando se usaron casetas que por 2.5 años se mantuvieron con animales en flujo continuo, por lo que no se habían vaciado ni lavado. Grupos de cerdos fueron introducidos a la caseta sucia, y otros a casetas lavadas y desinfectadas. Los animales fueron pesados al inicio y al final y se halló que en las casetas lavadas y desinfectadas los cerdos tuvieron nueve días menos para alcanzar 90 kg en comparación con los de las casetas sucias. Con grupos de cerdos que eran mantenidos hasta 40 kg la ganancia de peso era 633 g y después de instituir un programa de limpieza y desinfección se alcanzó 662 g. En otra granja la ganancia de peso de nacimiento al mercado era de 530 g y después de que se establecieron protocolos de limpieza y desinfección se alcanzó 569 g (37).

Vestimentas

En relación con la ropa contaminada, Blaser *et al.* (38) no encontraron diferencia entre lavarla con agua a 7°C o 22°C para reducir el número de bacterias.

Botas

En las granjas se usa la desinfección de las botas antes de entrar a las instalaciones y casetas de los animales, para evitar el acarreo de gérmenes. En México, Ramírez (1) informó que de 22 granjas con más de 100 hembras, en seis (27%) los tapetes estaban vacíos; de las 16 donde el tapete tenía agua con desinfectante, en 13 (81%) estaba diluido con agua de lluvia y en 3 (19%) existía un puente de madera para evitar pisar el pediluvio. Estos datos indicaban que aunque en todas las granjas había pediluvios para limpiar las botas, casi en ninguna cumplían su función. Mújica (10) informó que de 24 granjas porcinas, en 11 (45%) había tapetes sanitarios a la entrada de los corrales y edificios y de éstos sólo dos (20%) tenían desinfectante.

Amass *et al.* (39) evaluaron el método de limpieza y desinfección en los pediluvios que contenían seis desinfectantes (glutraldehído, diacetato de clorhexidina, hipoclorito de sodio, povodine, fenólico, o-fenol, o-benzil-p-cloro, y p-terciario-amil-fenoles, cloruro de dodecil dimetil amonio. Concluyeron que los desinfectantes eran eficaces si las botas se lavaban primero; si no se lavaban, la desinfección era pérdida de tiempo y dinero.

Jeringas, agujas y frascos

Cuando se usan agujas para vacunar a grupos de animales se corre el riesgo de transmitir el virus de la FPC, PRRS, salmonelas, erisipelas, entre otros gérmenes (21, 40). Costa *et al.* (41) efectuaron análisis bacteriológicos a las jeringas, agujas y frascos usados de hierro dextrán y hallaron que estaban contaminados en 75% de las granjas donde hicieron el muestreo. Además compararon el método de la ebullición y del alcohol para mantener estériles las agujas y notificaron que las agujas que se habían desinfectado por ebullición se contaminaban fácilmente, en comparación con las mantenidas en alcohol.

Para evitar la transferencia de gérmenes a través de la aguja contaminada con sangre existe en el mercado una jeringa que utiliza una aguja

que se autodesinfecta, con la que se pueden inyectar hasta 100 animales antes de cambiar la aguja. Hoy se usa la inyección transdérmica por presión de aire en que el antígeno se deposita debajo de la piel en pequeñas partículas sin dañar los tejidos. Los animales se vacunan en la piel del perineo y los lechones en el cuello. El sistema es útil para vacunar gran número de animales, sin que se rompan las agujas ni pase sangre contaminada de un animal a otro (http://www.intervet.com.mx/novedades/020_vacunadora_idal.asp consultado el 19 de septiembre de 2006). Wilson (42) comparó el sistema de inyección intradérmica a 220 psi con la inyección con aguja, usando la vacuna Pleurostar APP. Informó que la respuesta serológica y protectora después del desafío fue similar en ambos casos indicando que la inmunización transdérmica fue muy eficaz. Resultados similares se obtuvieron con la inmunización transdérmica contra micoplasmosis, enfermedad de Aujeszky y PRRS (43).

V. Fauna nociva

Existen métodos cuantitativos para evaluar el impacto de los métodos de control de los roedores y las moscas.

Índice de roedores

Este valor se utiliza para evaluar el grado de infestación en una explotación. Primero se observa y después se colocan 12 trampas distribuidas apropiadamente.

- Se efectúa inspección visual mediante una caminata de 30 a 90 minutos por el edificio durante el día, ayudándose con una lámpara de mano.
- Se colocan 12 trampas en áreas donde haya habido actividad reciente de roedores. Esto es generalmente cerca de las paredes, atrás de objetos, lugares oscuros y arriba de las repisas.
- Se pone cebo en las trampas.
- Se revisan las trampas en los días dos y cuatro y se cuenta el número de roedores atrapados.
- Se mueven las trampas a una nueva localización a por lo menos 15 metros de distancia.

- ❑ Se revisan las trampas el día 7.
- ❑ Se anota el número de roedores capturados en la semana.

La estimación de la población o índice de roedores (IR), se basa en el número de roedores que se capturaron en las 12 trampas durante los siete días y se utiliza para determinar la severidad de la infestación.

Para obtener el IR se utiliza el siguiente cuadro:

Número de roedores capturados	Índice de roedores	Población
0 - 10	1	Baja
11 - 25	2	Moderada
Más de 26	3	Elevada

Modificado de 44.

Si no se utilizan 12 trampas o no se hace por siete días entonces se calcula la población de ratones de acuerdo con la siguiente fórmula (modificado de 44):

$$\frac{\text{Número de ratones capturados en todas las trampas}}{\text{Número de trampas que se pusieron}} \div \frac{\text{Número de días que estuvieron puestas las trampas}}{12 \times 7} = \text{Número de ratones}$$

Moscas

Para evaluar el tamaño de la población de moscas se usan tarjetas blancas plastificadas de 12 x 20 cm. Las tarjetas se mojan con solución de azúcar, se secan, se cuelgan del techo de cada caseta por 48 horas y se cuenta el número de puntos de regurgitación y heces de las moscas. Cada semana se repite el procedimiento y los valores que se obtienen se usan para evaluar la población de moscas, su variación estacional y el efecto de los métodos de control.

Rubio *et al.* (45) evaluaron en una granja de aves un programa de control contra la mosca doméstica. Administraron el larvicida Larvakill® Premix 500 (ciromacina) en el alimento de las aves durante cuatro semanas y luego lo suspendieron. Al mismo tiempo evaluaron el efecto de la asper-

sión en las semanas 2, 4 y 7 de los mosquicidas Ticoff® o de Garraban® para controlar las moscas adultas. Utilizaron 10 tarjetas blancas que cambiaban cada semana después de contar el número de manchas de regurgitación y fecales. Los resultados mostraron que los tres tratamientos dieron buenos resultados, siendo mejores cuando también se controlaron las moscas adultas (Cuadro 15).

CUADRO 15
Número de manchas en las tarjetas para evaluar un programa de control de moscas

Tratamiento	Semanas								
	Antes	Tratamiento con Larvkill® Premix				Sin Tratamiento			
		0	1	2*	3	4*	5	6	7*
Testigo	486ab	659a	973b	937b	902b	568b	524b	392b	294b
Ticoff®	435a	748a	646a	373a	350a	180a	198a	159a	113a
Garraban®	628b	512a	482a	326a	212a	143a	144a	119a	93a

Diferentes literales entre renglones denotan significancia estadística (P < 0.001).

** Semana en que se aspersó el mosquicida Ticoff® o Garraban® (45).*

VI. Conclusiones

En los últimos años se han revisado los protocolos de bioseguridad para que sean más eficientes. Con el fin de que los técnicos evalúen con mayor certeza los procedimientos que se efectúan en las explotaciones, aquí se presentaron varias técnicas para evaluar los resultados. Sin embargo, se considera que el problema de la instrumentación y el seguimiento de las medidas de bioseguridad no es técnico sino humano. El aspecto más importante de la bioseguridad consiste en que el dueño, gerente y empleados estén conscientes de la importancia de la bioseguridad, pues sólo cuando los animales estén en óptimas condiciones, libres de enfermedades, los productos y subproductos sean inocuos y que no se afecte al medio ambiente, la empresa será redituable.



Referencias

1. **Ramírez Necoechea R.** Una visión práctica de la desinfección en granjas porcinas. En: Morilla A editor Avances en Producción Porcina México D.F Asoc Mex Vet Esp Cerdos, 1992; 1: 39-46.
2. **Bixler EJ, Ayala FRA, López MS.** Bioseguridad en la producción porcina. Los poricultores y su entorno 2003; 31: 30-34.
3. **Gay GM.** Bioseguridad en las explotaciones pecuarias. En Programa de Acreditación de Médicos Veterinarios Zootecnistas. México, DF: Colegio de Médicos Veterinarios Zootecnistas 1990; 30-41.
4. **Maqueda AJ.** Bioseguridad en granjas porcinas. México, DF: Química Hoechst de México 1992.
5. **Amass SF, Clark K.** Biosecurity considerations for pork production units J. Swine Health Prod 1999; 7: 217-228.
6. **Deen J, Anil L, Anil SS.** Kernkamp lecture. Rights, lies and videotape. Allen D. Lemman Swine Conference 2005; 8-12.
7. **Webster J.** Assesment of Animal Welfare: The five freedoms. 2003. (<http://www.afac.ab.ca/fivefreedoms.htm>, consultado el 12 de julio de 2006).
8. **Blackwell TE.** Tipping points: how small factors have major impacts on swine health and production. Proc Am Assoc Swine Pract 2001, 32: 383-385.
9. **Estrada E González-Vega D, Morilla A.** Evaluación de un modelo sanitario para mejorar las piaras porcinas. Memorias de la XXXVIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Puebla, 277, 2002.
10. **Mújica Reyes JL.** Evaluación de las medidas de bioseguridad en granjas porcinas con diferentes grados de tecnificación en el estado de Morelos, México tesis de licenciatura. México DF (México) Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2005.
11. **Zamora RS, Pradal-Roa PJ, Herradora LMA.** Evaluación de la bioseguridad en granjas porcinas del estado de Hidalgo, México. Memorias del XLI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, 233, 2006.

12. **Manuel-León A, Tello M Casal J.** Relationship between biosecurity measures present in swine farms and perception of their importance to farmers. Proc. International Pig Veterinary Society 2000; 16:368.
13. **Manuel-León A, Tello M, Casal J.** Analyzing swine farms according to their biosecurity measures. Proc. International Pig Veterinary Society 2002; 17:138.
14. **Pinto JC, Urcelay SV.** Biosecurity practices on intensive pig production systems in Chile. Prev Vet Med 2003; 59: 139-145.
15. **Ribbens S, Dewulf J, Koenen F, Maes D, Laevens H, Mintiens K, Desadeleer L, De Kruif A.** Questionnaire on biosecurity in Flemish pig herds: Descriptive results. Proc Int Pig Vet Soc 2006; # vol: 303.
16. **Yang P-Ch.** Foot-and-mouth disease in Taiwan. En: Morilla, A., Yoon, K.J. and Zimmerman, J. editors Trends in Emerging Viral Swine Infections. Iowa, USA: Iowa State University Press. 2002; 175-181.
17. **Lozada A, Estrada E, Diosdado F, Socci G, Carrera E, González Vega D, et al.** Estudio epidemiológico de la fiebre porcina clásica en granjas del altiplano de México. Téc Pecu Méx 2003; 41:261-274.
18. **Gómez RS, Zalazar GG, Espinosa JA, Gerber P, Menzi H.** Contribución de la porcicultura del centro de México a la contaminación ambiental. XXXIX Congreso Nacional de la Asoc. Mex. Vet. Esp. Cerdos 224, 2004.
19. **Segundo CR.** Las 8 debilidades más frecuentes en bioseguridad. Memorias del XLI Congreso Nacional de la Asoc. Mex. Vet. Esp. Cerdos, 72-76, 2006.
20. **Bouma AM, Eblé P, Bloemraad R, De Kluijver E, De Smit H.** Erradicación de la Fiebre porcina clásica en Holanda. El brote de 1997-1998. En: Morilla A. (editors). La Fiebre Porcina Clásica en las Américas. México DF: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura y el Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Puebla, SC, 2000:104-111.
21. **Morilla A, Carvajal MA.** La fiebre porcina clásica endémica en México. En: Moreno Chan R. (editor). Ciencia Veterinaria México DF: UNAM 2004; 9: 166-196.
22. **Amass SF, Schneider JL, Ragland D, Hill MA.** Pilot studies to evaluate the efficacy of a truck-mounted tire sanitizer system. J Swine Health Prod 2003; 11:277-283.

23. **Dee S, Torremorel M, Pijoan C.** PRRS biosecurity. Validation of thermo-assisted drying and decontamination. Memorias del Symposium Internacional de Bioseguridad del XXXIX Congreso Nacional de la Asoc Mex Vet Esp Cerdos; 2004.
24. **Dee S, Deen J, Otake S, Pijoan C.** An experimental model to evaluate the role of transport vehicles as a source of transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to susceptible pigs. *Can J Vet Res* 2004;68: 128–133.
25. **Pieters M, Thompson R, Torremorell M, Dee S, Pijoan C.** Applying thermo-assisted drying and decontamination to decrease bacterial counts in livestock transportation trailers. *Proc International Pig Veterinary Society* 2006; 1:308.
26. **Alvarez RM, Amass SF, Stevenson GW, Spicer PM, Anderson C, Ragland D, Grote L, Dowell C, Clark LK.** Evaluation of biosecurity protocols to prevent mechanical transmission of transmissible gastroenteritis virus of swine by pork production unit personnel. *Pig* 2001; J48:22-33.
27. **Amass SF, Halbur PG, Byrne BA, Schneider JL, Koons CW, Cornick N, Ragland D.** Mechanical transmission of enterotoxigenic *Escherichia coli* to weaned pigs by people, and biosecurity procedures that prevented such transmission. *J Swine Health Prod* 2003; 11: 61-68.
28. **Batista L, Pijoan C, Ruiz A, Utrera V, Dee S.** Assessment of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* by personnel. *J Swine Health Prod* 2004; 12: 75-77.
29. **Böhm R.** Disinfection and hygiene in the veterinary field and disinfection of animal houses and transport vehicles. *Int Biodeterior Biodegradation* 1998; 41: 217-224.
30. **Tamasi G.** Testing disinfectants for efficacy. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1995; 14: 75-79.
31. **Faust C.** The determination of surface levels of ATP as a biosecurity measure. *Proc Am Assoc Swine Pract* 1997; 301-311.
32. **Kelly J, Amas SF, Ragland D, Spicer PM, Alvarez RM.** Analysis of Lightning and BioClean tests for assessment of sanitation levels in pork production facilities. *J Swine Health Prod* 2001; 9: 207-213.
33. **Sundahl AM.** Cleanability of building materials. *Fam Build. Prog* 1975; 40: 19-21.

34. **Kihlstrom SL, Morrow WEMM, Davies PR, Luginbuhl GH.** Assessing the progressive decontamination of farrowing crate floors by measuring the decrease in aerobic bacteria. *J Swine Health Prod* 2001;9:65-69.
35. **Gadd J.** 1999: (<http://www.thepigsite.com/featuredArticle/Default.asp?Display=883>). Consultado el 27 de Septiembre de 2005.
36. **Hurnik D.** Barn Wash/Disinfection Trials. Atlantic Swine Research Partnership - The PigSite. Serial online: 2003 June; cited 2005 October 6.
37. Bioseguridad en Granjas Porcinas: Memorias del Symposium Internacional de Bioseguridad del XXXIX Congreso Nacional de la Asoc. Mex. Vet. Esp. Cerdos, 2004.
38. **Blaser MJ, Smith PF, Cody HJ, Wang WL, LaForce FM.** Killing of fabric-associated bacteria in hospital laundry by low temperature washing. *J Infect Dis* 1984;149: 48-57.
39. **Amass SF, Vyverberg BD, Ragland D, Dowell CA, Anderson CD, Stover JH, Beaudry DJ.** Evaluating the efficacy of boot baths in biosecurity protocols. *J Swine Health Prod* 2000; 8:169-173.
40. **Terpstra C.** Classical swine fever: clinical signs, epizootiology and diagnosis. *Tijdschr. Diergeneeskd* 1997;122:198-200.
41. **Costa M, Sobestiansky A, Mesquita G, Barbosa G, Souza M, Fernandes L.** Bacteriological evaluation of syringes, needles and iron dextran of pharmacies in swine farms in Goiana-Go, Brazil. *Proc International Pig Veterinary Society* 2004; 18: 623.
42. **Wilson P.** Needle-free immunization as effective as needle and syringe method. Program Manager, Vaccine Development, Vaccine & Infectious Disease Organization. Manitoba Pork Council. (<http://www.manitoba-pork.com> - Septiembre 2004, consultado el 5 de marzo de 2006).
43. **Thacker B, Houser T, Nilobol D, Kruse F, McCalmon P, Thacker E, Bass T, Sebranek J.** Serological and safety evaluation of a needle-free, transdermal injection device. *Proc International Pig Veterinary Society* 2002; 17: 373.
44. American Association of Swine Veterinarians. Appendix A. Pork Safety and Quality – Good Production Practices 2001;32: 284-315.

45. **Rubio GME, Soberanes CN, Chávez LA.** Evaluación de un programa de control contra infestaciones de mosca doméstica (*Musca domestica*). Avicultores y su entorno 2006; 49: 64-66.

Factores asociados con la infertilidad en la vaca lechera en sistemas intensivos de producción



Joel Hernández Cerón¹

Carlos G. Gutiérrez Aguilar¹

I. Introducción	72
II. Algunas características fisiológicas de las vacas de alta producción ...	74
III. Producción de leche e infertilidad	75
1. Número de vacas por hato	77
2. Inicio de la actividad ovárica posparto	78
3. Alteraciones hormonales	79
4. Genética	79
5. Nutrición.....	81
6. Estrés calórico.....	82
7. Estrés oxidativo	83
8. Detección de estros y momento de la inseminación artificial ...	84
IV. Conclusiones.....	85
Referencias	86

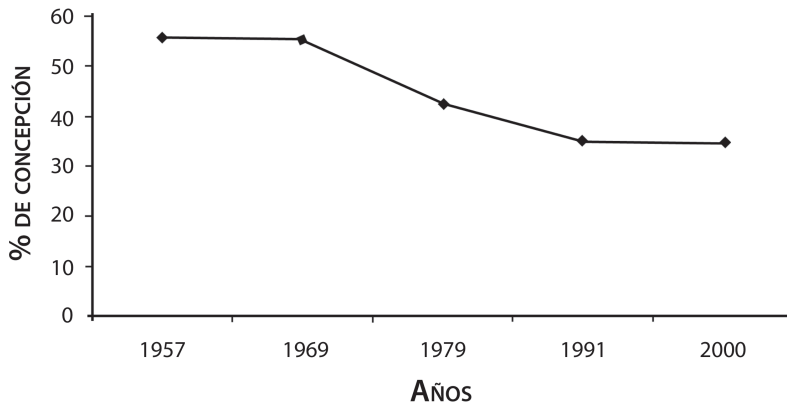
¹ Departamento de Reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510. México, D. F. correo electrónico: jhc@servidor.unam.mx

I. Introducción

La baja fertilidad o el bajo porcentaje de concepción es actualmente el problema reproductivo más importante en los hatos lecheros. En los últimos 40 años se ha observado en el ámbito mundial, una disminución significativa de la fertilidad que ha coincidido con un incremento en la producción de leche. En Estados Unidos (1) se ve una clara reducción del porcentaje de concepción en los últimos 40 años; así, en 1951 se lograba gestar 65% de las vacas servidas y en 1996 sólo alcanzaba 40%. Hace 30 años en México, más de 50% de las vacas servidas quedaban gestantes, ya sea mediante inseminación artificial o monta natural, mientras que actualmente es difícil llegar a 40% (2) (figura 1; cuadro 1). Esta tendencia de la caída en la fertilidad también se ha observado en Europa y Australia, donde el sistema de manejo no es tan intensivo como en América del Norte.

FIGURA 1

Porcentaje de concepción en vacas Holstein en México durante el periodo 1957-2000



CUADRO 1

Porcentaje de concepción de vacas de primer servicio, vacas repetidoras y vaquillas holstein de primer servicio

Grupo	Número de animales	Gestantes	Vacías	Porcentaje de Concepción
Vacas de primer servicio	4 102	1 412	2 690	34.4 ^a
Vacas repetidoras	1 818	630	1 188	34.6 ^a
Vaquillas de primer servicio	900	531	369	59.0 ^b

a,b: Valores que no comparten la misma literal son diferentes estadísticamente ($P < 0.05$) (Morales et al., 2000).

Aunque es evidente una relación entre la alta producción de leche y la fertilidad, la alta producción por sí misma no disminuye la fertilidad, sino son los cambios metabólicos que impone la producción de grandes volúmenes de leche, asociados con un manejo inadecuado de la alimentación, con la industrialización de la producción lechera en especial con el aumento del número de vacas por hato (3-5).

La baja fertilidad es provocada por la alta incidencia de muerte embrionaria temprana. Se ha observado que cerca de 80%-90% de los ovocitos son fertilizados; sin embargo, una alta proporción de los embriones muere antes de los 16-17 días posinseminación (6-8). De esta forma, dado que la muerte del embrión ocurre antes del reconocimiento materno de la gestación, las vacas regresan al estro en un periodo equivalente a un ciclo normal. En algunos casos la muerte del embrión sucede después de los días 16-7 y las vacas retornan al estro más allá del día 21 posinseminación (9).

La causa de la baja fertilidad obtenida en cada servicio es de naturaleza diversa y está asociada con diferentes condiciones. Se conoce que la fertilidad puede ser afectada por la alta producción de leche, el intervalo parto a primera ovulación, la profundidad del balance energético negativo, condición corporal antes y después del parto, problemas del puerperio, momento de la inseminación artificial, técnica de inseminación, características de la dieta, estrés calórico y factores genéticos. En este artículo se

revisan los factores asociados con la baja fertilidad en ganado lechero bajo sistemas intensivos de producción y se presenta, en lo posible, información generada en las condiciones de los hatos lecheros de México.

II. Algunas características fisiológicas de las vacas altas productoras

La vaca especializada en la producción de leche se ha transformado en los últimos 40 años. El mejoramiento genético logrado a través de la inseminación artificial (IA), la utilización de dietas con mayor concentración de nutrimentos y el mejoramiento de los sistemas de manejo han permitido un aumento impresionante de la producción de leche.

Metabólicamente la vaca de hoy día, con potencial genético capaz de producir 12 mil kg de leche al año, es distinta a la vaca de hace 30 años. Se ha observado que las vacas con mérito genético más alto tienen concentraciones sanguíneas de hormona del crecimiento (GH) más elevadas que las vacas menos seleccionadas (10, 11), y esta diferencia es independiente de los cambios en balance energético (10). Más aún, en estudios realizados en becerras prepúberes con alto o bajo valor genético se encontró que el pulso de GH en respuesta a su factor liberador fue mayor en los animales con más mérito genético (12, 13). Igualmente, en animales altamente seleccionados las concentraciones de insulina en respuesta a la alimentación con carbohidratos son más altas (14) y el tiempo de eliminación de la insulina y la glucosa son más largos (15) que en animales no seleccionados. Adicionalmente, los animales con alto valor predicho para producción láctea tienen mayor concentración de ácidos grasos libres en suero en respuesta al ayuno, que los animales con bajo valor predicho (13). En consecuencia, el metabolismo de vacas altamente seleccionadas difiere del de las vacas menos seleccionadas, de modo tal que parece hacerlas más adaptadas para movilizar reservas energéticas corporales, para enfrentar las altas demandas de energía, como aquellas propias de lactancia. Estos cambios en el metabolismo animal, que asegura la disponibilidad adecuada de nutrimentos para el mantenimiento de la producción láctea, pueden propiciar efectos negativos para la función reproductiva, particularmente cuando se asocian a mal manejo de la alimentación.

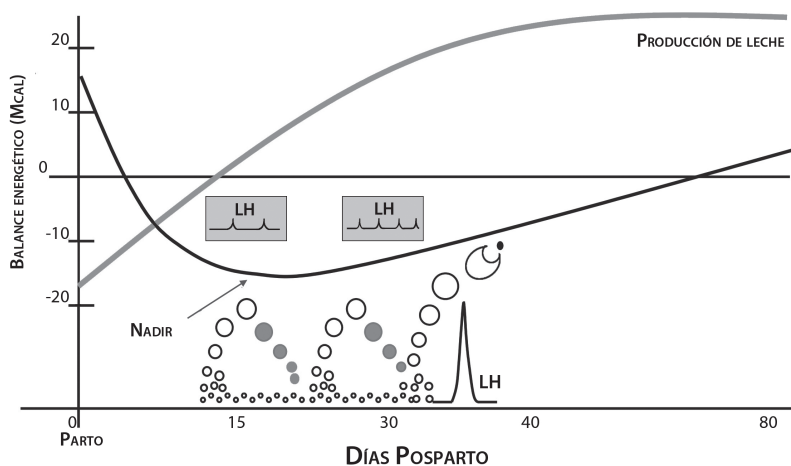
III. Producción de leche e infertilidad

Se ha observado clara asociación entre el nivel de producción de leche y la disminución de la fertilidad. En los últimos 10 años, la producción de leche en Estados Unidos de América se ha incrementado 20%, al mismo tiempo aumentaron los días abiertos y el número de servicios por concepción (17). Es frecuente que, partiendo de esta información, se concluya que hay un efecto negativo de la producción de grandes volúmenes de leche en la fertilidad. Sin embargo, en estudios en que se ha evaluado el efecto de diversos factores en la fertilidad, se encontró que la participación relativa de la alta producción de leche es menor que otros factores, por ejemplo, los problemas posparto (16). En México, en un análisis que incluyó la información de 72 hatos (26 676 vacas) con rango de producción de 7 503-12 225 kg (365 días, Control de producción de la Asociación Holstein de México), se observó que la producción de leche no afectó el intervalo entre partos, servicios por concepción ni días abiertos.

La alta producción de leche por si misma no afecta la fertilidad. Así, es frecuente encontrar hatos con vacas que producen niveles altos de leche y que tienen parámetros reproductivos mejores, que hatos con menores producciones de leche, ello indica que un hato con alta producción exhibe mejores prácticas de alimentación, salud y manejo reproductivo. Sin embargo, la producción puede afectar la fertilidad si se asocia con prácticas inadecuadas de manejo de la alimentación. Las vacas lecheras después del parto caen en un balance energético negativo, lo cual significa que la suma de la energía necesaria para su propio mantenimiento y la que requieren para la producción es mayor que la energía consumida, por lo que se ven obligadas a utilizar sus reservas corporales (figura 2). Estas vacas llegan a su punto más bajo de balance energético (nadir) entre los días 10 y 20 posparto, y siguen en balance negativo hasta los días 70 u 80 y en algunos casos (vacas de primer parto) hasta el día 100 posparto (3, 4).

FIGURA 2.

Las vacas llegan a su punto más bajo de balance energético (nadir) entre los días 10 y 20 posparto, y siguen en balance negativo hasta los días 70 u 80 y en algunos casos hasta el día 100 posparto. En los primeros 20 días posparto se observan ondas foliculares; sin embargo, ningún folículo termina su maduración debido a que se carece de un patrón adecuado de secreción de LH. Cuando el balance energético cambia de dirección, aumenta la frecuencia de LH, que conduce a la maduración del folículo y a la primera ovulación posparto.



CUADRO 2

Características de las fases lúteas de la primera ovulación posparto en vacas de raza Holstein

Tipo	Duración (días)	Número	Porcentaje
Fases lúteas normales	11-20	15	34.8
Fases lúteas cortas	< 10	8	18.6
Fases lúteas largas	21-52	10	23.2
Anestros	70 días posparto	10	23.2
Total		43	100

Lara et al. (2002).

El balance energético negativo afecta el control neuroendocrino de la reproducción, lo cual se ha asociado con retraso en la primera ovulación posparto y con la baja fertilidad (3, 5). Todas las vacas caen en balance negativo de energía durante el periodo posparto y tienen capacidad para adaptarse a esos cambios. No obstante, algunos animales fallan en este proceso de adaptación y aunque todavía no se pueden explicar las causas de ello, pueden ser secundarias a un bajo consumo de nutrientes provocado por problemas de salud, periodos secos prolongados que favorecen la obesidad o por complicaciones durante el parto (17). También se ha observado que la función hepática durante el periodo posparto temprano puede ser un factor clave en el proceso de adaptación durante el posparto (18).

1. Número de vacas por hato

En México se carece de bases de datos confiables y accesibles referentes a la producción de leche, población de vacas especializadas, población por sistemas de producción y número de vacas por hato. En datos obtenidos de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Sagarpa) se observa que de 1989 a 1999 hubo un incremento global en la producción de leche de 36.8% (19). Al revisar los estados que contribuyeron más con este incremento, es claro que fueron principalmente los estados que cuentan con cuencas lecheras y que tienen sistemas intensivos de producción con ganado Holstein, como Durango, Coahuila, Aguascalientes y Chihuahua. Indudablemente este incremento lo propició un aumento en la producción de leche por vaca, pero principalmente se debió a un incremento del número de vacas por hato o a la creación de nuevos hatos con gran número de vacas.

En Estados Unidos de América el aumento del número de vacas por hato en los últimos 10 años está bien documentado. En este país ha habido incremento en el número de hatos con más de 200 vacas y actualmente 30% de los hatos son de más de 500 vacas, ello indica que hay tendencia en la transformación de esta ganadería hacia la concentración de gran población de vacas por hato (17).

El tamaño del hato conlleva otro tipo de problemas asociados con el manejo general. Al ser el hato más grande y al tener prácticas de manejo más intensivas (hatos con tres ordeños) el ganadero y los trabajadores pierden más fácilmente el control de las vacas. Asimismo, el confinamiento

de las vacas en grandes grupos también puede afectar la fertilidad, pues se sabe que el confinamiento se asocia con la incidencia de diferentes afecciones que afectan la reproducción (retención de placenta e infecciones uterinas) (16).

El incremento en el tamaño del hato se asocia con la disminución de la eficiencia reproductiva. En el análisis de la información de 72 hatos mexicanos (hatos de 44 a 2 191 vacas) se observó que el número de animales por hato no afectó el intervalo entre partos ni los días abiertos. No obstante, fue evidente un efecto significativo ($P < 0.05$) en el número de servicios por concepción, observándose que por cada 100 vacas que aumenta el tamaño del hato hay incremento de 0.05 servicios por concepción. Esta información coincide con diversos estudios en los cuales es claro que la producción de leche, como tal, no afecta la fertilidad sino son los factores asociados con el manejo en donde el número de vacas es determinante (17).

2. Inicio de la actividad ovárica posparto

La primera ovulación posparto es uno de los parámetros que se han correlacionado con la fertilidad. Se conoce que el periodo del parto a la primera ovulación ha aumentado. En 1964 era de 29 ± 3 días y actualmente es de 43 ± 5 días (17). En México, el intervalo entre parto a primera ovulación en ganado lechero en sistemas de producción en pequeña escala (hatos de 5 a 20 vacas), es de 32.3 ± 2.3 días (20). En contraste, en un hato bajo condiciones de producción intensiva con 1 150 vacas, el intervalo del parto a la primera ovulación es de 45.8 ± 2.7 . Cabe señalar que en este último estudio, 21.2% de las vacas aún no habían ovulado al día 70 posparto (21).

Se han observado en vacas altas productoras cambios en las características de las fases lúteas de la primera ovulación. En México (21) se observó que 23.2% de las vacas presentaron fases lúteas largas durante el posparto, lo cual coincide con lo encontrado en otros trabajos (23, 24). En estos estudios es evidente que la incidencia de fases lúteas anormales es mayor en las vacas actuales que en vacas de hace 20 años.

El intervalo del parto a la primera ovulación es afectado principalmente por los cambios metabólicos que ocurren durante el periodo de transición. Se ha observado que la pérdida de condición corporal de más de 1 punto (escala 1 a 5) durante las primeras cuatro semanas posparto alarga el periodo del parto a la primera ovulación (5).

3. Alteraciones hormonales

La función lútea se ha asociado con la baja fertilidad, algunos estudios muestran que las vacas subfértiles tienen afectada la función del cuerpo lúteo. Se ha observado que las vacas altas productoras tienen menores concentraciones séricas de progesterona, lo cual se asocia con baja fertilidad (25). Estudios recientes demuestran que las vacas en lactancia tienen un flujo sanguíneo hepático mayor que las vacas no lactantes, lo cual se asocia directamente con mayor capacidad hepática para metabolizar las hormonas esteroides (26). Así, tasas altas de flujo sanguíneo hepático determinadas por alto consumo de nutrimentos (20 a 25 kg de materia seca al día), puede causar bajos niveles de progesterona, lo cual puede afectar el establecimiento y mantenimiento de la gestación. Si bien existe evidencia de un metabolismo de la progesterona más rápido en vacas en lactancia, la relación de los niveles séricos de esta hormona con la fertilidad no es muy clara. En diversos estudios no se ha encontrado evidencia de que la baja fertilidad esté asociada con bajas concentraciones circulantes de progesterona (2). Además, los resultados de tratamientos en los que se ha administrado progesterona o se ha tratado de estimular la función lútea con GnRh o hCG, son variables (27).

En este contexto, también se ha observado que las vacas altas productoras tienen menores concentraciones séricas de estradiol, lo que se ha asociado con una disminución en la intensidad de la conducta estral (28).

4. Genética

Datos de Estados Unidos de América muestran que en este país se ha incrementado la consanguinidad en forma dramática desde 1980, lo cual también se ha asociado con disminución de la fertilidad (29). Si bien en México no se cuenta con información acerca de la consanguinidad del ganado lechero, se debe recordar que la genética del ganado lechero mexicano tiene su origen principalmente en Estados Unidos.

En el pasado, las características reproductivas habían sido consideradas como no heredables debido a que se asumía, en forma absoluta, que éstas obedecían más a factores ambientales y menos a la expresión de los genes. En evaluaciones recientes se ha confirmado su baja heredabilidad; sin embargo, es evidente una amplia variación genética, lo que permite proponer que es posible su mejoramiento relativo a través de selección (30).

Se conoce que algunos parámetros reproductivos no tradicionales como el intervalo del parto a la formación del primer cuerpo lúteo (periodo del parto a primera ovulación) tienen una heredabilidad de $h^2 = 0.13$ a 0.28 , considerada como moderada (31, 32). La condición corporal tiene una heredabilidad también moderada ($h^2 = 0.2-0.3$) (33) y esta variable se asocia con el balance energético posparto y con el periodo de parto a primera ovulación. Se debe recordar que cuando las vacas caen en severos balances energéticos negativos pierden más condición corporal y tardan más en ovular (5); además, el inicio de la actividad ovárica posparto está correlacionado positivamente con incremento de la fertilidad y que por cada día de retraso a la primera ovulación se ha observado aumento de 0.24 y 0.41 días abiertos (32). Bajo estas circunstancias no resulta aventurada la inclusión de parámetros reproductivos en los criterios de selección, ya que es probable que se hayan seleccionado vacas para producciones altas, descuidando su fertilidad. Actualmente se tiende a incorporar a los índices de selección, características que permitan evaluar la fertilidad, tales como condición corporal, días abiertos, intervalo entre partos, patrones de función ovárica medidos mediante los niveles de progesterona, así como desafíos de GnRH en animales jóvenes (30, 34); de esta forma se intentan reducir los efectos negativos de la selección por producción.

Aunque la reducción de la fertilidad es un problema global, ésta ha sido más aguda en las vacas de raza Holstein en sistemas de producción en estabulación (Norteamérica) que en las vacas Holstein en sistemas de producción en pastoreo (Nueva Zelanda, Australia y Uruguay) (17, 35-37). Esta diferencia quizá obedece al sistema de producción, a las diferencias genéticas de estos tipos de ganado Holstein o a efectos de interacción genotipo-ambiente. Se ha observado que en condiciones de pastoreo, las vacas Holstein de origen neozelandés tienen mayor fertilidad que las vacas Holstein estadounidenses (37, 38). Sin embargo, en un estudio (39) en el que se comparó la fertilidad de vacas de raza Holstein de diferente origen (Estados Unidos, Australia y Uruguay) en condiciones de estabulación, se observó que el porcentaje de vacas gestantes al día 150 posparto fue igual ($P > 0.05$) para las de origen estadounidense (50.1%) y australiano (57.5%); mientras que las uruguayas (43.9%) fueron iguales a las estadounidenses pero menores ($P < 0.01$) a las australianas. Estos resultados muestran que, no obstante que las vacas australianas y uruguayas tienen en sus

respectivos ambientes, mejor fertilidad que las vacas de raza Holstein en Norteamérica (17, 36, 37), su fertilidad disminuye a niveles similares a las vacas de origen estadounidense, cuando son manejadas en condiciones intensivas de producción en estabulación.

5. Nutrición

Independientemente del efecto de los cambios metabólicos provocados por el balance energético negativo, las dietas ofrecidas a las vacas de buena producción también pueden afectar su fertilidad. Este efecto sucede cuando se administran dietas con alto contenido de proteína en relación con el consumo de energía.

Las dietas con contenidos de proteína cruda de 17% a 19 % llegan a ocasionar disminución de la fertilidad; se ha demostrado que las vacas alimentadas de esta forma tienen altas concentraciones de urea en sangre y en los fluidos uterinos, lo cual afecta la viabilidad de los espermatozoides, óvulo y embrión. En condiciones de campo es frecuente la medición de las concentraciones de urea en sangre o en leche, ello permite evaluar las dietas. Las concentraciones de urea mayores de 20 mg/dL en sangre se asocian con baja fertilidad (1).

Proveer todos los nutrimentos a las vacas con niveles importantes de producción propicia que se ofrezcan dietas ricas en energía, basadas en proporciones altas de granos. Es frecuente que se presenten alteraciones subclínicas en el pH ruminal, lo cual se ha asociado con baja fertilidad. Un factor de riesgo en la pérdida de gestaciones tempranas es la acidosis ruminal (40).

La semilla de algodón se utiliza extensivamente en las dietas de las vacas bajo sistemas intensivos de producción. Esta semilla, además de ser una excelente fuente de energía, proteína y fibra, contiene altas concentraciones de gosispol. Esta sustancia es muy tóxica en especies monogástricas; sin embargo, el rumiante es relativamente resistente al gosispol debido a que este pigmento es inactivado en el rumen. No obstante, en muchos las dietas con contenidos altos de gosispol ocasionan infertilidad. Las dietas comunes ofrecidas a las vacas lecheras (10% de la MS) provocan concentraciones de gosispol en plasma dentro del margen de seguridad ($< 5 \mu\text{g}/\text{mL}$ de gosispol). Sin embargo, el uso de mayores cantidades de semilla de algodón o la utilización de variedades con mayor contenido de este pig-

mento (Pima), generan concentraciones plasmáticas de gossipol mayores ($> 5 \mu\text{g/mL}$), que afectan la fertilidad. Observaciones recientes de Santos *et al.* (41), en vacas lecheras con dietas que contenían semilla de algodón con mayor contenido de gossipol, mostraron disminución significativa de fertilidad. Además, estudios *in vitro* demuestran un efecto negativo del gossipol en el desarrollo embrionario (42). Así, la adición de $10 \mu\text{g/mL}$ de gossipol al medio de cultivo provoca disminución de la proporción de embriones que alcanzan el estado de blastocisto.

6. Estrés calórico

El ganado lechero es susceptible a las altas temperaturas, prueba de ello es la reducción de la fertilidad cuando el ganado se encuentra en climas cálidos o durante la época del año con mayor temperatura. Así, la concepción llega a caer de 40%, obtenido en los meses templados o fríos del año, hasta 15% durante el verano (43).

Los efectos del estrés calórico en la reproducción del ganado lechero se han incrementado en los últimos años, lo que ha coincidido con el incremento en la producción de leche (44). Se ha observado que el aumento en la producción de leche se refleja en un incremento de la generación de calor metabólico. Esta generación de calor se asocia con el incremento del peso vivo de las vacas lecheras. Así, vacas más grandes tienen mayor aparato digestivo, lo que les permite consumir y digerir más alimento. Durante el metabolismo de los nutrientes se genera calor, el cual contribuye con el mantenimiento de la temperatura corporal, condición favorable en climas fríos. Sin embargo, en climas cálidos el calor se debe eliminar para mantener la temperatura corporal dentro de los rangos normales. La capacidad de termorregulación de la vaca lechera es insuficiente, lo cual ocasiona incremento de la temperatura rectal. En vacas con estrés calórico es común que la temperatura corporal alcance valores entre 39.5 a 41°C (45).

El aumento de la temperatura corporal tiene efectos negativos en la reproducción. En México hay regiones en donde es evidente el efecto negativo del estrés calórico en la fertilidad; así, en las cuencas lecheras de Aguascalientes, Torreón, Chihuahua y Mexicali, se observa reducción del porcentaje de concepción en los meses cálidos (46). En otras regiones del centro del país, como Querétaro, San Luis Potosí o Guanajuato, todavía no

se observa reducción de la fertilidad debida a al estrés calórico; sin embargo, dado que las vacas llevan tendencia ascendente en la producción de leche y, en consecuencia, en la generación de calor, es posible que en los próximos años comience a ser evidente este fenómeno. Una reducción de la fertilidad se ha observado en regiones de Estados Unidos y Canadá, en donde hasta hace pocos años no era evidente el efecto del estrés calórico, y actualmente éste se presenta durante el verano (47).

En condiciones *in vivo*, el estrés calórico durante los días 1 al 7 después del estro afecta el desarrollo embrionario en vacas superovuladas. En condiciones *in vitro*, la exposición de los embriones a temperaturas equivalentes a la temperatura rectal de las vacas bajo estrés calórico (41 °C), disminuye la proporción de embriones que llegan a la etapa de blastocisto (45). La susceptibilidad de los embriones al estrés calórico disminuye conforme éstos avanzan en su desarrollo (48). Así, los embriones de dos células son más susceptibles que los embriones en la etapa de mórula. Independientemente de la etapa del desarrollo en que los embriones son susceptibles al estrés térmico, el resultado final es un aumento de la muerte embrionaria. Asimismo, el estrés calórico puede afectar el mecanismo de reconocimiento materno de la gestación. Las altas temperaturas comprometen la capacidad de los embriones para producir cantidades suficientes de interferón- τ (IFN- τ) u otros productos celulares necesarios para el reconocimiento materno de la gestación (49).

En este sentido, el efecto del estrés calórico no sólo se observa durante los meses más calurosos, también es evidente un efecto a largo plazo (efecto residual) ya que las vacas sometidas a estrés calórico mantienen afectada su función reproductiva aun después que terminó el periodo más caliente del año. Este efecto se explica por el efecto detrimental de las altas temperaturas en los ovocitos durante las diferentes etapas del desarrollo folicular (50).

7. Estrés oxidativo

Las vacas lecheras que son buenas productoras tienen un metabolismo intenso; bajo estas condiciones, 1% a 2% del oxígeno metabolizado se convierte en especies reactivas de oxígeno, las cuales dañan el ADN y las proteínas (51). Las especies reactivas de oxígeno son removidas por sistemas bioquímicos presentes en las células y en los fluidos extracelulares, estos

mecanismos se conocen como sistemas antioxidantes. Estos sistemas incluyen moléculas como el β -caroteno y la vitamina E, que actúan a nivel de la membrana celular hidrolizando peróxidos para mantener la integridad de los fosfolípidos. En este mecanismo también participan enzimas como la glutatión peroxidasa, la cual depende del selenio (52).

Un incremento en la generación de radicales libres puede superar a los mecanismos antioxidantes y comprometer a la función celular; este problema es más drástico cuando existe deficiencia en el consumo de sustancias antioxidantes. La producción excesiva de radicales libres puede afectar la fertilidad debido a que los tejidos esteroideogénicos del ovario, los espermatozoides y los embriones en etapas tempranas de desarrollo, son muy sensibles al daño causado por ellos (53).

La suplementación con antioxidantes es una forma de enfrentar el problema de la baja fertilidad y en varios estudios, en los cuales se han administrado β -caroteno o vitamina E y selenio, se ha mejorado la fertilidad (52).

8. Detección de estros y momento de la inseminación artificial

La baja eficiencia en la detección de estros es la causa más importante de ineficiencia reproductiva en el ganado lechero. Este problema lo padecen todos los hatos lecheros en todo el mundo. En México se detecta, en el mejor de los casos, 60% de las vacas en estro y hay casos extremos en los cuales escasamente observan 30% (54).

La mala detección de estros no sólo afecta la fertilidad a través de disminución del número de vacas inseminadas, también lo hace mediante la alteración de la relación temporal entre el momento de la inseminación artificial y el momento de la ovulación. Desde hace más de 50 años se ha aplicado el esquema de inseminación AM-PM y PM-AM, lo que significa que las vacas que presentan el estro en la mañana son inseminadas en la tarde y las de la tarde se inseminan en la mañana siguiente (55). Este esquema da buenos resultados en fertilidad, siempre y cuando se cuente con una eficiente y precisa detección de estros. En condiciones deficientes en la observación de estros, no se sabe si la vaca observada en estro se encuentra en las primeras o en las últimas horas del periodo de aceptación. De tal forma que si se programa la inseminación 12 h después, es probable

que se realice cuando ya ocurrió la ovulación (inseminación tardía). Esta situación aumenta la probabilidad de encontrar óvulos viejos, ya que la viabilidad de éstos es de 10 h. De esta forma, el óvulo es fertilizado, pero da origen a un embrión que muere en los siguientes días (56). Otro error consiste en inseminar a las vacas cuando no están en estro; este problema es frecuente y contribuye en forma significativa con baja fertilidad en hatos lecheros.

Algunos de los factores que afectan la eficiencia en la detección de estros son el poco tiempo dedicado a esta actividad, mala capacitación del personal, falta de motivación e instalaciones con pisos de cemento mal diseñadas. Otro factor que disminuye significativamente la expresión del estro es el tratamiento con la somatotropina bovina recombinante (bST), que se administra cada 14 días para aumentar la producción de leche. Existe evidencia en vaquillas ovariectomizadas que la bST disminuye la expresión del estro (57).

IV. Conclusiones

La reducción de la fertilidad de las vacas lecheras es el problema reproductivo más importante. Las causas de esta condición son de naturaleza diversa y están asociados factores genéticos, factores de manejo inherentes a la industrialización de la producción de leche y factores ambientales. La selección para la producción de leche, como criterio único, trajo consigo la selección de vacas menos fértiles. Actualmente se tiende a incorporar a los índices de selección, características asociadas con la reproducción, como condición corporal, días abiertos, intervalo entre partos y patrones de función ovárica. Dentro de los factores de manejo que se asocian con la infertilidad, destacan el aumento en el número de vacas por hato, confinamiento, prácticas de alimentación inadecuadas, errores en la técnica de inseminación y baja eficiencia en la detección de estros. El factor ambiental más importante es el incremento en la temperatura, ello ocasiona alteraciones en la función reproductiva y muerte embrionaria temprana. Cualquier intento para mejorar la fertilidad en el ganado lechero deberá considerar a todos los factores en forma integral para obtener buenos resultados.

 Referencias

1. **Butler W.R.** Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 81: 2533-2539, 1998.
2. **Morales RS, Hernández-CJ, Rodríguez TG, Peña F.** Comparación del porcentaje de concepción y la función lútea en vacas de primer servicio, vacas repetidoras y vaquillas Holstein. *Vet. Méx.* 31: 179-184, 2000.
3. **Villa-Godoy A, Hughes TL, Emery RS, Chapin LT, Fogwell RL.** Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71: 1063-1072, 1988.
4. **Lucy MC, Staples CR, Thatcher WW, Erickson PS, Cleale RM, Firkins JL, et. al.** Influence of diet composition, dry-matter intake, milk production and energy balance on time of post-partum ovulation and fertility in dairy cows. *Anim Prod.* 54: 323-331, 1992.
5. **Butler WR.** Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 449-457, 2000.
6. **Ayalon N.** A review of embryonic mortality in cattle. *J. Reprod Fertil.* 54: 483-493, 1978.
7. **Thatcher WW, Staples CR, Danet-Desnoyers G, Oldick B, Schmitt E.P.** Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 72 (Suppl. 3):16-30, 1994.
8. **Zavy MT.** Embryonic mortality in cattle. In: Zavy, M.T., Geisert, R.D., editors.: Embryonic mortality in domestic species. Boca Raton (FL):CRC Press. 99-140, 1994.
9. **Thatcher WW, Bilby TR, Bartolome JA, Silvestre F, Staples CR, Santos JE.** Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology.* 65: 30-44, 2006.
10. **Kazmer GW, Barne, Akers RM, Pearson RE.** Effect of genetic selection for milk yield and increased milking frequency on plasma growth hormone and prolactin concentration in Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 63: 1220-1227, 1986.
11. **Bauman DE.** Bovine somatotropin: Review of an emerging animal technology. *J Dairy Sci.* 75: 3432-3451, 1992.

12. **Lovendahl P, Angus KD, Woolliams JA.** The effect of genetic selection for milk yield on response to growth hormone secretagogues in immature cattle. *J. Endocr.*: 128: 419-424, 1991.
13. **Woolliams JA, Angus KD, Wilson SB.** Endogenous pulsing and stimulated release of growth hormone in dairy calves of high or low genetic merit. *Anim. Reprod.* 56: 1-8, 1993.
14. **Xing GQ, Mackenzie DDS, McCutcheon SN, Wickham BW.** Pancreatic insulin responses to exogenous glucose in Friesian heifers of low or high genetic merit for milk-fat yield. *Anim Prod.* 56: 171-178, 1993.
15. **Barnes MA, Kazmer GW, Akers RM, Pearson RE.** Influence of selection for milk yield on endogenous hormones and metabolites in Holstein heifers and cows. *J Anim. Sci.* 60: 271-284, 1985.
16. **Gröhn YT, Rajala-Schultz PJ.** Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 60-61: 605-614, 2000.
17. **Lucy MC.** Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J Dairy Sci.* 84: 1277-1293, 2001.
18. **Gutierrez CG, Aguilera I, Leon H, Rodríguez, A, Hernández-Cerón J.** The Metabolic Challenge of Milk Production and the Toll it Takes on Fertility. *Cattle Practice.* 13 (1): 5-11, 2005.
19. SAGARPA.: 2001. <http://www.sagarpa.gob.mx/cgcs/>
20. **Salas G.** Reinicio de la actividad ovárica posparto en vacas Holstein bajo sistemas de producción en pequeña escala. (tesis de maestría). Morelia Mich. México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 1998.
21. **Lara V, Hernández CJ, Cruz O, Ortiz O, Gutiérrez CG.** Inicio de la actividad ovarica posparto y características de la función lútea de vacas Holstein. *Memorias del XXVI Congreso Nacional de Buiatría, Acapulco, Gro. México. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos,* 2002.
22. **Thatcher WW, Wilcox CJ.** Pospartum oestrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow. *J Dairy Sci.* 56: 608-610, 1973.
23. **Opsomer G, Coryn M, Deluyker H, de Kruif A.** An analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cows after calving based on progesterone profiles. *Reprod. Domest. Anim.* 33: 193-204, 1998.

24. **Lamming GE, Darwash AO.** The use of milk progesterone profiles to characterize components of subfertility in milked dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 52: 175-190, 1998.
25. **Mann GE, Lamming GE.** The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Dom Anim.* 34: 269-274, 1999.
26. **Vasconcelos JL, Sangsritavong S, Tsai SJ, Wiltbank MC.** Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. *Theriogenology.* 60: 795-807, 2003.
27. **Hernández CJ, Morales RJS.** Falla en la concepción en el ganado lechero: Evaluación de terapias hormonales. *Vet Méx.* 32: 279-287, 2001.
28. **Lopez H, Satter LD, Wiltbank MC.** Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science.* 81: 209-223, 2004.
29. **Hansen LB.** Consequences of selection for milk yield from a geneticist's viewpoint. *J. Dairy Sci.* 83: 1145-1150, 2000.
30. **Royal M, Mann GE, Flint APF.** Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *Vet. J.* 160: 53-60, 2000.
31. **Darwash AO, Lamming GE, Woolliams JA.** Estimation of genetic variation in the interval from calving to postpartum ovulation of dairy cows. *J Dairy Sci.* 80: 1227-1234, 1997.
32. **Darwash AO, Lamming GE, Woolliams JA.** The phenotypic association between the interval to postpartum ovulation and traditional measures of fertility in dairy cattle. *J Anim Sci.* 65: 9-16, 1997.
33. **Jones HE, White IMS, Brothstone S.** Genetic evaluation of Holstein Friesian sires for daughter condition score changes using a random regression model. *Anim. Sci.* 68: 467-475, 1999.
34. **Pryce JE, Royal MD, Garnsworthy PC, Mao IL.** Fertility in the high producing dairy cow. *Livest Prod Sci.*, 86:125-135, 2004.
35. **Harris BL.** Breeding dairy cattle for economic efficiency: a New Zealand pasture based system. In: *Proceedings of the 6th World Congress Genetics Applied to Livestock Production.* Armdale, Australia. 25: 383-386, 1998.
36. **Cavestany D, Galina CS.** Factors affecting the reproductive efficiency of artificial insemination programmes in a seasonal breeding pasture-based dairy system with the aid of milk progesterone. *Reprod Domest Anim.*, 36: 85-89, 2001.

37. **Horan B, Mee JF, O'Connor PO, Rath M, Dillon P.** The effect of strain of Holstein-Friesian cow and feeding system on postpartum ovarian function, animal production and conception rate to first service. *Theriogenology*, 63: 950-971, 2005
38. **Medina CM.** Estudio del metabolismo y la relación de los trastornos metabólicos con la productividad de vaquillas Holstein-Friesian neocelandesas y americanas en pastoreo controlado. Tesis de doctorado. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1998.
39. **Hernández-Cerón J, Ortega A, Fernández I, Raigoza G, Montaldo H.** Fertilidad y producción de leche de vacas Holstein americanas, australianas y uruguayas en estabulación. *Arch Zootec.* 55: 289-292, 2006.
40. **Ortiz O.** Análisis de sobrevivencia y serología prospectiva en el estudio de abortos. Memorias del Séptimo Curso Internacional de Reproducción Bovina. mayo 19-22; 1997. México (DF): Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C, 29-42, 1997.
41. **Santos JEP, Villaseñor M, Robinson PH, DePeters EJ, Holmberg CA.** Type of cottonseed and level of gossypol in diets of lactating dairy cows: Plasma gossypol, health, and reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 86: 892-905, 2003.
42. **Hernández-Cerón J, Jousan FD, Soto P, Hansen PJ.** Timing of Inhibitory Actions of Gossypol on Cultured Bovine Embryos. *J Dairy Sci* ;88: 922-928, 2005.
43. **Aréchiga FCF.** Efectos adversos del estrés calórico en la reproducción del ganado bovino. En Hernández Cerón J Editor. *Mejoramiento Animal: Reproducción.* México (DF). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 135-150, 2000.
44. **Wolfenson D, Z Roth, and R Meidan.** Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 535-547, 2000.
45. **Hansen PJ, Drost M, Rivera RM, Paula-Lopes FF, Al-Katanani YM, Krininger III CE, and CC Chase Jr.** Adverse impact of the heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology.* 55: 91-103, 2001.
46. **Lozano DR.** Efecto del estrés calórico sobre el desarrollo folicular, fertilidad, el desarrollo y calidad del embrión y la función lútea en vacas

- Holstein. Tesis de doctorado. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 2004.
47. **Kadzere CT, Murphy MR, Silanikove N and E Maltz.** Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Productions Science.* 77: 59-91, 2002.
 48. **Edwards JL, and PJ Hansen.** Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.* 46: 138-145, 1997.
 49. **Putney DJ, M Drost and WW, Thatcher.** Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperature between days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology* 30: 195-209, 1998.
 50. **Roth Z, Meweidan R, Shaham-Albalancy A, Braw-Tal R, and D Wolfenson.** Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-size and preovulatory bovine follicles. *Reproduction.* 121: 745-51, 2001.
 51. **Nockels ChF.** Antioxidants improve cattle immunity following. *Anim Feed Tech,* 62:: 59-68, 1996.
 52. **Aréchiga FCF, Vázquez-Flores S, Ortiz O, Hernández-Cerón J, Porras A, Mcdowell LR, Hansen PJ.** Effect of injection of B-carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology.* 50: 65-76, 1998.
 53. **Aréchiga FCF.** Efecto de los antioxidantes y su uso potencial en incrementar la eficiencia reproductiva del Ganado bovino. *Memorias del VIII Curso Internacional de Reproducción Bovina;* mayo 24-27; 1999. México, (DF): Universidad Nacional Autónoma de México, División de educación continua, :155-179, 1999.
 54. **Hernández CJ, Porras AA, Benítez S.** Eficiencia de la detección de estros y niveles de progesterona al momento de la inseminación de vacas Holstein. *Av. en Inv. Agropecuaria ;*3: 12-17, 1994.
 55. **Trimberger GW.** Breeding efficiency in dairy cattle from artificial insemination at various intervals before and after ovulation. *Nebraska Agric. Exp. Stn. Bull.,* 153: 3, 1948.
 56. **Hunter RHF.** Fertility in cattle: basic reasons why late insemination must be avoided. *Anim Breed Abstr .*53: 83-87, 1985.

57. **Lefebvre DM, Block E.** Effect of recombinant bovine somatotropin on estradiol-induced estrous behavior in ovariectomized heifers. *J Dairy Sci.* 75: 1461-1464, 1992.

Los fitoestrógenos y sus efectos en la regulación endocrina del aparato reproductor de mamíferos domésticos



Mario Pérez Martínez
Jesús Aragón Hernández

I. Introducción	94
II. Estudios en animales de laboratorio	94
III. Estudios en rumiantes.....	98
IV. Estudios en animales de compañía	100
V. Conclusiones y perspectivas de investigación.....	101
Referencias	103

I. Introducción

Existe un gran número de publicaciones recientes que se refieren a los beneficios potenciales de los fitoestrógenos (Fest) en la salud animal y humana. En este sentido, se han identificado componentes de la soya que tienen propiedades en la prevención del cáncer, entre éstos destacan los inhibidores de proteasas y los fitoestrógenos conocidos como isoflavonas (1-4).

Asimismo, se ha documentado que algunos Fest pueden tener efectos nocivos sobre la fertilidad en animales (5-10).

Los Fest se clasifican en tres categorías principales: *a*) Los flavonoides que se encuentran principalmente en la soya y el trébol; *b*) los cumestanos que son abundantes en la alfalfa; y *c*) los lignanos (3, 11).

La mayoría de los fitoestrógenos pertenecen al grupo de los flavonoides y éstos se clasifican en subgrupos (2). Las isoflavonas son el grupo de fitoestrógenos más conocido y son abundantes en soyas, tallos de alfalfa y legumbres (2, 3).

Debido a que la harina de soya es una fuente proteínica muy utilizada en la alimentación de animales de granja y de laboratorio, se ha considerado que los animales que son alimentados con este producto pudieran experimentar a largo plazo efectos similares a los producidos por los estrógenos endógenos a partir de los metabolitos de los fitoestrógenos (6).

El contenido de los fitoestrógenos en las plantas varía dependiendo de la zona geográfica y de la estación del año, ello hace aún más complejo su estudio. Asimismo, se ha informado que la concentración del fitoestrógeno cumestrol en los ensilados de alfalfa varía de acuerdo con cultivo y madurez de la planta (12).

La presente revisión tiene como propósito ofrecer una panorámica sobre el estado actual de la investigación respecto del efecto de los fitoestrógenos dietarios en la regulación endocrina del aparato reproductor en algunas especies de mamíferos domésticos.

II. Estudios en animales de laboratorio

La mayor parte de lo que se conoce sobre los efectos de los estrógenos ambientales en el tracto genital femenino proviene de estudios efectua-

dos en animales de laboratorio. En general, estos efectos pueden dividirse en anomalías de desarrollo, alteración del ciclo estral y de la fertilidad (5).

Los fitoestrógenos pueden ejercer su actividad biológica a través de: *a)* mimetizar la acción de los estrógenos endógenos, *b)* comportarse como antagonistas estrogénicos, y *c)* modificando el patrón de síntesis y metabolismo de las hormonas endógenas.

Se ha observado que la dieta seleccionada para estudios de toxicidad endocrina en roedores puede influir en el resultado de los estudios. Según esto último, existe interés por investigar los tipos de dietas que existen para animales de laboratorio con base en sus ingredientes. Algunas dietas para ratas pueden afectar el desarrollo sexual de machos y hembras, por ello es necesario conocer la composición de las dietas de roedores y seleccionar una dieta con baja concentración de fitoestrógenos, como dietas libres de soya a base de cereales o dietas con poca soya (10).

En este sentido, se ha informado que el contenido de isoflavona en las dietas puede afectar directamente el peso uterino de ratas jóvenes y algunos procesos reproductivos dependientes de estrógenos (13).

En un estudio efectuado en ratones ovariectomizadas carentes del receptor funcional a estrógenos α que recibieron tratamiento con coumestrol en la dieta, se encontró que el coumestrol tiene efectos antiestrogénicos en la hipófisis y en el cerebro y que el receptor a estrógenos de tipo α media dichos efectos, de este estudio se concluyó que el coumestrol puede antagonizar los efectos neuroendocrinos de los estrógenos (14).

En otro estudio se evaluaron los efectos interactivos del coumestrol en las respuestas a concentraciones bajas de estradiol en ratones ovariectomizados que recibieron este fitoestrógeno en el agua de bebida y se demostró que el coumestrol actúa como un estrógeno convencional y solo tiene efectos aditivos con el estradiol (15).

En este contexto, se ha informado que una sola inyección de coumestrol (3 mg) en ratas en etapa neonatal es suficiente para suprimir los mecanismos inductores de ovulación y e inducción de lordosis (16).

En un estudio efectuado en ratas ovariectomizadas se evaluó la actividad estrogénica y antiestrogénica de extractos de trébol rojo (*Trifolium pratense*) en el útero, células vaginales y glándula mamaria. El extracto se administró en tres dosis (250, 500 y 750 mg/kg/día) en presencia y en ausencia de 17β -estradiol (50 μ g/kg./día). De este estudio se concluyó que

el trébol rojo tiene efectos estrogénicos en el útero y en la células vaginales de la rata, no obstante que dichos efectos no se observaron en la glándula mamaria. Asimismo, el extracto del trébol rojo no indujo efectos estrogénicos aditivos o antiestrogénicos cuando se administró junto con 17 β -estradiol (17).

El fitoestrógeno genisteina tiene actividad potente *in vivo* e *in vitro* (6), su estructura química es parecida a la de los estrógenos endógenos; sin embargo, muestra menor afinidad que el estradiol por los receptores α y β ; en consecuencia, la genisteina puede competir con el estradiol por los sitios de unión al receptor de estrógenos (18). También se ha evaluado el efecto de la genisteina en ratones CD-1 hembra administrado en la etapa neonatal sobre el inicio de la pubertad, en la función ovárica y la gestación. Al respecto se ha informado que este fitoestrógeno tiene efectos deletorios sobre el sistema reproductivo murino en desarrollo. Dentro de los efectos adversos identificados con dosis elevadas, destacan la presencia de ciclos estrales irregulares, alteración en la función ovárica, senescencia reproductiva temprana y subfertilidad e infertilidad (8).

En este sentido, se ha estudiado el efecto de las isoflavonas de la leche de soya sobre la expresión de los receptores a estrógenos, a progesterona y al antígeno nuclear de proliferación celular en el útero de ratas sexualmente maduras. En este estudio se demostró que la exposición a isoflavonas en concentraciones comparables a los rangos de exposición en humanos, modifican la expresión del receptor a progesterona regulado por estrógenos en el útero. La expresión aumentada del receptor a progesterona sugiere que la exposición a los fitoestrógenos de la soya durante el desarrollo reproductivo puede tener consecuencias en la salud reproductiva en el largo plazo (19).

Los efectos de los isoflavonoides en el comportamiento animal son de tipo antiestrogénico, se ha demostrado que aun a concentraciones fisiológicas los fitoestrógenos pueden alterar la expresión de genes dependientes de estrógenos en el cerebro y en la conducta animal de roedores (20).

Hoy día existe mucho interés por estudiar la utilidad de los fitoestrógenos como hormonas de reemplazo para el manejo de las alteraciones que se presentan en la fisiología ósea y reproductiva en mujeres en la etapa de la menopausia. En este sentido, se ha evaluado el efecto estrogé-

nico de una planta originaria de Asia occidental conocida como *Pueraria mirifica* y *Pueraria lobata* en modelos animales. Recientemente se comparó la actividad estrogénica de tres cultivos distintos de *Pueraria mirifica* colectados de diferentes localidades en Tailandia en ratas de raza Wistar, hembras, adultas, utilizando un ensayo de citología vaginal. En este estudio se encontraron resultados similares en los ensayos de citología vaginal al comparar los efectos estrogénicos del valerato de estradiol, genisteína, *Pueraria lobata* y *Pueraria mirifica* en ratas ovariectomizadas (21).

Asimismo, en conejos machos alimentados durante largo tiempo con dieta a base de soya o con suplemento de isoflavonas de soya, se encontró que los animales que recibieron grandes cantidades de isoflavonas en su dieta presentaron menor peso corporal y menor volumen seminal; sin embargo, la espermatogénesis, la morfología de los órganos genitales y su comportamiento sexual no varió significativamente del grupo testigo; se concluyó que el régimen dietario crónico que recibieron con soya no tuvo efectos adversos sobre los parámetros reproductivos estudiados (6).

Se ha planteado que los estrógenos y los fitoestrógenos predisponen a la disfunción eréctil, al respecto se efectuó un estudio con el fin de evaluar el papel de los receptores a estrógenos en el cuerpo cavernoso del pene de conejos de raza Nueva Zelanda, blancos. Para este fin a un grupo de animales se le administró valerato de estradiol y otro recibió el fitoestrógeno daidzeína durante 12 semanas. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento con estradiol y la exposición crónica al fitoestrógeno puede causar alteraciones en la función eréctil mediadas por los receptores α y β (22).

En cerdas gestantes se evaluaron los efectos del fitoestrógeno daidzeína sobre los niveles del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para el RE β y del gen para el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1R) en diferentes tejidos de lechones recién nacidos. Se concluyó que la daidzeína inhibe la expresión del gen para el RE β en el hipotálamo del cerdo; la regulación a la baja de la expresión del gen para el RE β en el hipotálamo sugiere los posibles efectos centrales de la daidzeína en el sistema neuroendocrino (23).

Asimismo, los fitoestrógenos genisteína y daidzeína inhiben la síntesis de hCG durante la gestación; esto último se ha estudiado en células del trofoblasto humano. La exposición a estos compuestos similares a los

estrógenos naturales durante los periodos sensibles del desarrollo pueden tener la capacidad de alterar la función del sistema reproductivo y así afectar la fertilidad (16).

Se ha informado que el útero de chinchillas (*Eryomys laniger*) implantadas con el microestrógeno zeranol presenta cambios en su estructura histológica. Entre los cambios histológicos observados destaca el aumento de dos a tres veces las dimensiones del útero, congestión vascular en el tejido conjuntivo de la mucosa uterina, presencia de leucocitos en el endometrio y mayor número de glándulas endometriales (24).

Los ratones hembra *Knockout* a la enzima aromatasa se caracterizan por su incapacidad para sintetizar estrógenos, son anovulatorios y su proceso de foliculogénesis está detenido. Estos animales han servido como modelo para probar los efectos del reemplazo fitoestrogénico *in vivo*. En un estudio en el que se dieron dietas suplementadas con fitoestrógenos a ratones hembra, *Knockout*, a la enzima aromatasa, se evaluaron sus efectos sobre el peso de los órganos reproductivos, la morfología ovárica y la concentración de gonadotropinas. Se encontró que la genisteína incrementa significativamente el peso ovárico y uterino en los ratones *Knockout* utilizados; además incrementó la concentración de gonadotropinas séricas con respecto a los animales testigo sin dieta suplementada con fitoestrógenos, estos hallazgos permitieron a los autores demostrar el efecto estrogénico de la genisteína en el modelo empleado (25).

En este contexto, se estudió la importancia de los estrógenos en la espermatogénesis en ratones *Knockout* a la aromatasa y se encontró que concentraciones relativamente bajas de fitoestrógenos dietarios influyen sobre el desarrollo y función testicular (26).

III. Estudios en rumiantes

Mediante estudios *in vivo* e *in vitro* se ha evaluado el papel de los fitoestrógenos de la soya y sus metabolitos sobre la regulación de la síntesis de prostaglandinas en el endometrio bovino. Las prostaglandinas son moléculas que modulan la ciclicidad fisiológica de los órganos del aparato reproductor femenino. En este sentido, se ha encontrado que los fitoestrógenos derivados de la soya tienen la capacidad de regular la secreción de la $\text{PGF}_2\alpha$ y PGE_2 *in vivo* en el endometrio de la vaca durante el ciclo estral

y la gestación temprana. En algunos casos, a los metabolitos fitoestrogénicos activos; equol y para-etil-fenol se les ha considerado responsables de algunos problemas de fertilidad en vacas. Ello posiblemente asociado a la estimulación de la expresión del gen para la sintasa de la $\text{PGF}_2\alpha$, lo que se manifiesta en aumento en la síntesis de $\text{PGF}_2\alpha$ en las células epiteliales; además se ha observado que los fitoestrógenos y sus metabolitos activos disminuyen significativamente la viabilidad de las células estromales, lo que altera el balance fisiológico en la síntesis de la $\text{PGF}_2\alpha$ luteolítica y la PGE_2 luteotrópica, efectos que pueden alterar la función del útero gestante y del útero ciclando (10). Este hallazgo puede estar directamente relacionado con la causa de muerte embrionaria temprana que se presenta en vacas que reciben una dieta rica en soya (27, 28, 29).

En este contexto, se efectuó un estudio en vacas con el fin de determinar si los metabolitos de fitoestrógenos: equol y para-etil-fenol pueden influenciar directamente las funciones secretoras del cuerpo lúteo (CL) por medio de la estimulación de factores luteolíticos, como $\text{PGF}_{2\alpha}$ y testosterona (T). En este estudio se demostró que los metabolitos de los fitoestrógenos utilizados estimuló la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ en las células esteroidogénicas del CL bovino vía la ruta genómica dependiente del receptor a estrógenos (30).

Existe un problema reproductivo en vacas, conocido como "síndrome estrogénico", que se caracteriza por la presencia de ciclos estrales irregulares y un bajo índice de concepción, acompañado de quistes ováricos, hiperplasia uterina y metritis (27, 31).

En un estudio efectuado en vacas lecheras en el Estado de México, la concentración de coumestrol en la alfalfa con la que se alimentaban estos animales estaba incrementada (66.8 mg/kg alfalfa seca); no obstante que la mayoría de los animales estudiados presentaban concentraciones fisiológicas de 17β estradiol, éstos presentaban signos sugestivos de síndrome estrogénico, por lo que se atribuyó a la concentración elevada de coumestrol la causa del síndrome (31).

En ovejas ovariectomizadas se efectuó un estudio con el fin de demostrar que la genisteina exógena infundida en el tercer ventrículo del cerebro, puede afectar la actividad secretora del eje GnRH/LH durante la estación reproductiva; se encontró que las infusiones de genisteina en el tercer ventrículo cerebral afecta la actividad secretora de las neuronas

GnRH en el hipotálamo, la síntesis de la subunidad LH β en las células adenohipofisarias, el almacenamiento de gránulos hormonales y la liberación de LH al torrente sanguíneo. El carácter bifásico de la respuesta a LH observado en los animales infundidos con genisteina es similar al inducido por el estradiol durante la estación reproductiva en las ovejas (32).

El efecto de la genisteina sobre la expresión de LH β , FSH β y el RE α en las células hipofisarias también se ha estudiado recientemente en la oveja en el periodo de ausencia de actividad sexual. A través de la infusión de genisteina en el tercer ventrículo cerebral, se observó que ésta afecta la producción de LH, pero no de las células productoras de FSH, en las glándulas hipofisarias. De acuerdo con las características morfológicas, se sugiere que la genisteina estimula la expresión del RE α en las células positivas a LH β , una disminución en la cantidad de gránulos secretores almacenados en las células productoras de LH y aumento en la síntesis de la subunidad β para LH (33).

El efecto de los fitoestrógenos sobre el aparato genital femenino parece depender de la edad a la que es expuesto el individuo y del tiempo de exposición. Se ha observado que, como resultado de la exposición neonatal a fitoestrógenos, ocurre falta de ciclicidad y se presenta un estado de estro persistente acompañado de cornificación vaginal. La llamada "enfermedad del trébol" en la oveja se caracteriza porque afecta la fertilidad de las hembras, los fitoestrógenos de esta planta ocasionan prolapso uterino, útero hidrópico y piometra (5).

IV. Estudios en animales de compañía

Se ha determinado concentración de Fest en algunos alimentos comerciales para perros, gatos y roedores; se han encontrado como principales fitoestrógenos las isoflavonas, daidzeina, la genisteina y cumestrol. Es probable que estas concentraciones tengan efectos biológicos en perros y gatos cuando son consumidos durante periodos largos (11, 34).

En el perro la administración de genisteina durante 4 a 52 semanas es bien tolerada y no ocasionó efectos de toxicidad sistémica en dosis superiores a los 500 mg/kg/día administrado oralmente por más de 52 semanas. Los efectos primarios con dosis muy altas de genisteina se han descrito en el aparato reproductor de perros machos y hembras, esos efectos

serían esperados con un compuesto que tiene una actividad estrogénica débil (18).

V. Conclusiones y perspectivas de investigación

Con base en la información disponible hasta el momento, se sabe que los Fest tienen efectos estrogénicos y potencialmente antiestrogénicos en los animales domésticos. Dentro de los efectos inducidos por estos compuestos, destacan los cambios hormonales en el ciclo estral y en el inicio de la gestación, cambios en el comportamiento sexual, alteraciones en el balance secretor de prostaglandinas, un posible papel protector contra el desarrollo de cáncer hormonodependiente, alteraciones en la actividad secretora de gonadotropinas y en la producción de semen. Las evidencias experimentales obtenidas hasta el momento a partir de modelos animales sugieren que es muy importante el tiempo de exposición a los fitoestrógenos y que la exposición en la etapa neonatal ocasiona los efectos más pronunciados.

Por lo anterior, la evaluación del contenido de Fest en las dietas comerciales utilizadas en la alimentación de animales de laboratorio resulta de gran importancia en virtud de que éstos compuestos podrían tener un efecto en los resultados experimentales.

Con la información disponible hasta el momento se aprecia la necesidad de evaluar otras posibles implicaciones fisiológicas de los FEST sobre la fisiología de los aparatos reproductores masculino y femenino, respectivamente, como sus repercusiones en el sensible balance neuroendócrino del eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

Tomando en cuenta las múltiples implicaciones fisiológicas de los estrógenos de origen gonadal en la regulación de procesos fisiológicos fundamentales para la vida, es necesario continuar estudiando el papel de los estrógenos dietarios en distintos procesos fisiológicos, como el inicio de la pubertad en las especies animales de interés zootécnico, en la implantación embrionaria, en el desarrollo fetal y en la respuesta inmunológica en los ámbitos local y sistémico.

Asimismo, es importante evaluar los posibles efectos adversos de los fitoestrógenos sobre el desarrollo y la diferenciación celular, en virtud de que muchas de las alteraciones que se presentan en ambos eventos se manifestarán en el individuo recién nacido.

En un estudio recientemente publicado se aportan evidencias sobre el efecto de la isoflavona de soya, incluida en la dieta de ratas macho, sobre el grado de ansiedad y liberación de hormonas asociadas al estrés, como la corticosterona (35). A partir de este estudio se aprecia la necesidad de considerar el efecto de los fitoestrógenos dietarios como parte de los criterios a tomar en cuenta al momento de evaluar el grado de bienestar animal y sus repercusiones en su capacidad productiva.

En la presente revisión se abordan informes de investigación recientes que demuestran la importancia de los Fest; sin embargo, es necesario continuar estudiando su impacto en la fisiología neuroinmunoendocrina de los animales domésticos; en este sentido, el médico veterinario zootecnista tiene un papel relevante en la investigación como un vínculo entre las diferentes especialidades de la medicina, en virtud de que sus conocimientos de la fisiología comparada le permiten relacionar e interpretar la información obtenida a partir de diferentes modelos animales para la investigación en este tópico.

 **Referencias**

1. **Diel P, Smolnikar K, Schulz T, Laudенback-Leschowski U, Michna H and Vollmer G.** Phytoestrogens and carcinogenesis-differential effects of genistein in experimental models of normal and malignant rat endometrium. *Hum Reprod* 2001; 16: 997-1006.
2. **Messina MJ and Loprinzi CL.** Soy for breast cancer survivors: A critical review of the literature. *J Nutr* 2001; 131: 3095S-3108S.
3. **Stopper H, Schmitt E and Kobras K.** Genotoxicity of phytoestrogens. *Mutation Research* 2005; 574: 139-155;
4. **Usui T.** Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocrine Journal* 2006; 53: 7-20.
5. **Burton JL and Wells M.** The effect of phytoestrogens on the female genital tract. *J Clin Pathol* 2002; 55: 401-407.
6. **Cardoso JR, Báo and SN.** Effects of chronic exposure to soy meal containing diet or soy derived isoflavones supplement on semen production and reproductive system of male rabbits. *Animal Reproduction Science*, 2006.
7. **Faqi AS, Johonson WD, Morrissey RL, McCormick DL.** Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. *Reproductive Toxicology* 2004; 18: 605-611.
8. **Jefferson WN, Padilla-Banks E and Newbold R.** Adverse effects on female development and reproduction in CD-1 mice following neonatal exposure to the phytoestrogen genistein at environmentally. *Biology of Reproduction* 2005; 73: 798-806.
9. **Naciff JM, Overmann GJ, Torontall SM, Carr GJ, Tiesman JP, and Daston GP.** Impact of the phytoestrogen content of laboratory animal feed on the gene expression profile of the reproductive system in the immature female rat. *Environmental Health Perspectives* 2004;112 :1519-1526.
10. **Odum J, Tinwell H, Jones K, Van Miller JP, Joiner RL, Tobin G, Kawasaki H, Deghenghi R and Ashby J.** Effect of rodent diets on the sexual development of the rat. *Toxicology Sciences* 2001; 61: 115-127.
11. **Cerundolo R, Court MH, Hao Q and Michel KE.** Identification and concentration of soy phytoestrogens in commercial dog foods *AJVR* 2004; 65 :592-596.

12. **Moravcová J, Kleinová T, Loucka R, Tyrolová I, Kvasnicka F, Dusek M, Cerovsky M and Matucha P.** Coumestrol content of alfalfa following ensilage. *Animal Feed Science and Technology* 2004;115:159-167.
13. **Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G and Curran I.** The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. *Food and Chemical Toxicology* 2003; 41: 1517-1525.
14. **Jacob DA, Temple JL, Patisaul HB, Young LJ and Rissman E.** Coumestrol antagonizes neuroendocrine actions of estrogen via the estrogen receptor α . *Exp Biol Med* 2001; 226 :301-306.
15. **Pocock VJ, Sales GD and Milligan SR.** Comparison of the oestrogenic effects of infant milk formulae, oestradiol and the phytoestrogen coumestrol delivered continuously in the drinking water to ovariectomised mice. *Food and Chemical Toxicology* 2002; 40: 643-651.
16. **Kouki T, Okamoto M, Wada S, Kishitake M and Yamanouchi K.** Suppressive effect of neonatal treatment with a phytoestrogen, coumestrol, on lordosis and estrous cycle in female rats. *Brain Research Bulletin* 2005; 64:449-454.
17. **Burdette JE, Liu J, Lantvit D, Lim E, Booth N, Bhat KP, Hedayat S, Van Breemen R, Constantinou A, Pezzuto JM, Farnsworth NR and Bolton JL.** *Trifolium pratense* (Red Clover) exhibits estrogenic effects in vivo in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *J Nutr*, 2002; 132: 27-30.
18. **McClain RM, Wolz E, Davidovich A, Pfannkuch F.** Subchronic and chronic safety studies with genistein in dogs. *Food and Chemical Toxicology* 2005; 43: 1461-1482.
19. **Hughes CL, Liu G, Beall S, Foster WG and Davis V.** Effects of genistein or soya milk during late gestation and lactation on adult uterine organization in the rat. *Exp Biol Med* , 2004; 229: 108- 117.
20. **Whitten PL, Patisaul HB and Young LJ.** Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. *Neurotoxicology and Teratology* 2002; 24: 47-54.
21. **Malavijitnond S, Chansri K, Kijkuokul P, Urasopon N and Cherdshewasart W.** Using vaginal cytology to assess the estrogenic activity of phytoestrogen-rich herb. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 107 (3): 354-360.

22. **Srilatha B and Adaikan PG.** Estrogen and phytoestrogen predispose to erectile dysfunction: do ER- α and ER- β in the cavernosum play a role?. *Urology* 2004; 63:382-386.
23. **Ren MQ, Kuhn G, Wegner J, Nurnberg G, Chen J and Ender K.** Feeding daidzein to late pregnant sows influences the estrogen receptor beta and type 1 insulin-like growth factor receptor mRNA expression in newborn piglets. *Journal of Endocrinology* 2001; 170:129-135.
24. **Figuroa AS, Fernández RR, Anzaldúa AS and Pérez MM.** Cambios en la estructura histológica del útero de chinchillas (*Eryomys laniger*) jóvenes y adultas implantadas con zeranol. *Veterinaria México* 2001; 32:7-12.
25. **Britt KL, Simpson ER and Findlay JK.** Effects of phytoestrogens on the ovarian and pituitary phenotypes of estrogen-deficient female aromatase *Knockout* mice. *Menopause*, 2005;12: 174-185.
26. **Robertson KM, O'Donnell L, Simpson ER and Jones ME.** The phenotype of the aromatase *Knockout* mouse reveals dietary phytoestrogens impact significantly on testis function. *Endocrinology* 2002;143: 2913-2921.
27. **Muñoz MR and Murillo AL, Pérez- Gutierrez JF and Cordova Izquierdo A.** Parámetros reproductivos en vacas Holstein alimentadas con alfalfa alta en cumestrol. *Arch Zootec*, 2002;51: 373-376.
28. **Woclawek-Potocka I, Bah MM, Korzekwa A, Piskula MK, Wiczkowski W, Depta A and Skarzynski DJ.** Soybean-derived phytoestrogens regulate prostaglandin secretion in endometrium during cattle estrous cycle and early pregnancy. *Exp Biol Med* 2005 230:189-199.
29. **Woclawek-Potocka I, Okuda K, Acosta TJ, Korzekwa A, Pilawski W and Sharzynski D J.** Phytoestrogen metabolites are much more active than phytoestrogens themselves in increasing prostaglandin F 2α synthesis via prostaglandin F 2α synthase-like 2 stimulation in bovine endometrium. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 2005; 78: 202-217.
30. **Woclawek-Potocka I, Bober A, Korzekwa A, Okuda K and Sharzynski DJ.** Equol and para-ethyl-phenol stimulate prostaglandin F 2α secretion in bovine corpus luteum: Intracellular mechanisms of action. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 2006; 79: 287-297
31. **Romero RC, Tarragó CM, Muñoz MR, Arista RR, Rosado GA.** Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. *Vet Méx* 1997; 28: 25-30.

32. **Wojcik-Gladysz A, Romanowicz K, Misztal T, Polkowska J and Barcikowski B.** Effects of intracerebroventricular infusion of genistein on the secretory activity of the GnRH/LH axis in ovariectomized ewes. *Animal Reproduction Science* 2005; 86: 221-235.
33. **Polkowska J, Ridderstrale Y, Wankowska M, Romanowicz K, Misztal T, Madej A.** Effects of intracerebroventricular infusion of genistein on gonadotrophin subunit mRNA and immunoreactivity of gonadotrophins and oestrogen receptor- α in the pituitary cells of the anoestrous ewe. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2004; 28:217-224.
34. **Court MH and Freeman LM.** Identification and concentration of soy isoflavones in commercial cat foods. *AJVR* 2002;63: 181-185.
35. **Hartley DE, Edwards JE, Spiller CE, Alom N, Tucci S, Seth P, Forsling M and File S.** The soya isoflavone content of rat diet can increase anxiety and stress hormone release in the male rat. *Psychopharmacology* 2003;167:46-53.

Mecanismos celulares y endocrinos afectados por la subnutrición en Pequeños Rumiantes



Ofelia Mora

Héctor Vera-Ávila

Armando Shimada

Resumen: Español e Inglés.....	108
I. Introducción	109
1) Algunos aspectos actuales de la ganadería de pequeños rumiantes en México	109
2) Tipos de restricción nutricional o alimentaria.....	110
II. Efectos de la subnutrición en el tubo digestivo y otros tejidos.....	111
1) Efectos sobre la mucosa intestinal.....	112
2) Efectos sobre el transporte intestinal de iones	112
3) Efectos sobre la permeabilidad intestinal.....	113
4) Efectos sobre la absorción de nutrimentos	113
5) Efectos en el hígado	114
6) Efectos en el tejido adiposo	115
III. Efecto de la subnutrición sobre el eje hipotalámico-pituitario-gonadal	120
IV. Conclusiones.....	124
Referencias	126

Resumen

En México el pastoreo de pequeños rumiantes es una de las actividades agropecuarias más importantes en las regiones áridas y semiáridas, donde los animales se crían bajo sistemas de pastoreo extensivo. En estas regiones, la época de sequía puede prolongarse varios meses, ello disminuye la cantidad y calidad de los nutrimentos disponibles en forma natural para los animales. Lo anterior implica, en animales criados con baja utilización de alimentos complementarios, la presentación recurrente de estados de subnutrición, con pérdidas de peso y condición corporal que afectan su bienestar y productividad. En la presente revisión se recopila información relacionada con los efectos de la subnutrición sobre la regulación endocrina y el funcionamiento a nivel celular, del tubo digestivo, hígado, tejido adiposo y eje hipotalámico-pituitario-gonadal. El enfoque es dirigido a estos órganos, tejidos y sistemas, debido a que por su contribución al metabolismo general del organismo, representan puntos importantes para el establecimiento de mecanismos de adaptación metabólica al estrés nutricional.

Palabras clave: SUBNUTRICIÓN, PEQUEÑOS RUMIANTES, TUBODIGESTIVO, HÍGADO, TEJIDO ADIPOSO, EJE HIPOTALÁMICO-PITUITARIO-GONADAL

Abstract

In Mexico, the shepherding of small ruminants is one of the most important agricultural activities for the arid and semiarid regions, areas where the animals grow up fundamentally under extensive systems. In these regions, the drought can last several months, and diminishes the quantity and quality of the available nutrients in natural form for the animals. The latter implies, particularly in animals raised under extensive systems of production with low utilization of supplementary food, the appearance of states of undernutrition with losses of weight and body condition that can affect severely their well-being and productivity. In the present review, information is compiled on the effects of undernutrition on the endocrine regulation and function at the cellular level, of digestive tube, liver, adipose tissue and hipotalamic-pituitary-gonadal axis. The approach is directed towards these organs, tissues and systems, due to their relative

contribution to the general metabolism, which represent important points for the establishment of adaptive mechanisms to the nutritional stress.

Key words: UNDER NUTRITION, SMALL RUMINANTS, DIGESTIVE TUBE, LIVER, ADIPOSE TISSUE, HIPOTALAMIC-PITUITARY-GONADAL AXIS.

I. Introducción

Algunos aspectos de la situación actual de la ganadería de pequeños rumiantes en México

La subalimentación crónica de pequeños rumiantes es un fenómeno cotidiano en muchas regiones en las que se conjugan dos situaciones: 1) clima árido o semiárido, donde los periodos de sequía se extienden varios meses, afectando la cantidad y calidad de nutrimentos disponibles en forma natural a partir de los pastizales, y 2) una difícil situación económica, que impide hacer frente a las marcadas fluctuaciones en la disponibilidad natural de nutrimentos, mediante la adquisición y aporte de alimento complementario.(1).

En México el pastoreo de pequeños rumiantes es una de las actividades agropecuarias más importantes para las regiones áridas y semiáridas (2). En el periodo 1999-2001, el inventario nacional de ovinos y caprinos fue de 5 948 764 y 9 068 435 cabezas, respectivamente, con producción, durante 2001, de 36 011 toneladas de carne ovina y 39 046 toneladas de carne caprina, más 139 900 litros de leche, de esta última especie.

La mayor población de animales de estas especies se concentra en Puebla, Estado de México, Oaxaca, Hidalgo, San Luis Potosí, Coahuila, Guerrero y Guanajuato (3). En estos lugares los sistemas de explotación son principalmente de tipo extensivo, donde las necesidades nutricionales de los animales se cubren mediante el consumo de forrajes disponibles en el agostadero, y eventualmente con alimentos que les son ofrecidos en forma complementaria por el productor (4).

Bajo las condiciones comunes de producción de pequeños rumiantes en México, los animales enfrentan estados recurrentes de subnutrición, con fluctuaciones en el peso y la condición corporal, que comprometen severamente su bienestar y productividad. Sin embargo, los ovinos y caprinos domésticos, han sido capaces de sobrevivir aun bajo esas condiciones, quizá como resultado de un largo periodo de adaptación evolutiva, refor-

zado por la intervención del hombre a través de la selección de genotipos resistentes a condiciones adversas (5, 6).

Tipos de restricción nutricional o alimentaria

Es importante distinguir entre diferentes tipos de restricciones alimentarias: a) De calidad: proteínicas, energéticas o ambas. b) De cantidad: con base en un porcentaje del consumo de materia seca observado o esperado. c) En relación a una escala de tiempo: de corta, media o larga duración, que requieren que los animales se adapten a un nuevo equilibrio en diferente contexto nutricional o fisiológico para cada caso (5). Esta última puede presentarse tanto en las restricciones de calidad como en las de cantidad.

En general bajo circunstancias de restricción nutricional, los animales pueden, aunque no por tiempo indefinido, hacer uso de sus reservas corporales e incluso disminuir su tasa metabólica basal o suspender algunas funciones no esenciales para su sobrevivencia, como el crecimiento y la actividad reproductiva (6). Después de un periodo de movilización de reservas corporales, éstas deberán de ser restablecidas cuando las condiciones sean más favorables, para permitir la reactivación de las funciones no esenciales para sobrevivir que fueron temporalmente suspendidas. La movilización de reservas corporales y el riesgo de sufrir un déficit alimentario, se amplifica durante la gestación y la lactancia, por el incremento de los requerimientos fisiológicos.

Para explicar lo que ocurre durante períodos de deficiencia alimentaria en mamíferos y aves, varios investigadores (7-12) han descrito, con base en la forma de utilización de la energía y la proteína, tres fases metabólicas a través de periodos prolongados de subnutrición:

- ❑ **Fase I:** Período corto de adaptación (1-3 días). Se caracteriza por la utilización de glucógeno y lípidos, así como por una reducción neta en la utilización de proteínas.
- ❑ **Fase II:** Corresponde a un largo periodo de ahorro proteínico. Está asociada con el uso de lípidos como fuente primaria de energía. La mayor parte del gasto energético depende de la oxidación de las grasas, lo cual ocurre principalmente en la mitocondria del hepatocito y en los peroxisomas (10, 13).
- ❑ **Fase III:** Es una fase que se caracteriza por un marcado aumento en la utilización de proteínas (11).

El paso entre las fases II y III no es resultado del agotamiento de los lípidos, porque del 10% al 20% de las reservas iniciales de lípidos permanecen aún disponibles durante dicha transición. (13).

En los últimos años se ha generado gran cantidad de información acerca del efecto de la restricción nutricional sobre el tamaño y actividad de diversos órganos y tejidos, así como sobre la tasa metabólica basal y los mecanismos celulares implicados en ambos casos. Aquí se recopila dicha información con un enfoque dirigido a los efectos de la subnutrición sobre la regulación endocrina y el funcionamiento a nivel celular de tubo digestivo, hígado, tejido adiposo y eje hipotalámico-pituitario-gonadal. Dichos órganos, tejidos y sistemas fueron seleccionados debido a su importante contribución relativa al metabolismo general del organismo, y a que por ello representan puntos importantes para el establecimiento de mecanismos de adaptación metabólica al estrés nutricional.

Es importante señalar que gran parte de las investigaciones relativas a los efectos de la subnutrición sobre la fisiología animal se han realizado en especies no rumiantes. Por lo anterior, en los casos en que no se cuenta con información específica obtenida a partir de animales rumiantes, se presentan datos de mamíferos no rumiantes. Lo anterior sin presuponer que dicha información sea extrapolable a los primeros, pero sí como indicador de posibles mecanismos fisiológicos que posteriormente necesitarán reconfirmarse, en modelos animales de especies rumiantes.

II. Efectos de la subnutrición en el tubo digestivo y otros tejidos

La subnutrición tiene efectos marcados en la estructura de la mucosa, así como sobre las funciones de transporte del intestino delgado.

El tubo digestivo es el primer sistema directamente afectado por cambios en el consumo de nutrimentos, y es importante recordar que el intestino delgado utiliza del 17% al 25% del consumo total de oxígeno del organismo, es decir, es un órgano metabólicamente costoso que se ve afectado por disminución en el consumo de nutrimentos (14).

Se ha visto que asociado a los cambios estructurales provocados por la subnutrición a nivel intestinal, se presentan cambios funcionales, como

la reducción de la capacidad de absorción total que actúan como mecanismos compensatorios favorables. Sin embargo, otros cambios funcionales, como los asociados al transporte de iones, pueden ser no favorables, ya que exacerban los efectos de los patógenos entéricos y de otros agentes que estimulan la actividad secretoria intestinal (15).

Efectos sobre la mucosa intestinal

El ayuno (de 24 horas o más)(16) y la restricción de proteína y de proteína-energía(17) disminuyen el volumen de la mucosa intestinal; pero se ha observado en roedores que este efecto es compensado por incremento en la absorción de las vellosidades y microvellosidades hasta en 80 veces (16).

En la literatura se notifican algunos resultados contradictorios, como disminución de la altura de las microvellosidades en algunos casos (18) o incremento en la altura y número por unidades de área (19). La restricción calórica disminuye el peso corporal pero tiene poco efecto sobre la anatomía intestinal (15).

En ovinos cuyas madres sufrieron de desnutrición durante la gestación, se ha observado una disminución en la masa intestinal y en la tasa de maduración de los enterocitos (20).

Son coincidentes las observaciones en cuanto a que existe menor número de células como resultado de disminución en la proliferación y en la tasa de migración celular, así como incremento en las tasas de pérdida celular y apoptosis (21-24).

Efectos sobre el transporte intestinal de iones

El transporte activo de iones (Na^+ , Cl^- y HCO_3^-) a través del intestino delgado provee las fuerzas electroquímicas necesarias para la absorción de los nutrimentos, así como para la absorción o secreción neta de agua. Debido a esto, gran variedad de agentes incluyendo hormonas locales y sistémicas, neurotransmisores, toxinas liberadas por patógenos entéricos y otras moléculas, pueden atravesar el lumen intestinal estimulando el transporte de estos iones y del agua (15, 25, 26).

Está claro que los movimientos netos de iones y agua a través del intestino delgado en estados basales, varían mucho entre especies, y dentro de una especie, la longitud del intestino delgado es importante. Para un segmento intestinal el transporte basal está influenciado por factores

como edad, estado reproductivo, fluidos corporales, balance electrolítico, estrés, composición de la dieta y frecuencia de alimentación (15).

Algunos estudios han evaluado el efecto de la subnutrición sobre el transporte intestinal de iones *in vitro*, midiendo para ello los cambios en el circuito corto de corriente basal de Na^+ y Cl^- , como indicador de movimientos activos de iones, se ha observado que la subnutrición y el ayuno inducen cambios en el estado basal hacia uno de más secreción. En lechones se ha observado que la subnutrición produce incremento neto en el flujo de Cl^- (27).

Las restricciones alimentarias producen incremento en el transporte de iones, en respuesta a secretagogos intestinales que son agonistas de AMPc y GMPc, así como los que estimulan la secreción intracelular de calcio (27).

En general, la subnutrición sensibiliza al intestino hacia agentes que causan diarrea y exacerba los signos y su severidad.

Efectos sobre la permeabilidad intestinal

La subnutrición incrementa el movimiento de macromoléculas a través del epitelio intestinal en diversas especies. Este aumento en la absorción de macromoléculas parece deberse a incremento en la endocitosis al nivel de los bordes de cepillo. Este fenómeno se ha relacionado a una respuesta adaptativa para maximizar la absorción de proteínas (28).

Asimismo esta condición se ha asociado con estrés oxidativo en la mucosa intestinal. Este estrés puede afectar la función epitelial debido a un incremento en la peroxidación lipídica y subsecuentemente daño a las membranas plasmáticas de los enterocitos (29).

Efectos sobre la absorción de nutrimentos

La subnutrición ocasiona disminución de la masa total de la mucosa, del número total de células y de la superficie de absorción; todo ello produce disminución de la absorción de nutrimentos.

En el caso de los glúcidos, se sabe que los transportadores de glucosa se incrementan de acuerdo con el nivel de glúcidos de la dieta. Sin embargo, en diversos estudios (30, 31) se ha encontrado que en la subnutrición se observa incremento (por miligramo de intestino o de proteína) en los transportadores de glucosa a nivel del borde de cepillo, indepen-

dientemente del decremento en el volumen de mucosa. Estos resultados indican que la tasa de transporte de glucosa puede incrementarse aún cuando la concentración luminal de ésta sea muy baja. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan este paso son aún desconocidos. Similar a lo ocurrido con los azúcares, el transporte de aminoácidos y péptidos se incrementa durante la restricción alimentaria; los aminoácidos en donde se ha visto un mayor incremento son aquellos cuyo transporte es dependiente de Na^+ (32).

Efectos en el hígado

El hígado es un órgano que realiza gran cantidad de funciones que se interrelacionan. Las funciones básicas del hígado se pueden dividir en 1) vasculares, para almacén y filtrado de la sangre, 2) metabólicas, que se relacionan con gran parte de los sistemas metabólicos del organismo y 3) secretoras y excretoras. Es una glándula exocrina arreglada en acinis, los cuales drenan sus productos hacia el ducto biliar (sales biliares) y una glándula endocrina (por ejemplo, factores de crecimiento parecidos a la insulina, IGF) en la que sus productos son vertidos hacia las sinusoides. Como órgano metabólico está ordenado en dos caminos vasculares aferentes, la arteria hepática y la vena porta; con un sistema venoso único, que es la vena central (33, 34).

En el hígado, los hepatocitos poseen diferentes capacidades según su localización (pericentral o periportal). El metabolismo oxidativo de la energía, la síntesis de glucosa, el metabolismo de lípidos y aminoácidos, así como la conjugación de la glutatona y la formación de los ácidos biliares se lleva a cabo en la zona periportal. En la zona pericentral se efectúa la glucólisis, la síntesis de ácidos grasos, y la cetogénesis, así como el metabolismo y detoxificación de algunos xenobióticos (33).

En experimentos con ratas se observó disminución del 20% de la proteína hepática después de periodos de ayuno de 48 horas (10). Algunos autores (35) informan que el ayuno de 72 horas en ratas, reduce la masa de hígado e intestinos en 42% y 28%, respectivamente. También observaron disminución en la relación proteína/ADN, ello significa que el hígado es fuente lábil de proteína que puede ser utilizada para suplir aminoácidos a tejidos periféricos. Asimismo, se ha observado que el consumo de oxígeno puede disminuir entre 63% y 71%, después de 21-24 días de restricción alimentaria en corderos.

En un estudio (36) donde se midió carnitina palmitoil transferasa y acil graso CoA oxidasa como indicadores de la actividad de β -oxidación mitocondrial hepática, observaron que durante la fase de intensa utilización de lípidos, el aumento en la oxidación de ácidos grasos está asociado con la remodelación de los lípidos hepáticos. Ésta puede alterar la función celular, a través de señales hormonales y de transducción y llevar a la fase de uso y desperdicio proteínico. Otro estudio (37) señala que la restricción alimentaria de hasta 20 días de duración, produce incremento del ARN mensajero de la enzima piruvato carboxilasa y muestran que los mensajeros de fosfoenol-piruvato-carboxicinasa, carbamoil-fosfato-sintetasa, argino-succinato-sintetasa y la ornitina-transcarbamilasa permanecieron sin cambio.

Aunque los mecanismos involucrados en el incremento de la utilización de proteína en la fase III no están claros, se sugiere que la composición de los lípidos es importante; es decir, aunque está visto que las reservas grasas no se agotan por completo, la disposición y composición de los ácidos grasos libres puede afectar el uso de proteína; aunque la concentración de ácidos grasos no cambia durante el ayuno, su participación en el recambio de proteína es cuestionable., siendo la influencia de los lípidos de la membrana, una probable explicación. La modificación de la composición de los fosfolípidos hepáticos durante la desnutrición puede ocurrir en otros tejidos y estos cambios pueden estar involucrados en importantes relaciones actividad-estructura.

En la función endocrina del hígado existe evidencia de que en bregos subalimentados se pueden ver disminuidas señales anabólicas mediadas por IGF circulantes, lo que se pudiera deber a la disminución en la expresión del gen de la sub-unidad ácido lábil (ALS), la cual se une en el plasma a IGF, IGFBP-3 o a IGFBP-5 para formar complejos ternarios, prolongando de esta forma la vida media de éstas (38).

Efectos en el tejido adiposo

El tejido adiposo es la mayor fuente de combustible metabólico. Es almacenado en forma de triglicéridos. En animales adultos este tejido representa 20% al 30% del peso corporal y puede ser equivalente a más de 85% del total de la energía almacenada. La oxidación de las grasas rinde dos veces más energía que en los glúcidos o las proteínas. El almacenamiento de las proteínas y los glúcidos (glucógeno) requiere de agua. La grasa es almace-

nada más eficientemente debido a su naturaleza hidrofóbica, por ello no requiere agua para su almacenamiento (39).

El metabolismo de los lípidos está ligado al de glúcidos y proteínas. Los productos de su degradación (glicerol, alanina, lactato, glutamina y ácidos grasos) son sustratos gluconeogénicos. Luego de una comida, los enterocitos sintetizan triacilglicéridos (TGA) que se secretan a la circulación como quilomicrones. Para que los ácidos grasos invadan a los adipocitos, se requiere acción de la lipoproteína lipasa (LPL), que induce lipólisis intravascular y se regula por la concentración de insulina plasmática (39).

La inanición es un proceso durante el cual existen cambios definidos en la utilización de la energía. Estos cambios están integrados en los ciclos alimentación-ayuno, de tal manera que haya un continuo aporte de fuentes energéticas, siendo los principales la glucosa y los ácidos grasos no esterificados (NEFAS). Sin embargo, si esta situación continúa por más de 24 horas, las reservas de glúcidos se agotan y los NEFAS se convierten en la principal fuente de energía, junto con los aminoácidos (39).

Como ya se mencionó, el tejido adiposo es fuente importante de energía durante los periodos de escasez de nutrimentos en los rumiantes (40); como signo de la movilización de las reservas de grasa corporal, se observa incremento en los niveles de ácidos grasos libres de cadena larga y glicerol. Sin embargo, en el suero los lípidos totales y los ácidos grasos polinsaturados (PUFAS) parecen disminuir (41).

Algunos autores (42) observaron en renos (*Rangifer tarandus tarandus* L.) sometidos a periodos de restricción alimentaria de larga duración (invierno-primavera) una disminución del 29.4% en los PUFAS (especialmente 18:2 y 18:3n-3), así como en el ácido linoleico y ésteres de colesterol séricos, lo que sugiere que éstos no son sintetizados *de novo*, o que su degradación es mayor que su síntesis.

Otros investigadores (43) observaron disminución sérica de los ésteres de colesterol-18:2 en animales restringidos (de 48% a 29%), ello concuerda con lo informado en niños con severa desnutrición energético-proteínica (46% vs. 32%). Esto se puede explicar partiendo de que en humanos y en algunos rumiantes, los ésteres de colesterol son sintetizados por la lecitina-colesterol aciltransferasa plasmática, la cual tiene alta afinidad por 18:2 (44).

La movilización de la grasa corporal varía de acuerdo con la severidad de la restricción de alimento (nivel de alimentación y duración) y a la grasa corporal inicial. Se informan pérdidas de 5.9 kg de grasa (equivalente al 28% de los lípidos totales iniciales) en ovejas vacías y secas que tenían grasa corporal moderada (290 g lípidos/kg peso) y que consumieron 40% de sus requerimientos de mantenimiento durante ocho semanas (5).

En este sentido, se observó que ovejas con diferente cantidad de grasa corporal (10.3 vs. 33.8 kg), que fueron sometidas a restricción de alimento de 21 semanas, perdieron cantidades similares de proteína, pero diferentes cantidades de grasa (6.3 vs. 15.4 kg)(45), lo que podría sugerir que la pérdida es proporcional a la cantidad de grasa inicial.

Las pérdidas de grasa durante la lactancia temprana o en los periodos de desnutrición, son variables y se ven afectadas por la producción de leche o el número de crías que está amamantando la hembra. En hembras lactando se observan pérdidas de 30%-40% de la grasa corporal en ovejas, cabras y vacas en las primeras seis semanas de lactancia, estas pérdidas se pueden incrementar hasta 80% si los animales se encuentran mal alimentados (45). Las diferencias entre animales secos y en lactancia para mantener intensa movilización de lípidos, quizá están relacionadas con el drenaje mamario de NEFAS.

Los lípidos en los rumiantes pueden ser sintetizados *de novo*, a partir de ácido acético y en menor grado de lactato, principalmente en el tejido adiposo, o pueden provenir de la hidrólisis de los triglicéridos plasmáticos por la LPL. La disminución en la tasa de síntesis de ácidos grasos y en la actividad de la LPL durante periodos de ayuno y el retorno a valores previos o más altos durante la realimentación es más lenta en rumiantes que en no rumiantes debido al efecto amortiguador del rumen (47).

En bovinos adultos se ha observado que las enzimas lipogénicas del tejido adiposo subcutáneo son menos responsables en periodos de restricción-realimentación que las del tejido adiposo perirenal; sin embargo, la actividad de la LPL es igual en ambos sitios en ovinos y bovinos. Estos cambios de deben a una regulación pretranslacional de enzimas claves, como LPL y la ácido graso sintetasa (48).

La regulación de la cantidad y la actividad de las enzimas lipogénicas durante restricciones alimentarias de mediana duración, es resultado de

una disminución en la secreción de insulina. Estas regulaciones homeostáticas de la lipogénesis quizá son exacerbadas por cambios en las concentraciones de insulina y sustratos lipogénicos, en particular incremento de los NEFAS, disminución de acetato, triglicéridos y menos marcado de glucosa (48).

Se ha asociado un incremento en la secreción de la hormona del crecimiento en periodos de desnutrición, en especial con lactancias tempranas, lo cual produce disminución del efecto lipogénico de la insulina sobre el tejido adiposo.

El incremento plasmático de NEFAS puede inhibir directamente la expresión génica o la actividad de las enzimas lipogénicas, y también inducir resistencia a insulina (5).

La salida de NEFAS del tejido adiposo es resultado neto de la lipólisis de triglicéridos de los adipositos, inducida por la lipasa sensitiva a hormona. Los niveles plasmáticos de los NEFAS se incrementan durante el ayuno, hasta alcanzar una meseta (cerca a 1 mM) entre los 4-8 días. Probablemente esto es resultado de mecanismos de retralimentación antilipolíticos, para prolongar la sobrevivencia o para aliviar los efectos tóxicos de altas concentraciones de NEFAS (2mM) (5).

El aumento en la movilización de los NEFAS durante periodos de balance negativo en lactancia temprana y durante periodos crónicos de desnutrición, se debe a disminución en la reesterificación de los ácidos grasos, unido a un incremento en la lipólisis.

Como ya se mencionó, los cambios en la movilización de las grasas durante la restricción de alimento, pueden estar ligados a cambios en la glicemia y la insulinemia, así como a cambios en la actividad del sistema nervioso simpático y en la secreción de catecolaminas. La glucosa y la insulina estimulan la reesterificación de los ácidos grasos, además de que la insulina inhibe la lipólisis y las catecolaminas estimulan la lipólisis (47). *In vitro* se ha observado en bovinos que el ayuno o la restricción de alimento disminuyen el número de receptores de adenosina (antilipolíticos) y se incrementan la afinidad de los receptores β -adrenérgicos, así como la expresión del gen de la lipasa sensitiva a hormona. La respuesta β -adrenérgica a la desnutrición se debe a los receptores β_2 (48).

En cuanto al efecto de la hormona del crecimiento, ésta incrementa el efecto lipolítico de la adrenalina. Cuando los rumiantes están en balance

energético positivo, los cuerpos cetónicos provienen del metabolismo del butirato que pasa a través de la pared ruminal; durante la desnutrición, la cetogénesis se incrementa debido a la oxidación de los NEFAS y los triglicéridos, en el hígado se efectúa este proceso.

Además de su papel como reserva energética, el tejido adiposo tiene una función endocrina que secreta factores autocrinos, paracrinos y endocrinos. En años recientes se ha demostrado que el tejido adiposo produce una serie de citocinas, tales como el factor de necrosis tumoral, la leptina y el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1. También puede formar hormonas como estradiol y cortisol, a partir de sus precursores. Además, posee actividad monoamino-oxidasa a partir de la cual pueden metabolizar catecolaminas y otras aminas biogénicas (5, 39).

La leptina es una hormona proteínica que producen los adipocitos; es un factor lipostático crónico que regula el apetito, el gasto energético, la presión sanguínea, y es componente importante en la regulación de la actividad reproductiva.

La síntesis y secreción de leptina está influenciada por las reservas energéticas en el tejido adiposo, así como por otros factores (cuadro 1). El tamaño de los adipocitos es determinante en la síntesis de leptina; los adipocitos más grandes contienen más leptina que los pequeños. Los niveles de leptina en la sangre se correlacionan con las reservas grasas. Los cambios en la concentración de leptina como respuesta al ayuno/alimentación son proporcionales a los cambios en el peso o en la grasa corporal (49). Se ha propuesto que la disminución en los niveles plasmáticos de leptina durante periodos de malnutrición, es importante en las adaptaciones neuroendocrinas que aseguran la sobrevivencia animal. Esta disminución en la concentración de leptina, es señal para incrementar el consumo de alimento, aumentar la secreción de glucocorticoides, disminuir la actividad tiroidea, bajar el gasto energético y la síntesis de proteínas, así como limitar la actividad reproductiva (5).

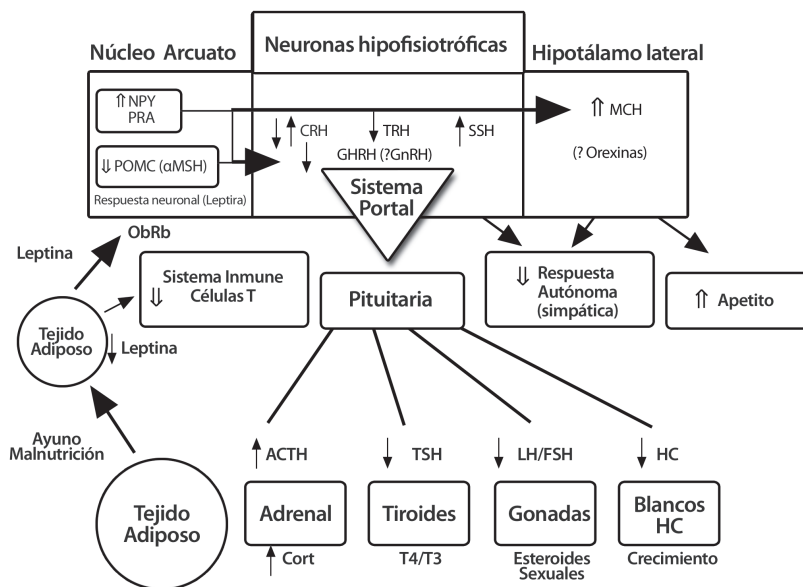
Las neuronas sensibles a leptina de los núcleos arcuato, ventromedial y dorsomedial del hipotálamo expresan neuropéptidos o neurotransmisores implicados en la regulación central del balance de energía (figura 1). El receptor de leptina largo (Ob-Rb) se coexpresa con el neuropéptido Y.

CUADRO 1.
Factores que regulan la expresión de leptina

Sitio	Aumento	Disminución
Tejido adiposo	Sobrealimentación Obesidad (excepto mutación ob) Insulina Glucocorticoides Infección aguda Citocinas(FNT- α , IL-1, LPS)	Ayuno Testosterona Agonistas β -adrenérgicos Tiazolidinodionas (<i>in vitro</i>) Hormonas tiroideas Exposición al frío
Placenta	Insulina Glucocorticoides Hipoxia	Peso bajo al nacimiento
Músculo esquelético	Glucosamina Glucosa Lípidos	
Estómago (región fúndica)		Alimentación Colecistocinina

Adaptado de Ahima y Flier, 2000

Hipotálamo



Adaptado de Ahima y Flier, 2000

FIGURA 1.

Papel de la leptina en la adaptación al ayuno. La disminución en la concentración circulante de leptina por ayuno o malnutrición produce a nivel del núcleo arcuato un incremento en la expresión del neuropéptido Y (NPY) y del péptido relacionado al gen agouti (AGRP), así como una disminución en la expresión de proopiomelanocortina (POMC) y del producto de transcripción regulado por anfetamina y cocaína (CART). El NPY y AGRP estimulan el consumo de alimento (orexigénicas), mientras que la hormona estimulante de los melanocitos alfa (α -MSH, producto de POMC) y CART lo inhiben (anorexigénicas). Los grupos neuronales NPY y POMC del núcleo arcuato también proyectan hacia el hipotálamo lateral regulando la expresión de la hormona concentradora de melanina (MCH) que es un potente orexigenico. Se ha visto que la disminución de leptina también disminuye la respuesta inmune. ObRb, receptor largo para leptina; CRH, hormona liberadora de corticotropina; TRH, hormona liberadora de tirotropina; GHRH, hormona liberadora de somatotropina; GNRH hormona liberadora de gonadotropinas; SS, somatostatina; ACTH, hormona adrenocorticotropa; Cort, Cortisol; TSH, hormona estimulante de la tiroides; T4/T3, tetra- y triyodotironina; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona folículo estimulante; GH, hormona del crecimiento.

III. Efecto de la subnutrición sobre el eje hipotalámico-pituitario-gonadal

En los mamíferos la limitación o suspensión temporal de actividades no esenciales para la sobrevivencia individual, como el crecimiento en los animales jóvenes o la reproducción en los sexualmente maduros, representa un mecanismo fisiológico de adaptación a la subnutrición.

En ese sentido, es importante considerar que la reproducción y lactancia en los mamíferos constituyen eventos energéticamente muy demandantes (50). Por ello, la posibilidad de limitar la actividad reproductiva, representa un mecanismo de adaptación metabólica de gran potencial y utilidad para hacer frente a condiciones de restricción nutricional (51, 52).

En condiciones ordinarias de la producción animal, el estado energético de los individuos determina su capacidad reproductiva (53, 54). Dicho estado depende de la relación entre el consumo, el gasto y las reservas corporales de energía y en caso de ser interpretado como deficitario, puede afectar según su intensidad a diferentes procesos reproductivos. En los machos, puede retrasar la pubertad y reducir en forma permanente la capacidad espermatogénica, cuando el déficit energético ocurre en individuos sexualmente inmaduros. En las hembras también retrasa la pubertad, y después interrumpe los ciclos ovulatorios, prolonga el periodo de anovulación posparto, disminuye la tasa ovulatoria o aumenta la mortalidad embrionaria temprana (54).

La vía fundamental por la cual el estado energético influye sobre la función reproductiva, es a partir de la regulación de la frecuencia de secreción pulsátil de la hormona liberadora de gonadotropinas hipotalámica (GnRH) y de la hormona luteinizante hipofisaria (LH) (53-56). Hasta ahora, sólo se conocen parcialmente los mecanismos fisiológicos a través de los cuales el estado energético es capaz de regular la secreción de GnRH y LH; sin embargo, la integración a nivel del sistema nervioso central (SNC) de señales metabólicas relacionadas con las reservas corporales de energía (estado energético estático) y con su movilización o el ingreso de energía al organismo a partir del consumo de alimento (estado energético dinámico) son definitorios (52). En relación con ello, podrían existir diferencias entre especies no rumiantes y rumiantes en cuanto a cómo opera dicha integración. Ejemplo de elloes la falta de consistencia en el efecto de restric-

ción en el consumo de alimento sobre la frecuencia de secreción pulsátil de LH en especies ruminantes (57, 58), que comúnmente se expresa como disminución en la frecuencia de secreción de esta hormona en especies no ruminantes (59).

Independientemente de lo anterior, en especies ruminantes existen evidencias de la interacción entre los estados energéticos estático y dinámico en términos de la regulación de secreción de LH al igual que en otras especies no ruminantes. En hembras caprinas, el ayuno por tres días provoca disminución en la frecuencia de secreción pulsátil de LH, pero sólo en animales con malas reservas energéticas corporales (60). Asimismo, el ayuno por 60 h no afecta la secreción de LH en vacas con buena condición corporal (58), pero sí en vaquillas prepúberes en crecimiento, que a pesar de su buena condición corporal, presumiblemente tienen una menor reserva adiposa que los animales maduros (61). Asimismo, las reservas energéticas corporales son capaces de modular el significado de señales metabólicas relacionadas con la homeostasis energética. En ovinos, la dosis intracerebroventricular de leptina requerida para ocasionar depresión del apetito es mayor en animales con mala condición corporal vs. animales con buena condición (62).

Aunque los efectos fisiológicos de leptina son diversos, los más relevantes se relacionan con la regulación de eventos asociados al metabolismo energético (apetito y balance energético); (63) y a la función reproductiva (secreción de GnRH/LH)(62, 64). En ambos casos, el hipotálamo representa el centro integrador de las señales periféricas regulatorias. Además de la vinculación de la leptina con la ocurrencia de la pubertad en ratones y ratas hembra (65, 66), se ha observado que el tratamiento con leptina previene el efecto inhibitorio del ayuno sobre la secreción de LH en ratas hembra (67), monos rhesus machos (68) y ovinos macho castrados tratados con estradiol (69). Se ha concluido que un componente importante en la regulación por leptina de estos eventos reproductivos, es la modulación de secreción de LH a partir de la regulación de secreción de GnRH (55). Sin embargo, el efecto de leptina sobre la secreción de GnRH parece ser indirecto, involucrando a interneuronas hipotalámicas que conectan con las neuronas endocrinas GnRH que no expresan receptores funcionales para leptina (52, 68). Existen firmes evidencias, que señalan a las neuronas que expresan neuropéptido Y (NPY) en el núcleo arcuato, como las interneuro-

nas mediadoras del efecto de leptina sobre la secreción de GnRH. Sin embargo, a su vez se ha sugerido la existencia de otro grupo neuronal cuyo neuromediador no ha sido identificado, y que en conjunto con las neuronas NPY conforman el camino de señalización leptina-GnRH (70). Cabe mencionar que las neuronas NPY del núcleo arcuato, están involucradas con el control del apetito y metabolismo energético, vinculando a su vez a la leptina con la regulación de esos eventos (70).

Asimismo, algunos de los efectos de leptina sobre la función reproductiva son bloqueados por tratamientos que inhiben la utilización celular de glucosa (55,71). Además, la síntesis y secreción de leptina es regulada en forma aguda por el consumo de alimento (58, 72) y por la propia disponibilidad de combustibles metabólicos (52). Existen otros moduladores de la secreción de leptina, como el fotoperiodo en ovinos (73) y se ha demostrado un ritmo circadiano en humanos, aunque esto no se ha explorado específicamente en rumiantes. Con base en lo anterior, se sugiere que el papel de la leptina en el control de la reproducción es actuar como mediador o modulador de las señales asociadas con la disponibilidad o utilización celular de combustibles metabólicos (52, 55). Como mediador, las fluctuaciones en su concentración plasmática podrían ser el elemento que se use para definir la calidad del estado energético, involucrando a interneuronas como las NPY del núcleo arcuato que conectan con las neuronas GnRH. En términos de su función moduladora, la leptina podría regular la respuesta de estructuras que actúan como sensores de señales metabólicas, al alterar la disponibilidad, ingreso celular y oxidación de combustibles metabólicos en esas estructuras.

La disponibilidad de combustibles metabólicos a nivel del SNC, particularmente glucosa, es capaz de regular la secreción de GnRH/LH, por ello se ha propuesto como un mediador del efecto de la restricción nutricional sobre la reproducción (52,74,75,76,77). La existencia de sitios que actúan como glucosensores a nivel central para regular el apetito y la glicemia se ha demostrado en ratas, localizándose principalmente en la médula oblonga (zonas ventrolateral y dorsomedial) (78). Se ha sugerido que estructuras presentes en esa región están relacionadas con el efecto supresor de la glucoprivación inducida por inhibidores metabólicos de utilización de glucosa (2-deoxiglucosa, 2DG) sobre la secreción pulsátil de LH (76). El Área Postrema (AP) es un órgano circunventricular localizado

en la zona dorsomedial de la médula oblonga, se encuentra fuera de la barrera hematoencefálica, contiene neuronas responsivas a glucosa (79) y es importante en la transferencia de información en cuanto a disponibilidad de glucosa a centros cerebrales superiores que controlan respuestas de comportamiento (80). Asimismo, en la rata hembra la remoción del AP previene el efecto inhibitorio de la hipoglicemia inducida por insulina sobre la secreción pulsátil de LH, por lo que se sugiere que esta estructura es fundamental en la inhibición del generador hipotalámico de pulsos de GnRH ocasionada por el estrés hipoglicémico (81).

También se ha sugerido que el AP puede ser un sitio importante de integración de la señal representada por la leptina y señales asociadas con la disponibilidad y utilización de combustibles metabólicos como las concentraciones circulantes de glucosa e insulina (52). La infusión de leptina en el 4º ventrículo cerebral previene el anestro inducido por ayuno en hamsters sirios (71). En cerdos se ha identificado la expresión del ARNm del receptor largo para leptina (Ob-R1) en el AP (82). El efecto de leptina sobre la secreción de LH parece depender de la disponibilidad de glucosa y de su percepción en glucosensores, ya que la administración de 2DG inhibe el efecto de leptina sobre la secreción de LH (71) y el tratamiento con leptina es incapaz de restaurar la secreción de LH en ratas tratadas con 2DG (55). La integración de señales metabólicas a nivel del AP podría implicar que a ese nivel la leptina fuera capaz de actuar como modulador de la señal asociada con la disponibilidad de combustibles metabólicos (glucosa), en forma similar a lo propuesto para el control del apetito por leptina y el neuropéptido Y (83). En este sentido, la leptina podría actuar a nivel del AP estimulando la incorporación de glucosa, mediante la modulación de proteínas involucradas con el transporte de este metabolito al interior de la célula (55).

Al igual que la leptina, la insulina es una hormona que aparentemente vincula el estado energético con la función reproductiva (70). Sus concentraciones circulantes tienen relación con las reservas corporales de grasa y se reflejan en las concentraciones de la hormona a nivel del SNC (84). Aunque su función principal tiene que ver con la homeostasis de la glucosa, existen evidencias de que señalan a la insulina como un regulador directo de las neuronas endocrinas GnRH y de la secreción de LH. En ratones el incremento de las concentraciones circulantes de insulina, man-

teniendo condiciones controladas de glicemia (clamp hiperinsulinémico) estimula la secreción de LH (85). Estudios con cultivos primarios de células neuronales hipotalámicas o con células Gnv-3 (línea celular neuronal que expresa GnRH), indican que este efecto de insulina sobre la secreción de LH es mediado por la regulación directa de la secreción de GnRH hipotalámica (70). Éstos y otros hallazgos incluyen a la insulina como una de las señales metabólicas importantes que relacionan el estado energético con la función reproductiva (70, 86).

Por último, existen evidencias que involucran a señales periféricas derivadas del tracto gastrointestinal, como las hormonas Ghrelina y Polipéptido YY (PYY₃₋₃₆), en el grupo de señales metabólicas con capacidad de regular la secreción de GnRH y LH y que al integrarse determinan la condición del estado energético y el nivel de expresión de la función reproductiva (86). Asimismo, otros mediadores centrales, como la kisspeptina (producto del gen *Kiss1*) secretada como neuromediador por grupos neuronales en los núcleos arcuato y preóptico, parecen ser parte del complejo grupo de señales que regulan el funcionamiento de las neuronas GnRH y permiten la integración de la función reproductiva con el estado energético del organismo (86).

IV. Conclusiones

Queda claro que la sobrevivencia de los animales subalimentados depende de la duración y severidad de la restricción de alimento, y de las reservas corporales previas a la restricción, lo que modificará la cinética y los límites fisiológicos de la movilización de la grasa y proteína.

Estudios en humanos, ratas y aves, muestran que en animales magros, la duración de la restricción está limitada por el agotamiento de la reserva lipídica, y depende de la capacidad gluconeogénica de los aminoácidos movilizados. Sin embargo, se ha visto que ovejas gordas subalimentadas murieron antes de que perdieran del 25%-30% de su proteína corporal, y que 50% de sus lípidos corporales fueron movilizados. Estos animales dejaron de comer, quizá debido a los problemas metabólicos causados por el exceso en la movilización de los lípidos. Por tanto, la grasa corporal no previno la movilización de proteína, y el exceso de grasa quizá inhibió posibles adaptaciones de la movilización proteínica. Esto impli-

ca que los mecanismos endocrinos-celulares que se desencadenan para adaptarse a la subnutrición no son iguales en animales rumiantes que en no rumiantes. Respecto de la función reproductiva, es claro que su regulación representa un mecanismo metabólico de gran potencial para enfrentar condiciones de subnutrición, particularmente en lo que se refiere al ahorro de energía. Esa regulación involucra a un grupo complejo de señales periféricas y centrales, que son utilizadas para interpretar la condición del estado energético del organismo y que directa o indirectamente controlan el funcionamiento de las neuronas GnRH. La integración funcional de estos componentes ha sido explorada y entendida parcialmente sobre, todo en especies no rumiantes; sin embargo, algunas evidencias indican que podría ser diferente en los rumiantes, diferencia que sería quizá mayor en los genotipos con estacionalidad reproductiva. Todo lo anterior, significa que se requieren más investigaciones sobre la bioquímica adaptativa en los diferentes tipos celulares para poder comprender los mecanismos de recambio de lípidos y proteínas que se suceden durante los periodos de malnutrición. Asimismo, indica que es necesario comprender cada uno de los factores neuroendocrinos involucrados en la homeostasis de la energía, de tal forma que nos permita acercarnos al entendimiento de la fisiología adaptativa de la subnutrición.

 **Referencias**

1. **Silanikove N.** The physiological basis of adaptation in goats to harsh environments. *Small Rum. Res.* 35, 181-193. 2000.
2. **Ricardi C, and Shimada A.** A note on diet selection by goats on a semiarid temperate rangeland throughout the year. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 3, 239-247. 1992.
3. Centro de Estadística Agropecuaria. Sistema de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA, México D.F. 2002.
4. **Orskov ER, and Ryle M.** Energy Nutrition in Ruminants., Elsevier Applied Science., London, UK. 1990.
5. **Chilliard Y, Ferlay A, Faulconnier Y, Bonnet M, Rouel J, and Bocquier F.** Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* 59, 127-134. 2000.
6. **Gómez-Pasten M, Mora O, Pedraza-Chaverri J, and Shimada A.** The effect of the severity of a long term feed restriction on metabolism and hepatic and muscle tissue composition of goats. *J. Agric. Sci., Cambridge.* 132, 227-232. 1999.
7. **Cherel Y, Burnol AF, Leturque A, and Le Maho Y.** *In vivo* glucose utilization in rat tissues during the three phases of starvation. *Metabolism.* 37, 1033-1039. 1988.
8. **Cherel T, Robin J, and Le Maho Y.** Physiology and biochemistry of long-term fasting in birds. *Can. J. Zool.* 66, 154-166. 1988b.
9. **Goodman MN, Larsen PR, Kaplan MM, Aoki TT, Young VR, and Ruderman NB.** Starvation in the rat. II. Effect of age and obesity on protein sparing and fuel metabolism. *Am. J. Physiol.* 239, E277-E286. 1980.
10. **Goodman MN, and Ruderman NB.** Starvation in the rat. I. Effect of age and obesity on organ weights, RNA, DNA, and protein. *Am. J. Physiol.* 239: E269-E276. 1980.
11. **Le Maho Y, Vu Van Kha H, Koubi H, Dewasmes G, Girard J, Ferré P, and Cagnard M.** Body composition, energy expenditure and plasma metabolites in long term fasting geese. *Am. J. Physiol.* 241: E342-E354. 1981.

12. **Robin JP, Frain M, Sardet C, Groscolas R, and Le Maho Y.** Protein and lipid utilization during long-term fasting in emperor penguins. *Am. J. Physiol.* 254: R61-68. 1988.
13. **Belkhou R, Cherel Y, Heitz A, Robin J, and Le Maho Y.** Energy contribution of proteins and lipids during prolonged fasting in the rat. *Nutr. Res.* 11: 365-374. 1991.
14. **Cant JP, McBride BW, and Croom WJ, Jr.** The regulation of intestinal metabolism and its impact on whole animal energetics. *J. Anim. Sci.* 74. 2541-2553. 1996.
15. **Ferraris RP, and Carey HV.** Intestinal transport during fasting and malnutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 20. 195-219, 2000.
16. **Ferraris RP, Yasharpour S, Lloyd KC, Mirzayan R, and Diamond JM.** Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions. *Am. J. Physiol.* 259, G822-837. 1990.
17. **Butzner JD, Butler DG, Miniats OP, and Hamilton JR.** Impact of chronic protein-calorie malnutrition on small intestinal repair after acute viral enteritis: a study in gnotobiotic piglets. *Pediatr. Res.* 19: 476-481. 1985.
18. **Waheed AA, and Gupta PD.** Changes in structural and functional properties of rat intestinal brush border membrane during starvation. *Life Sci.* 61: 2425-2433. 1997.
19. **Misch DW, Giebel PE, and Faust RG.** Intestinal microvilli: responses to feeding and fasting. *Eur. J. Cell Biol.* 21: 269-279. 1980.
20. **Trahair JF, DeBarro TM, Robinson JS, and Owens JA.** Restriction of nutrition in utero selectively inhibits gastrointestinal growth in fetal sheep. *J. Nutr.* 127: 637-641. 1997.
21. **Boza JJ, Moennoz D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Fritsche R, Donnet A, Schiffrin EJ, Perruisseau G, and Balleve O.** Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. *J. Nutr.* 129. 1340-1346. 1999.
22. **Bayer RC, Rittenburg JH, Bird FH, Chawan CB, and Allen M.** Influence of short term fasting on chicken alimentary canal mucosa. *Poult. Sci.* 60, 1293-1302. 1981.
23. **Goodlad RA, Plumb JA, and Wright NA.** Epithelial cell proliferation and intestinal absorptive function during starvation and refeeding in the rat. *Clin. Sci. (Lond).* 74, 301-306. 1988.

24. **Holt PR, Wu S, and Yeh KY.** Ileal hyperplastic response to starvation in the rat. *Am. J. Physiol.* 251, G124-131. 1986.
25. **Ferraris RP.** Effect of aging and caloric restriction on intestinal sugar and amino acid transport. *Front. Biosci.* 2, e108-115. 1997.
26. **Ferraris RP, Cao QX, and Prabhakaram S.** Chronic but not acute energy restriction increases intestinal nutrient transport in mice. *J. Nutr.* 131, 779-786. 2001.
27. **Carey HV, Hayden UL, and Tucker KE.** Fasting alters basal and stimulated ion transport in piglet jejunum. *Am. J. Physiol.* 267, R156-163. 1994.
28. **Uhnoo IS, Freihorst J, Riepenhoff-Talty M, Fisher JE, and Ogra PL.** Effect of rotavirus infection and malnutrition on uptake of a dietary antigen in the intestine. *Pediatr. Res.* 27, 153-160. 1990.
29. **Darmon N, Pelissier MA, Heyman M, Albrecht R, and Desjeux JF.** Oxidative stress may contribute to the intestinal dysfunction of weanling rats fed a low protein diet. *J. Nutr.* 123, 1068-1075. 1993.
30. **Butzner JD, Brockway PD, and Meddings JB.** Effects of malnutrition on microvillus membrane glucose transport and physical properties. *Am. J. Physiol.* 259, G940-946. 1990.
31. **Brot-Laroche E, Dao MT, Alcalde AI, Delhomme B, Triadou N, and Alvarado F.** Independent modulation by food supply of two distinct sodium-activated D-glucose transport systems in the guinea pig jejunal brush-border membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 85, 6370-6373. 1988.
32. **Rayo JM, Esteban S, and Tur JA.** Effect of starvation on the *in vivo* intestinal absorption of sugars and amino acids in young chickens (*Gallus domesticus*). *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* 100, 155-158. 1992.
33. **Sell S, and Ilic Z.** Liver Stem Cells. Springer, Georgetown, Tx. USA. 1997.
34. **Griffin J, and Ojeda S.** Textbook of Endocrine Physiology., Oxford Press University Inc., New York, USA. 1992.
35. **Burrin DG, Britton RA, and Ferrell CL.** Visceral organ size and hepatocyte metabolic activity in fed and fasted rats. *J. Nutr.* 118, 1547-1552. 1988.
36. **Andriamampandry MD, Bnouham M, Michard D, Gutbier G, Le Maho Y, and Leray C.** Food deprivation modifies fatty acid partitioning and beta-oxidation capacity in rat liver. *J. Nutr.* 126, 2020-2027. 1996.

37. **Velez J and Donkin S.** Feed restriction induces pyruvate carboxylase but not phosphoenolpyruvate carboxykinase in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88: 2938-2948. 2005.
38. **Rhoads RP, Greenwood PL, Bell AW, and Boisclair YR.** Nutritional regulation of the genes encoding the acid-labile subunit and other components of the circulating insulin-like growth factor system in the sheep. *J. Anim. Sci.* 78, 2681-2689. 2000.
39. **Samra JS.** Sir David Cuthbertson Medal Lecture. Regulation of lipid metabolism in adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc.* 59, 441-446. 2000.
40. **Rinberg T, White R, Holleman D, and Luick J.** Body growth and carcass composition of lean reindeer (*Rangifer tarandus tarandus* L.) from birth to sexual maturity. *Can. J. Zool.* 59, 1040-1044. 1981.
41. **Vayrynen P, Nieminen M, and Hyvarinen H.** In Second International Reindeer/Caribou Symposium (Reimers, E., Gaare, E., and Skjenneberg, S., Eds.), Roros, Norway. 1980.
42. **Soppela P, Heiskari U, Nieminen M, Salminen I, Sankari S, and Kindahl H.** The effects of a prolonged undernutrition on serum lipids and fatty acid composition of reindeer calves during winter and spring. *Acta Physiol. Scand.* 168, 337-350. 2000.
43. **Leichsenring M, Sutterlin N, Less S, Baumann K, Anninos A, and Becker K.** Polyunsaturated fatty acids in erythrocyte and plasma lipids of children with severe protein-energy malnutrition. *Acta Paediatr.* 84, 516-520. 1995.
44. **Noble RC.** Digestion, absorption and transport of lipids in ruminant animals. *Prog. Lipid Res.* 17, 55-91. 1978.
45. **Pannaretto B.** Body composition *in vivo*. VI. The composition of ewes during a prolonged undernutrition. *Austr. J. Agric. Res.* 15, 771-787. 1964.
46. **Chilliard Y.** Bibliographic review: quantitative variations and metabolism of lipids in adipose tissue and liver during the gestation-lactation cycle. 2: In the ewe and the cow. *Reprod. Nutr. Dev.* 27, 327-398. 1987.
47. **Chilliard Y, Bocquier F, and Doreau M.** Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod. Nutr. Dev.* 38, 131-152. 1998.
48. **Bonnet M, Faulconnier Y, Flechet J, Hocquette JF, Leroux C, Langin D, Martin P, and Chilliard Y.** Messenger RNAs encoding lipoprotein lipase,

- fatty acid synthase and hormone-sensitive lipase in the adipose tissue of underfed-refed ewes and cows. *Reprod Nutr. Dev.* 38, 297-307. 1998.
49. **Ahima R, and Flier J.** Leptin. *Annu. Rev. Physiol. Annu. Rev. Physiol.* 62, 413-437. 2000.
 50. **Carey C.** Energetics of Reproduction en *Encyclopedia of Reproduction* Vol. 1, E. Knobil & J. D. Neill Editores. Academic Press, San Diego, CAL, EEUUAA. 1999.
 51. **Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA.** Leptin's Actions on the Reproductive Axis: Perspectives and Mechanisms. *Biol. Reprod.* 60:216. 1999.
 52. **Schneider JE, Zhou D, Blum RM.** Leptin and metabolic control of reproduction. *Horm. Behav.* 37:306. 2000.
 53. **Dunn TG, Moss GE.** Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. *J. Anim. Sci.* 70:1580. 1992.
 54. **Robinson JJ.** Nutrition and reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 42:25. 1996.
 55. **Foster DL, Nagatani S.** Physiological Perspectives on Leptin as a Regulator of Reproduction: Role in Timing Puberty. *Biol. Reprod.* 60:205. 1999.
 56. **Wettemann RP, Bossis I.** Energy Intake Regulates Ovarian Function in Beef Cattle. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.* 1. 2000.
 57. **Rhind SM, Martin GB, McMillen S, Tsonis CG, McNeille AS.** Effect of level of food intake of ewes on the secretion of LH and FSH and on the pituitary response to gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes. *J. Endocrinol.* 121:325. 1989.
 58. **Amstalden M, Garcia MR, Stanko RL, Nizielski SE, Morrison CD, Keisler DH, Williams GL.** Central infusion of recombinant ovine leptin normalize plasma insulin and stimulates a novel hypersecretion of luteinizing hormone after short-term fasting in mature beef cows. *Biol. Reprod.* 66:1555. 2002.
 59. **Cameron JL.** Regulation of reproductive hormone secretion in primates by short-term changes in nutrition. *Rev. Reprod.* 1:117. 1996.
 60. **Tanaka T, Akaboshi N, Inoue Y, Kamomae H, Kaneda Y.** Fasting-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion is related to body energy status in ovariectomized goats. *Anim. Reprod. Sci.* 72:185. 2002.

61. **Amstalden M, Garcia MR, Williams SW, Stanko RL, Nizielski SE, Morrison CD, Keisler DH, Williams GL.** Leptin gene expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: relationship to circulating insulin and insulin-like growth factor I. *Biol. Reprod.* 63:127. 2000.
62. **Keisler DH, Daniel JA, Morrison CD.** The role of leptin in nutritional status and reproductive function. *J. Reprod. Fert. Supp* 54:425. 1999.
63. **Harvey JG, Kaplan JM.** The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Front. Neuroendocrinol.* 23:2. 2002.
64. **Williams GL, Amstalden M, García MR, Stanko RL, Nizielski SE, Morrison CD, Keisler DH.** Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23:339. 2002.
65. **Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME.** Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 275:88. 1997.
66. **Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JL, Weigle DS, Clifton DK, Steiner RA.** Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 138:855. 1997.
67. **Nagatani S, Guthikonda P, Thompson RC, Tsukamura H, Maeda KI, Foster DL.** Evidence for GnRH regulation by leptin: leptin administration prevents reduced pulsatile LH secretion during fasting. *Neuroendocrinology* 67:370. 1998.
68. **Finn PD, Cunningham MJ, Pau KY, Spies HG, Clifton DK, Steiner RA.** The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. *Endocrinology* 139:4652. 1998.
69. **Nagatani S, Zeng Y, Keisler DH, Foster DL, Jaffe CA.** Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. *Endocrinology* 141:3965. 2000.
70. **Gamba M, Pralong FP.** Control of GnRH neuronal activity by metabolic factors: The role of Leptin and Insulin. *Molecular & Cellular Endocrinology* 254-255:133. 2006.
71. **Schneider JE, Zhou D.** Interactive effects of central leptin and peripheral fuel oxidation on estrous cyclicity. *Am. J. Physiol.* 277:R1020. 1999.
72. **Delavaud D, Bocquier F, Chilliard Y, Keisler DH, Gertler A, Kann G.** Plasma leptin in ruminants: effect of nutritional status and body fatness

- on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *J. Endocrinol.* 165:519. 2000.
73. **Bocquier F, Bonnet M, Faulconnier, Guerre-Millo M, Martin P, Chilliard Y.** Effects of photoperiod and feeding level on perirenal adipose tissue metabolic activity and leptin synthesis in the ovariectomized ewe. *Rep. Nut. Dev.* 38:489. 1998.
 74. **Clarke IJ, Horton RJ, Doughton BW.** Investigation of the mechanism by which insulin-induced hypoglycemia decreases luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 127:1470. 1990.
 75. **Bucholtz DC, Vidwans NM, Herbosa C, Schillo K, Foster DL.** Metabolic interfaces between growth and reproduction. V. Pulsatile luteinizing hormone secretion is dependent on glucose availability. *Endocrinology* 137:601. 1996.
 76. **Murahashi K, Bucholtz DC, Nagatani S, Tsukahara S, Tsukamura H, Foster DL.** Suppression of luteinizing hormone pulses by restriction of glucose availability is mediated by sensors in the brain stem. *Endocrinology* 137:1171. 1996.
 77. **Nagatani S, Bucholtz DC, Murahashi K, Estacio M, Tsukamura H, Foster DL, Maeda K.** Reduction of glucose availability suppresses pulsatile luteinizing hormone release in female and male rats. *Endocrinology* 137:1166. 1996.
 78. **Ritter S, Dinh TT, Zhang Y.** Localization of hindbrain glucoreceptive sites controlling food intake and blood glucose. *Brain Res.* 856:37. 2000.
 79. **Adachi A, Kobashi M, Miyoshi N, Tsukamoto G.** Chemosensitive neurons in the area postrema of the rat and their possible functions. *Brain Res. Bull.* 26:137. 1991.
 80. **Edmonds BK, Edwards GL.** Dorsomedial hindbrain participation in glucoprivic feeding responses to 2DG but not 2DG-induced hyperglycemia or activation of the HPA axis. *Brain Res.* 801:21. 1998.
 81. **Cates PS, O'Byrne KT.** The area postrema mediates insulin hypoglycemia-induced suppression of pulsatile secretion in the female rat. *Brain Res.* 853:151. 2000.
 82. **Lin J, Barb CR, Matteri RL, Kraeling RR, Chen X, Meinersmann RJ, Rampacek GB.** Long form of leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary, and other tissues in the pig. *Domest. Anim. Endocrinol.* 19:53. 2000.

83. **Schwartz GJ, Moran TH.** Leptin and Neuropeptide Y have opposing modulatory effects on Nucleus of the Solitary Tract neurophysiological responses to gastric loads: Implications for the control of food intake. *Endocrinology* 143:3779. 2002.
84. **Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte Jr D.** Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat. Med.* 2:589. 1996.
85. **Burcelin R, Thorens B, Glauser M, Gaillard RC, Pralong FP.** Gonadotropin-releasing hormone secretion from hypothalamic neurons: stimulation by insulin and potentiation by leptin. *Endocrinology* 144:4484. 2003.
86. **Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M.** Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Molecular & Cellular Endocrinology* 254-255:127. 2006.

Cultivo *in vitro* de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* y su aplicación para la producción de vacuna



Jesús Antonio Álvarez Martínez
Julio Vicente Figueroa Millán

I. Introducción	136
II. Distribución geográfica.....	136
III. Ciclo biológico de <i>Babesia</i> en la garrapata	137
IV. Desarrollo en el bovino.....	137
V. Antecedentes del cultivo <i>in vitro</i>	138
VI. Control de la babesiosis bovina a partir de inmunógenos	140
VII. Importancia y aplicaciones del cultivo <i>in vitro</i>	141
VIII. Vacunas vivas atenuadas derivadas del cultivo <i>in vitro</i> en México ...	142
IX. Perspectivas.....	145
Referencias	146

I. Introducción

La babesiosis bovina, conocida también como fiebre de Texas, fiebre de la garrapata o aguas rojas, es causada por protozoarios intraeritrocíticos del género *Babesia* que son transmitidos por garrapatas. Son capaces de producir un cuadro clínico caracterizado por fiebre, anemia hemolítica, hemoglobinuria y muerte; también provocan aborto en hembras gestantes después del primer tercio (1, 2). Los signos clínicos varían según la patogenicidad y virulencia de la especie y la cepa de *Babesia*. Hay factores que determinan la infección, como edad, raza y estado inmune del animal. Los animales afectados, al recuperarse de lo agudo de la enfermedad, generalmente se mantienen como portadores asintomáticos durante años, pudiendo ser vectores de infección hacia los animales sanos y difícilmente alcanzan los niveles de producción perdidos (3).

II. Distribución geográfica

Existen más de 70 especies de protozoarios del género *Babesia*, de éstas sólo 18 causan enfermedad en diferentes mamíferos domésticos (4). Cuatro especies destacan por su importancia económica al afectar al ganado bovino; *Babesia vobis* (5), *Babesia bigemina* (6), *Babesia divergens* y *Babesia major* (7-9). Las más importantes, desde el punto de vista económico, son *B. bigemina* y *B. bovis*, ambas ampliamente distribuidas en áreas donde existen sus vectores artrópodos, que son las garrapatas *Boophilus microplus*, *Boophilus decoloratus* y *Boophilus annulatus*. Lo anterior ocurre en países localizados entre 30° S y 40° N del ecuador (10). La babesiosis bovina es un serio problema para la ganadería, en especial en países periféricos pues limitan la introducción de ganado tipo especializado en la producción de carne y leche a las regiones tropicales. En México la babesiosis bovina, descrita desde el siglo XIX (11); continúa siendo una limitante para la producción ganadera, su distribución se describe en las principales regiones ganaderas tropicales en diferentes estados. La magnitud se refleja con altas tasas de morbilidad y mortalidad en el ganado (12).

III. Ciclo biológico de *Babesia* en la garrapata

El ciclo biológico de *Babesia* se describe desde el momento en que las garrapatas hembras pasan al portador ingiriendo sangre infectada con *Babesia*. Los eritrocitos infectados se rompen y liberan a los parásitos que se desarrollan en casi 36 h. Adquieren morfología alargada con dimensiones de 7.2-13.8 μm por 2.6-5.6 μm para el caso de *Babesia bovis*; las cuales invaden a las células epiteliales del intestino de la garrapata y se reproducen por fisión múltiple en 96 h. Se producen los quinetos o "vermiculos" en el lumen intestinal (13), que migran por la hemolinfa y penetran los óvulos en el ovario de la garrapata antes de ser cubiertos por quitina (14). Luego se multiplican de nuevo por fisión múltiple en células intestinales del embrión y hay liberación de una segunda generación de quinetos (15). Éstos por medio de la hemolinfa llegan a las células de las glándulas salivales, y ocurre otra fase de fisión múltiple, se liberan miles de cuerpos anulares que se transforman en peras o piroplasmas (16). Estas son las formas infectantes de *Babesia* que inoculan las larvas en el caso de *B. bovis* (17), o las ninfas y adultos cuando se trata de *B. bigemina* (15, 18, 19).

IV. Desarrollo en el bovino

Las formas infecciosas de *Babesia* se hallan en las glándulas salivales de las larvas de las garrapatas, al alimentarse se liberan al torrente sanguíneo e infectan a los eritrocitos del bovino (15). El periodo de incubación varía según la especie de *Babesia* y de la vía de inoculación (18, 20). En condiciones naturales el periodo prepatente puede ser de 7-35 días. Se ha comprobado que no existe ciclo exoeritrocítico de *Babesia bigemina* en portadores vertebrados (21).

La penetración de los merozoitos a los eritrocitos se resume en cinco pasos: a) Contacto entre el merozoito y el eritrocito; b) orientación del polo apical del merozoito a la superficie del eritrocito; c) fusión de membranas entre el merozoito y el eritrocito; d) descarga del contenido de las roptrias; e) Invaginación de membrana del eritrocito.

Posteriormente se forma una "vacuola parasitófora", que se diferencia para formar los trofozoitos, en contacto directo con el citoplasma de la célula portadora. Los merozoitos producidos en los eritrocitos abandonan

la célula e inmediatamente invaden más eritrocitos. Esta división asexual continúa de manera indefinida hasta que muere el portador, se elimina al parásito o éste es ingerido por otra garrapata en la última fase de la replicación (22).

V. Antecedentes del cultivo *in vitro*

La necesidad de producción de material biológico para estudios bioquímicos, inmunológicos o quimioterapéuticos de la babesiosis bovina, es de interés en la investigación sobre procedimientos para establecer el cultivo *in vitro* de *Babesia* spp (23, 24). Su instrumentación impactaría mucho pues la biología de *Babesia* spp mantiene la interrelación de un vector invertebrado (garrapata, e.g. *Boophilus microplus*) y un portador vertebrado (bovino). Esta condición resultaría poco práctica para mantener en condiciones controladas a animales subinoculados periódicamente con la finalidad de disponer de parásitos en forma continua (25).

Los estudios sobre cultivo *in vitro* de *Plasmodium* fueron los antecedentes primordiales para el cultivo *in vitro* para *Babesia* spp. Se demostró el crecimiento continuo exitoso de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum* utilizando sangre desfibrinada de humano. En esos estudios se consideraban como factores determinantes la temperatura para incubación, adición de glucosa al medio de cultivo y anaerobiosis. Adicionalmente se observó que el crecimiento ocurría sólo dentro de los eritrocitos, y que la presencia de leucocitos causaba fagocitosis de los parásitos (26).

Posteriormente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) exhibía la necesidad del desarrollo de una vacuna contra el paludismo (27). Para entonces existía el antecedente de infectar con *Plasmodium falciparum* a monos *Aotus trivirgatus* (28). Sin embargo, el cultivo parecía ser la alternativa más apropiada para la producción de material inmunogénico. De esta manera, estudios previos sobre el parásito aviar *Plasmodium lophurae*, que mostraba la necesidad de suplementar el medio de cultivo con ATP y coenzima-A para su crecimiento, fueron retomados y se desarrollaron con éxito procedimientos de cultivo *in vitro* de *Plasmodium*. Se logró el crecimiento continuo de los estadios eritrocíticos de *P. falciparum* de manera simple y flexible. En este tipo de estudios se incluyeron parámetros específicos como atmósfera provista por la combustión de una vela dentro de un de-

secador -velobiosis- con contenido de 5% de oxígeno (O₂) y niveles de 7% de dióxido de carbono (CO₂) (27).

Una de las características fundamentales del desarrollo de esta metodología fue el reconocimiento de que existe una fase eritrocítica en el ciclo biológico de las babesias (29, 30).

Para los ensayos de cultivo de parásitos de *Babesia*, las células blanco de *Babesia* spp son los eritrocitos maduros, que proporcionan los requerimientos metabólicos adecuados para el crecimiento y reproducción de una de las fases de su ciclo biológico (31).

Otros estudios que usaron las técnicas sobre el cultivo de *Plasmodium*, permitieron establecer cultivos en periodos cortos, a partir de hámster infectados. Se demostró que los eritrocitos de un portador de la misma especie son factor determinante, debido a que se logró la proliferación de *Babesia microti* suplementando el medio con suero fetal bovino, suero de rata o suero de hámster (32).

De manera análoga, este tipo de estudios favoreció el inicio de los ensayos con *B. bovis* bajo condiciones similares de laboratorio. Se estableció en México el crecimiento continuo del parásito por primera vez en el ámbito mundial. Los eritrocitos de bovino se mantenían suspendidos en medio de cultivo 199 adicionado con HEPES (N-2 hidroximetilpiperazina N1-2 ácido etanosulfónico) como amortiguador y suplementado con 50% de suero de bovino. El pH se ajustaba a 7.0 manteniendo una atmósfera del 5% de CO₂ en aire; la suspensión completa se mantenía en agitación a 100 rpm e incubación de 37°C (33). También para otras especies, como *Babesia divergens*, se logró mantenimiento durante tres días en medio suplementado con 10% de suero fetal de bovino, adicionando antibióticos, como sal tampón HEPES, utilizando células humanas e incubando a 37° (34).

Posteriormente, al incorporar algunas modificaciones el crecimiento continuo fue mantenido durante 32 días, con porcentajes de eritrocitos parasitados que alcanzaban 15%, demostrando que su virulencia en bovinos se mantenía sin efectos (35). Los mismos autores, estudiando nuevas variables, no encontraron diferencia al usar como medios RPMI 1640, 199 ni NCTC-135, pero demostraron que el pH menor a 6.7 o mayor a 7.3 afectan adversamente el crecimiento de los parásitos (36).

El éxito del crecimiento *in vitro* de *B. bovis*, permitió un mejoramiento en la metodología y se desarrolló el proceso denominado crecimiento en fase estacionaria microaerofílica, evitando el cultivo en suspensión. En éste, los niveles de fluidos del medio de cultivo se mantenían en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire. La profundidad del fluido en el recipiente de cultivo fue identificada como factor determinante. Bajo estas condiciones incrementó la invasión de parásitos a eritrocitos normales hasta a niveles acumulativos de 1.7 x 10 (37) en un periodo de 83 días (38). Asimismo, se intentó el desarrollo de cultivos *in vitro* de *B. bigemina* y *B. rodhaini*, con resultados positivos pero por periodos cortos (39).

Con algunas modificaciones para el cultivo de *B. bovis* previamente descrito se sustituyó al HEPES por TES (N-Tris hidroximetil metil 2-ácido aminoetanosulfónico) como sal tampón (38). En este estudio también se logró la adaptación y conservación de diferentes cepas, y se comprobó que *B. bovis* podía ser recuperado para el cultivo *in vitro* mediante un procedimiento de criopreservación (40). Más adelante se desarrolló la clonación a partir de bovinos portadores y se establecieron tres líneas de *B. bovis* a partir del cultivo *in vitro* (41).

Con el cúmulo de experiencias generadas para *B. bovis*, se logró establecer el cultivo de *B. bigemina* en forma continua, alcanzando parasitemias del 3%-6% (42). Al igual que con *B. bovis*, se desarrollaron metodologías complementarias al cultivo *in vitro* para criopreservación (43) y clonación de *B. bigemina* (44). De tal manera que con los procedimientos ampliamente descritos, se establece en México de manera rutinaria el cultivo de *B. bigemina* (24) y de *B. bovis* (45).

VI. Control de la babesiosis bovina a partir de inmunógenos

Con el propósito de prevenir o controlar a la babesiosis bovina el objetivo primordial ha sido desarrollar inmunógenos. Para ello se ha destacado el uso de vacunas vivas o recombinantes. Los procedimientos hasta ahora utilizados y recomendados son: control del vector mediante el uso de ixodidas; movilización controlada de ganado para evitar que ganado portador asintomático e infestado con garrapatas sea llevado a zonas libres; qui-

mioterapia y quimioprofilaxis, ambos pueden ser tácticamente incluidos en un programa integral, aunque resultan costosos y poco prácticos por sí mismos; el uso de ganado resistente ha sido común en algunos países con resultados no muy satisfactorios (46). La inmunización es el procedimiento señalado desde hace muchos años como la manera más adecuada para prevenir y controlar a la babesiosis bovina (47).

Para el control de la enfermedad se usó sangre infectante de un portador asintomático, para la subinoculación de animales susceptibles, ello se denomina premunición. Este procedimiento se ha aplicado empíricamente, y puede conllevar a la diseminación de otro tipo de enfermedades –tuberculosis, brucelosis, IBR, etc.-. Los animales premunizados pueden enfermar clínicamente de babesiosis e incluso morir si no son tratados oportunamente. La inmunoprofilaxis técnicamente respaldada se ha intentado desde hace muchos años. En Australia se inició con el uso de organismos vivos de reducida virulencia, que consisten en suspensiones de eritrocitos con *B. bovis* o *B. bigemina* previamente atenuadas por pasajes múltiples en terneros esplenectomizados o intactos, de los que se obtiene sangre con altas parasitemias, para su aplicación como vacuna (48-51). Algunas limitaciones de este tipo de material biológico con el mantenimiento eficiente de la cadena fría y el riesgo potencial de contaminación con otros agentes patógenos.

VII. Importancia y aplicaciones del cultivo *in vitro*

La instrumentación del cultivo *in vitro* ha permitido conocer más sobre el comportamiento metabólico y reproductivo de *Babesia* spp. Entre las diversas aplicaciones del cultivo se pueden mencionar la obtención de cepas atenuadas para vacunación o premunición, la selección de líneas puras de diferentes grados de virulencia (52), la clonación (53), estudios sobre la ultraestructura (54), la producción de antígeno para diagnóstico (55, 56), evaluaciones de sensibilidad a fármacos, y diferentes aspectos de la biología del parásito (57). Es importante mencionar que para el caso de *B. Boris*, las infecciones normalmente alcanzan 2% de eritrocitos parasitados en bovinos, en contraste *in vitro* pueden ser muy superiores (10%) pero con procedimientos de concentración en gradientes de Percoll pueden alcanzar al menos 49% (58) e inclusive superiores con *B. bigemina* (44).

Aunque hay diferentes tipos de vacunas que se han ensayado contra la babesiosis bovina, hasta ahora el único procedimiento que ha ofrecido resultados favorables en términos de protección e inocuidad, ha sido el uso de vacunas vivas atenuadas (47-49). En otros países, como Argentina, Brasil, Uruguay e Israel, se ha producido y utilizado también este tipo de vacunas (59).

La alternativa de vacuna viva diferente al material biológico derivado de becerros esplenectomizados ha sido el cultivo *in vitro* de *Babesia bovis* y de *Babesia bigemina*. El desarrollo del cultivo *in vitro* de cepas de *Babesia* spp en un medio definido, han sido la base para el inicio de una fuente de parásitos y exoantígenos para una diversidad de estudios sobre la bioquímica e inmunología de la babesiosis.

De lo antes mencionado, destaca el uso de inmunógenos vivos a partir de cepas atenuadas derivadas del cultivo *in vitro*, lo cual ha sido propuesto como alternativa en el control de la babesiosis bovina. En diversos estudios, este tipo de inmunógenos aplicados a bovinos susceptibles ha demostrado la inducción de protección al desafío heterólogo experimental en condiciones semejantes. También han sido evaluados en bovinos mantenidos en condiciones naturales, exponiendo a los animales a confrontaciones en explotaciones infestadas con el vector la garrapata *Boophilus microplus* (55, 60).

VIII. Vacunas vivas atenuadas derivadas del cultivo *in vitro* en México

Actualmente en México no existe vacuna comercial para prevenir o controlar esta enfermedad. Sin embargo, se han estimado tasas de seroprevalencia en diferentes regiones ganaderas del país de hasta 96% mediante serología. Lo anterior destaca la necesidad para desarrollar métodos de control de la babesiosis, particularmente en ganado que se moviliza de zonas libre de vector a zonas de alta endemicidad (12).

En años recientes se han publicado estudios basados en el uso de dos cepas de *Babesia* mantenidas en cultivo *in vitro* como agentes inmunogénicos. Una de *B. bovis* denominada BOR derivada de la cepa KBb (40), que fue clonada por dilución crítica (41) e irradiada en una fuente

de cobalto-60 (Co^{60}) a 187 Grays (Gy) (53). Del procedimiento de la radiación se ha sugerido que los parásitos quedan muy debilitados como para ejercer su acción patogénica en el portador, y pueden estimular una respuesta inmune bastante fuerte como para proteger al portador contra futuras infecciones. Posterior a la irradiación esta clona se ha multiplicado mediante el cultivo *in vitro*; las funciones metabólicas aparentemente no provocaron cambios letales y sólo se indujo una atenuación de su virulencia y le ha permitido expresar antígenos que inducen una respuesta inmune satisfactoria.

Asimismo, la cepa de *B. bigemina*, denominada BIS, se deriva de la cepa Seed, colectada de un caso clínico de campo en México. Esta última se adaptó al cultivo *in vitro* y se ha mantenido alternadamente en congelación y propagada continuamente, así se ha inducido su atenuación (43). Por lo anterior, la instrumentación del cultivo *in vitro* ha permitido el uso de inmunógenos vivos a partir de cepas atenuadas derivadas del cultivo *in vitro* de los que se ha evaluado patogenicidad e inmunogenicidad de diferentes clonas de *Babesia* spp. En los primeros estudios se trató de probar la reducida virulencia de las clonas de parásitos cultivados y criopreservados al ser inoculados en animales susceptibles (61).

Otro de los estudios iniciales se desarrolló para determinar la dosis del inmunógeno experimental con la clona irradiada de *Babesia bovis*, en el que se inocularon diferentes grupos de bovinos a dosis crecientes de 1×10^5 a 1×10^9 eritrocitos infectados (Ei). Los parámetros que se evaluaron fueron volumen celular aglomerado (VCA) por el método de microhematocrito, porcentaje de parasitemia y signos clínicos característicos de babesiosis (fiebre, hemoglobinuria, ictericia) o mortalidad cuando ocurrió. Un grupo de bovinos inoculados con eritrocitos normales sin infectar (EN) se mantuvo como grupo testigo. De manera similar, previamente se determinó la dosis de confrontación.

También aplicando dosis crecientes de 1×10^5 a 1×10^9 eritrocitos infectados con una cepa de alta virulencia obtenida de un caso clínico, criopreservada en nitrógeno líquido y reactivada en un bovino esplenectomizado. Se determinó que la dosis más adecuada para la confrontación fuera de 1×10^8 eritrocitos infectados; el procedimiento de selección fue similar para *B. bovis* (62) y para *B. bigemina* (37). De las diferentes dosis de inmunización, ningún animal mostró la enfermedad clínica a la confrontación,

a diferencia de los animales del grupo testigo en los que se presentaron severos descensos en el VCA, fiebre superior a 40°C, presencia de parásitos a la observación de frotis, que además fueron tratados para evitar su muerte. Se infiere que la dosis vacunal podría ser de 1×10^7 eritrocitos infectados con la cepa atenuada para ambas especies (37, 62, 63).

Posteriormente se evaluó la posibilidad de inducir inmunidad cruzada entre las dos cepas atenuadas de *Babesia* derivadas del cultivo *in vitro*. En este estudio se utilizaron bovinos inoculados con el inmunógeno monovalente de *Babesia bigemina* o de *Babesia bovis* y un grupo con inmunógeno combinado de ambas especies, las dosis utilizadas fueron de 1×10^7 eritrocitos infectados con cada cepa. Un grupo testigo recibió dosis similar con EN. A la confrontación, la protección fue de 25%, 50% y 100% en el mismo orden; en contraste, en el grupo no vacunado todos los bovinos fueron severamente afectados, uno murió y los restantes recibieron tratamiento para evitar su muerte. Se concluye que la protección cruzada es insuficiente; por tanto, para inducir inmunidad sólida es necesaria la aplicación del inmunógeno combinado (64).

En estudios del inmunógeno fresco bivalentes de *B. bovis* y *B. bigemina*, y aplicando un desafío controlado, se demostró la inocuidad de la vacuna debido a la presentación moderada de alteraciones fisiológicas entre los días 7 a 21 posvacunación (PV). Se detectó presencia de parásitos con valores menores a 0.01% a la observación de frotis teñidos con Giemsa. Al evaluar la inmunogenicidad mediante el desafío a tres meses PV con una cepa virulenta de cada especie, se observó ligera disminución en el VCA, sin cambios en temperatura rectal y con parasitemias de 0.01% a 0.06% para *B. bovis* y *B. bigemina*, respectivamente. A diferencia del grupo no vacunado, en el que hubo fiebre en todos los animales, disminución en el VCA de 29% y parasitemias de 0.5 para *B. bigemina* y 0.03 para *B. bovis*, con necesidad de tratamiento específico. Se demostró de nuevo la protección adecuada inducida por la vacuna viva atenuada, combinada derivada del cultivo *in vitro* (62).

La mayoría de los países periféricos se localizan en áreas tropicales y subtropicales, donde existe elevado potencial para la producción pecuaria; infortunadamente ofrecen también condiciones ambientales propicias para el desarrollo de parásitos que provocan pérdidas económicas considerables. Entre las enfermedades parasitarias, la babesiosis bovina es uno

de los obstáculos de la producción, destaca por su impacto económico en la actividad ganadera. Es importante mencionar que de la población de bovinos en México, estimada en cerca de 30 millones de cabezas, casi 75% se encuentra en áreas infestadas por garrapatas *B. microplus*; por tanto, existe la posibilidad de infección por *Babesia* spp.

Se ha notificado hasta 89% de tasa de prevalencia de *Babesia* spp por lo que se considera como un serio obstáculo para la introducción al trópico de bovinos de razas mejoradas genéticamente, altamente productoras de carne y leche (1). En este sentido, es indispensable establecer métodos como la vacunación para el control de la enfermedad.

IX. Perspectivas

El cultivo *in vitro* de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* en México mantiene un amplio número de aplicaciones, como fuente de material biológico para estudios inmunológicos, para la producción de antígenos para técnicas diagnósticas; aún más, como metodología indispensable para el desarrollo de vacunas recombinantes. Aunque actualmente una de sus principales utilidades sea la producción de vacuna viva atenuada. Este tipo de vacunas no obstante haber demostrado sus bondades en términos de inocuidad y protección, particularmente en ganado bovino susceptible introducido a regiones hiperendémicas de babesiosis. Se tienen ahora un reto mayor, el escalamiento para su producción y distribución masiva, debido a los requerimientos específicos de este tipo de vacunas.

Referencias

1. **McCosker P G.** The global importance of babesiosis. In: Ristic M Kreier JP editors. Babesiosis. New York: Academic Press, 1981: 1-24.
2. **Purnell RE.** "Babesiosis in varios hosts" In: Ristic, M and Kreir, J. P, editors Babesiosis: Academic Press, New York USA 1981: 25-32.
3. **Mahoney DF, Ross DR.** Epizootiological factors in the control of bovine babesiosis. Aust Vet J 1972; 48: 292-298.
4. **Ristic M.** Protozoal diseases. Santa Barbara, California: American Veterinary Publications Inc., 1980.
5. **Babes V.** Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. C R Hebd Seances Acad Sci , 1888; 107: 692-694.
6. **Smith T, Kilborne FL.** Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever, U.S.D.A., Bureau of Anim Ind Bull No. 1893; 11-372.
7. **Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich III AR, Lom J, Lynn Merinfeld EG, Page FC, Polanski G, Sprage V, Vavra J, Wallace FG.** A newly revised classification of the protozoa. J Protozool 1980; 27:37-58.
8. **M`Fadyean J, Stockman S.** A new species of piroplasm found in the blood of Bristish cattle. J Compl Parth 1911; 24: 340-354.
9. **Sergent E, Donatien A, Parrot L, Lestoquard F, Plantureux E.** Les piroplasmoses bovines dues aux *Babesella*. Etude d'ensemble, avec. Description d'une espece nouvelle *B. major* originaire de France. Arch Inst Past Alergerie 1926 ; 4: 318-339.
10. **Núñez JL, Muñoz CM, Moltedo HL.** *Boophilus microplus* la garrapata común del Ganado vacuno. Buenos Aires, Argentina: Ed. Hemisferio Sur, 1982.
11. **Tussaint M.** *Piroplasmosis bigeminum* en México. Boletín del Instituto patológico, Descrito por el M.V.Z. Eutimio López Vallejo en 1910. Algunas enfermedades microbianas y parasitarias. México DF: Estación Agrícola Central, Boletín No. 4, 1905.

12. **Álvarez JA, Cantó AG.** Epidemiología de la babesiosis. En: Parasitología. México DF: Vol. Conmemorativo de la Sociedad Mexicana de Parasitología SC, 1985:55-72.
13. **Friedhoff KT, Smith R D.** Transmission of *Babesia* by ticks. In: Ristic M, Kreier JP editors. Babesiosis. New York: Academic Press, 1981: 267-321.
14. **Smith RD.** Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis. II Inter-American meeting of directors of animal health; 1980 Sept. 8-12; San José (Costa Rica). Inter – American Institute of Agricultural Sciences OMS, 1980.
15. **Riek RF.** The life cycle of *Babesia bigemina* (Smith and Kilborne, 1893) in: the tick vector *Boophilus microplus* (Canestrini). Aust J Agric Res 1964; 15: 802–821.
16. **Smith RD, Osorno BM, Brener J, De La Rosa R, Ristic M.** Bovine babesiosis: Severity and reproducibility of *Babesia bovis* infections induced by *Boophilus microplus* under laboratory conditions. Res Vet Sci 1978; 24: 287-292.
17. **Friedhoff KT, Smith R D.** Transmission of *Babesia* by ticks. In: Ristic M, Kreier JP editors. Babesiosis. New York: Academic Press, 1981: 267-321.
18. **Callow LL, Hoyte HMD.** Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* sp., and the tick *Boophilus microplus*. Aust Vet J 1961;37: 381-390.
19. **Potgieter FT, Els HJ.** Light and electron microscopic observation on the development of *Babesia bigemina* in larvae, nymphs, and nonreplete females of *Boophilus decoloratus*. Onderstepoort. J Vet Res 1977; 44: 213-232.
20. **Bishop JP, Adams LG, Thompson KC, Corrier DE.** The isolation, separation and preservation of *Babesia bigemina* Trop Anim Health Prod 1973; 5: 141-145.
21. **Hoyte MHD.** Further observations on the initial development of infections with *Babesia bigemina*. J Protozool 1965; 12: 83-85.
22. **Rudzinska A.** Morphologic aspects of Host- Cell-Parasite Relationships. In: Babesiosis. Ristic M, Kreier JP, editors. New York, USA: Academic Press Inc. 1981: 87- 141.
23. **Bork S, Yokoyama N, Matsuo T, Claveria FG, Fukisaki K, Igarashi I.** Clotrimazole, ketoconazole, and clodinafop-propargyl inhibit the in

- vitro growth of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* (Phylum apicomplexa). Parasitology 2003; 127: 311-315.
24. **Mollinar E, James MA, Kakoma I, Holland C, Ristic M.** Antigenic and immunogenic studies on cell culture-derived *Babesia canis*. Vet Parasitol 1982; 10: 29-40.
 25. **Holman PJ, Spencer MA, Droleskey ER, Goethert KH, Telford RS.** *In vitro* cultivation a zoonotic *Babesia* sp. Isolated from eastern cottontail rabbits (*Sylvilagus floridanus*) on Nantucket Island, Massachusetts. J Clin Microbiol 2005; 43: 3995-4001.
 26. **Bass CC, Johns FM.** The cultivation of malarial Plasmodia (*Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*) *in vitro*. J Exp Med 1912;16: 567-579.
 27. **Trager W, Jensen JB.** Human malaria parasites in continuous culture. Science 1976; 193: 673-675.
 28. **Siddiqui WA, Gelman QM, Schnell IV.** Biological basis for susceptibility of *Aoutus trivirgatus* to species of plasmodia from man. Milit Med 1969;134: 780-786.
 29. **Monroy BM, Romero OG, Torres AR, Alvarez MJA, Canto AGJ, Veja-MCA.** Establecimiento en México del cultivo *in vitro* de *Babesia bigemina*. Téc Pec Mex 1987; 25 (2).
 30. **Schuster FL.** Cultivation of *Babesia* and *Babesia*-like blood parasites: Agents of an emerging zoonotic disease. Clin Microbiol Reviews 2002; 15: 365-373.
 31. **Nutall GHF, Graham-Smith GS.** The development of *Piroplasma canis* culture. Parasitology 1908; 1: 243-260.
 32. **Bautista CR, Kreier JP.** Effect of immune serum on the growth of *Babesia microti* in hamster erythrocytes in short-term culture. Infect Immun 1979; 25: 470-47.
 33. **Erp EE, Gravelly SM, Smith RD, Ristic M, Osorno BM, Carson CA.** Growth of *Babesia bovis* in bovine erythrocyte cultures. Am J Trop Med Hyg 1978; 27: 1061.
 34. **Irvin AD, Young ER.** Further studies on the up take of tritiated nucleic acid precursors by *Babesia spp.* of cattle and mice. Int. J Parasitol 1979; 9: 109-114.
 35. **Erp EE, Smith RD, Ristic M, Osorno BM.** Continuous cultivation *in vitro* of *Babesia bovis*. Am J Vet Res 1980a; 41: 1141-1142.

36. **Erp EE, Smith RD, Ristic M, Osorno BM.** Optimization of the suspension culture method for *in vitro* cultivation of *Babesia bovis*. Am J Vet Res 1980b; 41: 2059-2062.
37. **Figueroa VJ, Cantó AG, Álvarez MJA, Lona R, Ramos JA, Vega- MCA.** Capacidad protectora en bovinos de una cepa de *Babesia bigemina* derivada del cultivo *in vitro*. Tec Pec Mex 1998b; 36:95-107.
38. **Levy M, Ristic M.** *Babesia bovis*: Continuous cultivation in a microaerophilus stationary phase culture. Science 1980; 207: 1218-1220.
39. **Timms P.** Short term cultivation of *Babesia* species. Res Vet Sci 1980; 29: 102-104.
40. **Palmer DA, Buening GM, Carson CA.** Cryopreservation of *Babesia bovis* for *in vitro* cultivation. Parasitology 1982; 62: 221.231.
41. **Rodríguez SD, Buening GM, Green TJ, Carson CA.** Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. Imm 1983; 42: 15-18.
42. **Vega CA, Buening GM, Green TJ, Carson SA.** *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. Am J Vet Res 1985a; 46: 416-420.
43. **Vega CA, Buening GM, Rodriguez SD, Carson CA, McLaughlin K.** Cryopreservation of *Babesia bigemina* for *in vitro* cultivation Am J Vet Res 1985b; 46: 421.423.
44. **Vega CA, Buening GM, Rodriguez SD, Carson CA.** Cloning of *in vitro* propagated *Babesia bigemina*. Vet Parasitol 1986; 22: 223-233.
45. **Figueroa MS, Cantó AG, Juárez FJ, Ruiz LF.** *Babesia bovis*: Establecimiento y condiciones óptimas de multiplicación. Téc Pec Méx 1984; 46: 46.
46. **FAO.** Revision of strategies for the control of ticks and tick-borne diseases and their vectors. Rome Italy: FAO expert consultation, 1989.
47. **Bock RE, De Vos AJ.** Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. Aust Vet J 2001; 79:832-839.
48. **Callow LL, Mellors LT.** A new vaccine against *Babesia argentina* infection prepared in splenectomized calves. Austr..Vet..J. 1967; 42: 464-465.
49. **Callow LL.** Vaccination against bovine babesiosis. In: Miller H, Pino JA, McKelvey. JJ editors. Immunity to blood parasites of animals and man. Advances in experimental medicine and biology. New York: Plenum Press, 1977; 93:121-149.

50. **Callow LL, Mellors LT, MC Gregor W.** Reduction in virulence of *Babesia bovis* due to rapid passage in splenectomized cattle. *Int J Paras* 1979; 9: 333-338.
51. **Dalgliesh R, Jorgensen WK, De Vos AJJ.** New Australian vaccines for the control of babesiosis and anaplasmosis in the world cattle trade. *Trop Anim Health Prod* 1990; 22: 44-52.
52. **Holman JP, Spencer MA, Droleskey ER, Goethert KH, Telford RS.** *In vitro* cultivation of a zoonotic *Babesia* sp. isolated from Eastern Cottontail rabbits (*Sylvilagus floridanus*) on Nantucket Island, Massachusetts. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3995-4001.
53. **Rodríguez SD, Buening GM, Carson CA.** Caracterización bioquímica preliminar de clonas de *Babesia bovis* irradiadas con Co 60. *Tec Pec Mex* 1993; 31: 16-21.
54. **Gorenflot A, Brasseur P, Precigout B, L'Hostis M, Marchand A, Schrevel J.** Cytological and immunological responses to *Babesia divergens* in different hosts: ox, gerbil, man. *Parasitol Res* 1991;77: 3-12.
55. **Cantó GJ, Vega CA, Smith R.** Ensayos de vacunación contra *Babesia bovis* utilizando antígenos procedentes de cultivo *in vitro*. *Tec Pec Méx* 1982; 43: 43-54.
56. **Figueroa JV, Alvarez JA, Rojas EE, Ramos JA, Mosqueda JJ, Canto GJ, Vega CA, Buening GM.** Use of a duplex PCR/DNA probe assay to monitor *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle during a vaccination trial. *Rev Lat Amer Microbiol* 1998a; 40:39-44.
57. **Mosqueda JJ, Falcon NA, Alvarez JA, Ramos AJA, Oropeza HL, Figueroa MJ.** *Babesia bigemina* sexual stages are induced *in vitro* and are specially recognized by antibodies in the midgut of infected *Boophilus microplus* ticks. *Intern Jour for Parasitol* 2004; 34: 1229-1236.
58. **Rodríguez SD, Buening GM, Vega CA, Carson CA.** *Babesia bovis*: Purification and concentration of merozoites and infected bovine erythrocytes. *Exp Parasitol* 1986; 61: 236-243.
59. **De Castro JJ.** Sustainable tick and tick borne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet. Parasitol* 1997;71: 77-97.
60. **Cantó AGJ, Rojas EE, Álvarez JA, Ramos JA, Mosqueda JJ, Vega CA, Figueroa JV.** Protección contra babesiosis con una vacuna mixta de *B. bovis* y *B. bigemina* derivada de cultivo *in vitro* en una confrontación

- de campo. II Inmunización en un área endémica. *Téc Pecu Méx* 2003; 4:307-315.
61. **Hernández OR, Álvarez MJA, Buening GM, Cantó AG, Monroy M, Ramos JA, Vega CA.** Diferencias en la virulencia y en la inducción de protección de aislamientos de *Babesia bigemina* derivados de cultivo *in vitro*. *Tec Pec Mex* 1990; 28:51
 62. **Cantó AG, Figueroa MJV, Álvarez MJA, Ramos AJA, Vega MCA.** Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivada del cultivo *in vitro*. *Tec Pec Mex* 1996; 34:127-135.
 63. **Canto GJ, Figueroa JV, Ramos JA, Alvarez JA, Mosqueda JJ, Vega CA.** Evaluación de la patogenicidad y capacidad protectora de un inmunógeno fresco combinado de *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*. *Vet Méx* 1999; 30:215-220.
 64. **Vega CA, Figueroa MJV, Rojas RE, Ramos AJA, Cantó AG.** Insuficiente inmunidad cruzada en bovinos por *Babesia bigemina* y/o *Babesia bovis* derivadas del cultivo *in vitro*. *Tec Pec Mex* 1999; 37:13-22.

Vacunas vivas en el control de la Anaplasmosis bovina. Situación en México



*Miguel Ángel García Ortiz,
Edmundo Enrique Rojas Ramírez,
Jesús Francisco Preciado de la Torre,
Germinal Jorge Cantó Alarcón,
Sergio Darío Rodríguez Camarillo*

I. Introducción	154
II. Vacunas inactivadas controladas	155
III. Vacunas vivas no controladas.....	157
IV. Vacunas vivas controladas.....	158
V. Desarrollo de una vacuna de baja virulencia en México	159
VI. Perspectivas.....	163
Referencias	165

I. Introducción

Uno de los obstáculos más importantes para los programas de mejoramiento de la ganadería mexicana en zonas tropicales y subtropicales, es la anemia hemolítica extravascular causada por *Anaplasma marginale* (clase Alphaproteobacteria, orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae) (1); Esta infección es un problema en bovinos susceptibles introducidos a zonas endémicas. Las medidas de control son insuficientes, debido a la variación antigénica de esta especie y al gran número de vectores (artrópodos hematófagos y el hombre) que participan en su transmisión.

El genoma de esta especie, como el de todas la bacterias, está organizado en un cromosoma constituido por 1 197 687 pb (cepa St. Maries), la aparente sencillez de este microorganismo contrasta con la complejidad de su pared celular; a la fecha se han descrito seis proteínas de superficie (MSP) agrupadas en dos superfamilias genicas *mSP1* (MSP1a, MSP1b) y *mSP2* (MSP2, MSP3, MSP4); de las 949 secuencias codificadoras contenidas en su genoma, 62 se han relacionado con proteínas de superficie; de éstas, 49 pertenecen a una de las dos superfamilias. *A. marginale* tiene genes definidos como pseudogenes funcionales: copias de genes truncados que sólo expresan parte de una proteína completa después de recombinarse en un sitio único de expresión; pseudogenes funcionales similares están presentes en *A. phagocytophilum*, pero no han sido descritos en otros géneros del orden Rickettsiales. En la práctica, la existencia de estos pseudogenes permite que las proteínas MSP2 y MSP3 varíen antigénicamente y ofrezcan un mecanismo muy eficiente para evadir la respuesta inmune (2).

Además del gran potencial de recambio antigénico presente en un solo organismo de *A. marginale*, en diferentes regiones del mundo se ha demostrado que entre cepas existe una variación antigénica importante, que explica algunos de los fracasos al emplear inmunógenos de otras áreas o países. Trabajos de nuestro grupo en colaboración con De la Fuente (3, 4) demostraron que en América existen cepas regionales de *Anaplasma marginale* de acuerdo con los genes que codifican MSP4. En particular, las cuatro cepas de México aportadas por nuestro grupo fueron diferentes a la mayoría de Estados Unidos y de América del Sur; adicionalmente, la cepa de Yucatán (Méx31) fue diferente en su gen *mSP1a* al de las otras tres cepas mexicanas: Morelos (Méx 17029), México (Méx15) y Veracruz (Méx30). En este sentido, el estudio de las secuencias repetidas de la pro-

teína MSP1a en 126 cepas de *A. marginale* de América, Europa, Asia, África y Australia, mostró mayor diversidad genética en las cepas de Brasil (7/126) y en las de México (7/126), en contraste, las cepas de Australia mostraron menor diversidad. En este último estudio el grupo adicionó tres cepas más: Aguascalientes (Méx 01), Pichualco (Méx 07) y Puente de Ixtla (Méx 17017), que fueron diferentes a las cuatro cepas mexicanas estudiadas inicialmente (5). La diversidad genética documentada hasta hoy para las cepas de México hace pensar que el mosaico antigénico presente en el país debe ser muy amplio y debe tomarse en cuenta al instrumentar medidas de control basadas en inmunoprofilaxis.

El control de la anaplasmosis bovina tradicionalmente se ha dirigido al control de los artrópodos hematófagos mediante aplicaciones de acaricidas e insecticidas, El control de artrópodos ha sido dirigido a garrapatas y en menor proporción a otros vectores como moscas hematófagas; este control sólo ha tenido éxito en regiones aisladas, en lugares con políticas zoonitarias permanentes y económicamente estables para soportar campañas largas y costosas (6); sin embargo, una de las principales consecuencias indeseadas ha sido la selección de poblaciones de artrópodos resistentes a acaricidas e insecticidas (7), además del impacto ambiental negativo de los residuos aún activos (8).

El control a base de antibióticos, principalmente oxitetraciclinas, se ha dirigido a bovinos portadores o enfermos; sin embargo, esta estrategia se ha circunscrito a su uso terapéutico ante infecciones patentes, dado que la vida media de los fármacos y la protección que pudiera brindar es de muy corta duración; en contrapartida, el empleo de antibióticos en animales en producción inhibe la comercialización de carne y leche por más de 30 días (9). El control también se ha realizado mediante la aplicación de vacunas inactivadas y vivas. Las medidas de vacunación no han variado sustancialmente en los últimos 74 años, desde que Omlin, en 1932, inmunizó en Suiza bovinos con *Anaplasma centrale* destinados a la exportación a zonas endémicas de *Anaplasma marginale* (10).

II. Vacunas inactivadas controladas

Las vacunas inactivadas o muertas han tenido resultados variables (10), su mayor aplicación se encuentra cuando las vacunas son elaboradas a

partir de cepas locales (protección homóloga), debido a que muchas veces la protección conferida por una cepa no protege contra otra cepa (protección heteróloga) (11). Una de las primeras vacunas comerciales inactivadas contra *Anaplasma marginale* evaluadas en América, fue la vacuna Anaplaz®, que debido al deficiente proceso de purificación de los cuerpos iniciales estimulaba la formación de isoanticuerpos, que fueron responsables de una isoeritrolisis neonatal pronunciada (12). En México, a mediados de la década de 1990, se evaluó bajo condiciones controladas y de campo otra vacuna comercial inactivada (Plazvax®), que si bien había mejorado sustancialmente su proceso de purificación, fracasó al enfrentarse al repertorio antigénico de las cepas nativas del país (13, 14). Utilizando la misma cepa y metodología empleada en la vacuna Plazvax, actualmente la Universidad Estatal de Louisiana, Estados Unidos de América, ofrece una vacuna inactivada que aseguran ha protegido contra la infección a bovinos de Estados Unidos y de Puerto Rico (15).

En México, como en muchas regiones del mundo, no existen vacunas comerciales disponibles para prevenir la anaplasmosis bovina. Tomando en cuenta los resultados negativos observados al tratar de introducir vacunas vivas atenuadas e inactivadas de otras latitudes con repertorios antigénicos diferentes a los endémicos en México, durante los últimos 12 años el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) ha desarrollado y evaluado alternativas de control con base en inmunógenos locales.

En un primer experimento, empleando dos aplicaciones de cuerpos iniciales inactivados de tres cepas mexicanas de *A. marginale*, se demostró que es posible la inducción de protección homóloga contra esta infección (16). En un segundo ensayo al incrementar la dosis de las cepas empleadas se demostró que es posible proteger contra anaplasmosis bovina bajo condiciones controladas y ante desafío homólogo a partir de cepas locales (17). En el siguiente experimento, bajo condiciones controladas, se evaluó la protección de la vacuna inactivada ante un desafío heterólogo, los resultados confirmaron la protección que brinda una vacuna inactivada cuando se incluye la cepa que posteriormente se empleará al desafío (protección homóloga); sin embargo, no protegió ante un desafío heterólogo (18).

Las evidencias muestran que las vacunas inactivadas son excelentes en desafíos homólogos; sin embargo, la existencia de cepas, la presenta-

ción cíclica de variantes de proteínas de superficie (MSP2) en un mismo animal portador y el potencial de recambio antigénico de las superfamilias *msp1* y *msp2* explican el alcance limitado de estas vacunas inactivadas ante desafíos heterólogos debido a que sólo pueden mostrar al sistema inmune las variantes presentes en el momento de su inactivación y en una cantidad limitada; si bien es cierto que existe certidumbre de que a largo plazo se podrá contar con inmunógenos recombinantes, éstos actualmente no se tienen y las vacunas vivas atenuadas o de baja virulencia pueden ofrecer una herramienta adecuada para enfrentar desafíos heterólogos.

III. Vacunas vivas no controladas

Para inmunizar a bovinos susceptibles se ha empleado sangre infectada de animales portadores o de animales con infección aguda como inóculos no controlados. En el primer caso, existe el riesgo de que la sangre no cuente con la cantidad suficiente de eritrocitos infectados para establecer la infección en los animales inoculados; en ambos casos puede suceder también que el periodo prepatente de la infección inducida sea muy prolongado y que la presentación patente de la anaplasmosis se dé en un periodo sin supervisión médica (19); en contraste, inóculos a partir de infecciones agudas pueden desencadenar brotes serios de la enfermedad al usar dosis muy grandes de eritrocitos infectados con accidentes clínicos de importancia; el uso de esta metodología conlleva el riesgo de transmitir otros agentes patógenos a través de la sangre, como *Babesia* spp, *Brucilla* spp o *Mycobacterium* spp. y virus como el de la diarrea viral bovina o de la leucosis bovina (20). Adicionalmente, el uso de vacunas que contienen elementos de la sangre o sus derivados en cantidades significativas, puede provocar la presentación de isoeritrolisis neonatal (21, 22). Alternativamente se emplea la quimioprofilaxis supervisada en el periodo de introducción de animales susceptibles a zonas de riesgo; en este método los animales que se introducen sin protección, son vigilados hasta que comienzan a desarrollar una rickettsemia observable al microscopio y se aplican medicamentos antes de que se presenten los signos clínicos de la enfermedad (23). Este tipo de manejo lleva implícito el riesgo de tratar a los animales antes de que se desarrolle una adecuada respuesta inmune capaz de proteger contra las infecciones subsecuentes, ello puede llevar a resultados contrarios a los esperados (24).

IV. Vacunas vivas controladas

Como vacunas vivas controladas se han empleado cepas vivas atenuadas o de baja virulencia de las especies *Anaplasma marginale* y *A. centrale* que desde su descubrimiento se resaltó que provocaba infecciones menos virulentas a las ocasionadas por *A. marginale* en bovinos (25). Las vacunas vivas atenuadas tienen la ventaja de que los microorganismos empleados para su elaboración han perdido o disminuido su virulencia, de forma que no producen un cuadro clínico severo, pero siguen multiplicándose para que el sistema inmune reconozca su amplia gama de antígenos y confieran una respuesta inmune más fuerte (24).

En la literatura son escasos los trabajos con cepas atenuadas o de baja virulencia de *Anaplasma marginale*. Los principales métodos de atenuación son en especial pases en ovinos o en venados e irradiación con emisiones gamma. Los primeros intentos de atenuación para *Anaplasma marginale* en América se deben a Lignieres, en Argentina, al realizar pases de la rickettsia por ovejas (26). La cepa Florida de *A. marginale* atenuada por irradiación y a través de pases en venados y ovinos esplenectomizados por Ristic *et al.* fue evaluada en Estados Unidos, Perú, Venezuela, Colombia, Brasil y México (12). El uso de este inmunógeno en animales jóvenes mostró resultados alentadores (12, 27); sin embargo, evaluaciones en animales adultos mostraron efectos indeseables (abortos) y reducida protección (28) interrumpiendo su aplicación a principio de la década de 1980 (10, 29). Informes de otras cepas atenuadas en Colombia y en Cuba admitieron tener fallas en la atenuación, por ello también interrumpieron sus trabajos (10). Varios trabajos con cepas irradiadas se notificaron durante las décadas de 1960 y 1970 (30), pero sus resultados fueron variables. Sharma y Bansal (30) también evaluaron otra cepa irradiada e informaron resultados satisfactorios en becerros de 2 a 3 meses de edad. La única vacuna viva de *A. marginale* que se comercializa actualmente en América del Norte es la vacuna viva modificada (multiplicada en ovinos) que ofrece la Universidad Davis de California, Estados Unidos, y que asegura protege animales jóvenes (31). Si bien se han descrito resultados positivos al emplear las anteriores vacunas, las principales restricciones para su empleo han sido: edad de los animales en la que protege (jóvenes o muy jóvenes) y el fracaso ante el desafío con cepas originarias de otras latitudes que cuentan con un reper-

torio antigénico diferente (29). En Australia, Bock *et al.* (32) describieron la cepa Dawn, que pudo ser transmitida vía trasplacentaria y tiene la cualidad de ser de baja virulencia; los estudios realizados hasta ahora la señalan como un buen prospecto para ser usada en Australia como vacuna viva.

La vacuna viva de *Anaplasma centrale*, que originalmente se ha notificado como de baja virulencia y que protege a los bovinos de una infección por *Anaplasma marginale*, se ha empleado en el mundo por más de 70 años. En América, esta vacuna se ha evaluado en Argentina (1955), Venezuela (1958), Uruguay (1962), Perú (1966) y Brasil (1988), no obstante se han multiplicado los informes de protección parcial o de aparición de severos problemas posvacunación (10, 29). En México esta cepa no existe y su uso está prohibido por considerarse especie exótica.

V. Desarrollo de una vacuna de baja virulencia en México

En un experimento para desarrollar una vacuna inactivada en México, se observó que una de las cepas de desafío (Méx31-Yucatán) falló al emplearse a dosis de 10^8 eritrocitos infectados (e.i.) y no inducir signos clínicos en los animales del grupo testigo (16). Esta observación se confirmó al comparar inoculaciones de 10^6 e.i. de esta cepa y de la cepa Méx15 (México) en grupos de cuatro animales susceptibles a los que no se les administró tratamiento y se permitió que la infección se expresara en su totalidad (33). En este experimento, 100% de los animales inoculados con la cepa Méx15 mostraron infección patente que contrastó con 25% de los animales que presentaron infección moderada con Méx31.

Con base en estos antecedentes se realizó un experimento con la cepa viva Méx31 (Yucatán) de recién multiplicación y tres más con la cepa en forma de inóculo pre-congelado bajo condiciones controladas para evaluar la inmunoprotección conferida. En los dos primeros experimentos se determinó la dosis de vacunación y en los dos últimos experimentos se desafío con cepas diferentes de *A. marginale*. En total se emplearon 78 bovinos vacunados más los respectivos grupos testigos de cada experimento; la edad de los animales varió de 18 a 24 meses, todos fueron originarios de estados del norte de México y negativos a *A. marginale* por ELISA y PCR;

como desafío se emplearon 10^8 eritrocitos infectados de tres cepas virulentas de *A. marginale* diferentes (Morelos, Pichucalco y Aguascalientes). Las cuatro cepas tienen la particularidad de presentar diferentes fragmentos repetidos en tándem en el fragmento variable del gen *msp1a*, hecho que favorece su identificación por PCR, así Yucatán presenta siete fragmentos; Morelos, cuatro; Pichucalco, seis; y Aguascalientes, cinco (3, 5). La evaluación incluyó parámetros clínicos y PCR para el gen conservado *msp5* y ELISA. Para corroborar la cepa vacunal y las cepas de desafío se empleó el PCR para el fragmento variable del gen *msp1a*., en ambos PCR se usaron iniciadores ya notificados para cada gen (34, 35). Todas las evaluaciones se realizaron en ranchos experimentales de Querétaro. A continuación se presentan los parámetros más sobresalientes de estos experimentos.

En el primer experimento se evaluaron cuatro dosis crecientes de eritrocitos infectados recién multiplicados (10^4 , 10^6 , 10^8 y 10^{10}) no congelados. Se emplearon grupos de siete animales, con excepción del grupo 10^6 que se evaluó con cinco bovinos. Un quinto grupo se consideró como testigo. Como cepa de desafío se empleó la cepa Méx17 (Morelos). Durante 56 días, los 26 bovinos inoculados con la cepa Méx31 no mostraron signos clínicos importantes de anaplasmosis. Resultados de PCR y ELISA en el periodo posvacunal mostraron respuesta gradual ascendente y proporcional a la dosis recibida. Los resultados positivos a PCR en la totalidad de los animales vacunados de los tres grupos con mayor dosis (10^6 , 10^8 y 10^{10}) y las diferencias ($P < 0.05$) en el volumen celular aglomerado (VCA) y en ELISA entre los dos grupos de mayor dosis (10^8 y 10^{10}) vs. grupo testigo, confirmaron la multiplicación y desarrollo de una respuesta inmune progresiva de la cepa Méx31. El grupo que recibió la menor dosis (10^4) tuvo comportamiento similar al grupo testigo. En el periodo posdesafío se observó retraso en la presentación de la infección y en el descenso del VCA en los grupos vacunados con mayores dosis. El grupo con mayor dosis (10^{10}) presentó protección mayor (85.7%) al grupo con menor dosis (29%). La protección conferida por la cepa Méx31 en el grupo con mayor dosis fue similar a la observada en vacunas inactivadas mexicanas ante desafíos homólogos (36).

En un segundo experimento se evaluó la presentación congelada de las tres mayores dosis (10^6 , 10^8 y 10^{10} e.i.) de la misma cepa Méx31. Se utilizaron cuatro grupos de seis bovinos, incluido el grupo testigo; a los 64

días de la inoculación todos los animales se desafiaron con la cepa Méx17. Durante el periodo de posvacunación de los 18 animales inoculados con Méx31, sólo un animal (5%) fue tratado por presentar infección patente; la multiplicación de la cepa vacunal se corroboró en frotis de sangre teñida con Giemsa y en la pérdida del VCA de los bovinos vacunados (50%, 46% y 41% en los grupos 10^{10} , 10^8 y 10^6 e.i., respectivamente), a su vez en este periodo el grupo testigo registró disminución del VCA de 12% atribuido a condiciones normales de adaptación. Los animales con la dosis más alta (10^{10} e.i.) fueron positivos a PCR a los siete días después de la vacunación (dv), mientras que los animales de los grupos 10^8 y 10^6 se observaron positivos 21 y 28 días dv, respectivamente. Para el día 63 dv, todos los animales vacunados (excepto uno del grupo 10^6) se mostraron positivos a *msp5* por PCR. Después del desafío se observó pérdida de eritrocitos en el grupo testigo de 64%, en cambio en los tres grupos vacunados se halló pérdida de eritrocitos que varió entre 35% y 37%. La protección conferida en este experimento para los grupos inoculados con 10^{10} , 10^8 y 10^6 e.i. fue de 83.3%, 66.6% y 75%, respectivamente (37).

En el tercer experimento y por cuestiones meramente prácticas, se seleccionó la dosis de 10^8 eritrocitos infectados para evaluar la cepa vacunal Méx31; como cepa de desafío se empleó la cepa Méx07 (Pichualco). Se utilizaron dos grupos de diez animales, un grupo vacunado y otro testigo. En el día 71, los animales fueron confrontados con la cepa de desafío. En la etapa de vacunación la cepa Méx31 produjo un descenso en el VCA en el grupo vacunado de 41.1%; por su parte, el grupo testigo disminuyó 15%. El máximo valor registrado de eritrocitos infectados en el periodo vacunal fue de 4.7%; sin embargo, en la mayoría de los animales la presencia de la rickettsia en frotis fue transitoria y en ningún caso se requirió tratamiento quimioterapéutico ante la ausencia de signos clínicos de la enfermedad. Al ELISA el grupo vacunal mostró aumento en la respuesta de anticuerpos específicos entre los días 13 y 26 posvacunación, correspondiente a un primer estímulo inmunológico. El grupo testigo se observó negativo a esta prueba. Después del desafío, a partir del día 19 el grupo vacunado mostró una segunda respuesta inmune, mayor a la primera; en la misma fecha el grupo testigo mostró el inicio de una primera respuesta inmune específica, pero de menor intensidad en comparación con el grupo vacunado. El día 14 posvacunación se detectaron positivos todos los animales vacu-

nados por PCR. Catorce días posdesafío en PCR se encontraron positivos cuatro bovinos del grupo vacunado y cinco bovinos del grupo testigo a la cepa Méx07. La pérdida de VCA al desafío fue mayor en el grupo testigo ($P < 0.05$), con pérdida de 56.5% en comparación con 23.2% para el grupo vacunado. De los diez animales testigos, cinco mostraron cuadro clínico severo de la enfermedad y requirieron quimioterapia para evitar la muerte; del grupo vacunado ninguno requirió tratamiento (38).

En el cuarto experimento, además de evaluar una tercera cepa de desafío, la vacunación con la cepa de baja virulencia se combinó con aplicación doble de una vacuna inactivada experimental a partir de cepas virulentas. Se utilizaron 48 bovinos distribuidos en dos grupos iguales, el primer grupo fue inmunizado con una vacuna inactivada (dosis de 50 μg de una mezcla de tres cepas de *A. marginale*, Yucatán, Veracruz y Morelos) vía intramuscular los días 0 y 15, el día 15 también se inoculó vía subcutánea la vacuna de baja virulencia (10^8 e.i., cepa Yucatán); el segundo grupo no recibió inmunización. El día 60 los animales fueron confrontados con la cepa Aguascalientes (Méx01). Los animales vacunados mostraron descenso en el VCA en la etapa de vacunación, el valor en esta etapa se mantuvo mayor a 20%, el grupo no vacunado mantuvo sus valores originales durante la etapa de vacunación mayor a 30%. Un mes después de la vacunación con la cepa de baja virulencia (Méx. 31) se observó rickettsia en 50% de los animales vacunados; siete días después, todos los animales vacunados se mostraron positivos a la rickettsia, ello demostró el establecimiento de la infección por la cepa vacunal viva. Los animales no vacunados se mostraron negativos a frotis hasta el momento del desafío. En el grupo vacunado se observó aumento inicial de IgG totales específicas 14 días después de la primera vacunación con inmunógeno inactivado; 41 días después de la segunda vacunación con inmunógeno inactivado y 27 días después de la vacunación con la cepa de baja virulencia, se observó un segundo aumento de anticuerpos correspondiente a un segundo estímulo antigénico; éste disminuyó cinco días después del desafío. En éste se observó diferencia ($P < 0.05$) en los valores de VCA entre el grupo vacunado y el no vacunado, con una media de descenso del 10% y 49%, respectivamente; los animales no vacunados mostraron valores menores a 20%. Veintiséis días luego del desafío, los animales del grupo no inmunizado se observaron positivos a frotis; un mes después del desafío el grupo vacunado presentó menor PEI

que el grupo no vacunado ($P < 0.05$). Cuarenta días después del desafío, la respuesta de anticuerpos volvió a incrementarse en los animales vacunados e inició la respuesta en los animales no vacunados.

Prácticamente en todas las etapas, la respuesta de anticuerpos específicos fue diferente ($P < 0.05$) entre el grupo vacunado y el no vacunado. Durante el periodo de desafío fueron tratados diez animales del grupo no vacunado, en contraste sólo un animal del grupo vacunado fue tratado (39).

VI. Perspectivas

Los animales con infección en forma natural o inducida, quedan protegidos contra infecciones homólogas, pero parcialmente protegidos contra infecciones heterólogas (11, 40, 41), este principio se ha tratado de usar para el diseño de vacunas derivadas a partir de cepas de diferentes regiones geográficas (42); el uso de cuerpos iniciales de tres cepas diferentes ensayadas repetidamente por nuestro grupo con inmunógenos inactivados ha demostrado eficiencia para desafíos homólogos. Al igual que México, a la fecha varios países cuentan con inmunógenos experimentales que confieren protección aceptable ante desafíos homólogos (10); sin embargo, está pendiente la imposibilidad para estimular una protección adecuada ante desafíos heterólogos. Proteínas nativas y recombinantes (MSP1, MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5) han sido evaluadas para proteger contra esta infección con resultados parciales o negativos (29). Varios estudios se están dirigiendo a la evaluación de proteínas relacionadas con el estímulo de linfocitos CD4+ productores de interferón gamma e interleucina 2 y 12 con el propósito de aumentar la protección (43).

Después de evaluar 78 bovinos vacunados con la cepa Méx31 bajo condiciones controladas y desafiados con cepas heterólogas de *A. marginale*, sólo un animal (1.2%) fue tratado en el periodo vacunal y la protección observada fue similar a ensayos de vacunas inactivadas ante desafíos homólogos. Actualmente está en proceso la evaluación de esta vacuna en condiciones de campo y queda pendiente la multiplicación de la cepa en cultivo *in vitro* para prevenir la transmisión de otras enfermedades.

Con base en tales resultados, en México actualmente se cuenta con vacunas inactivadas que estimulan una protección adecuada ante un de-

safío homólogo y limitada ante uno heterólogo. A largo plazo existe mucha certidumbre de que se podrán identificar los determinantes antigénicos suficientes para estimular adecuada protección a través de proteínas nativas o recombinantes. Mientras esto sucede, el empleo de la vacuna viva de baja virulencia Méx31 (Yucatán) puede ofrecer, en corto o mediano plazos, una herramienta de suma utilidad para disminuir el impacto de esta infección en animales susceptibles al ser introducidos a las zonas endémicas de México, donde no se cuenta con los aislamientos de cepas para la preparación de vacunas homólogas.

 Referencias

1. **Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, and Rurangirwa FR.** Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 2145-2165, 2001.
2. **Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC, and Knowles DP.** Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 102 (3): 844-849, 2005.
3. **De la Fuente J, García-García JC, Blouin EF, Rodríguez SD, García MA, and Tocan KM.** Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. *Animal Health Research Reviews*, 2: 163-173, 2001.
4. **De la Fuente J, Van den Bussche RA, García-García JC, Rodríguez SD, García MA, Gunglielmone AA, Mangold AJ, Friche PLM, Barbosa RMF, Blouin EF, and Kocan KM.** Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. *Vet. Mic.*, 88: 275-285, 2002.
5. **De la Fuente J, Ruybal P, Mtshali MS, Naranjo V, Shuqing L, Mangold AJ, Rodríguez SD, Jiménez R, Vicente J, Moretta R, Torina A, Almazán C, Mbaty PM, Torioni de ES, Farber M, Rosario CR, Gortazar Ch, and Kocan MK.** Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. *Veterinary Microbiology*, 119: 382-390, 2006.
6. **George JE, Davey RB, and Pound JM.** Introduced ticks and tick-borne diseases: the threat and approaches to eradication. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.*, 18, (3): 401-416, 2002.
7. **George JE.** Present and future technologies for tick control. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*; 916: 583-588, 2000.

8. **Wall R, and Strong L.** Environmental consequences of treating cattle with the antiparasitic drug ivermectin. *Nature*, 327 (6121): 418-421, 1987.
9. **Guillot P, Sanders P and Mourot D.** Chloramphenicol and oxytetracycline residues in milk and tissues from cows and bullocks treated with an injectable formulation. *Food Addit. Contam.*, 6 (4): 467-473, 1989.
10. **REDLAB-** (Red de Cooperación Técnica entre Laboratorios de Investigación y Diagnóstico Veterinario). Programa de Hemoparásitos. Inmunógenos y métodos de inmunización para el control de la anaplasmosis y babesiosis bovina. GAN-41 Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Santiago, Chile: 1-34, 1992.
11. **Kuttler KL, Zaugg JL, and Jonson LW.** Serologic and clinical responses of premunized vaccinated and previously infected cattle to challenge exposure by two different *Anaplasma marginale* isolates. *Am. J. Vet. Res.*, 45: 2223-2226, 1984.
12. **Ristic M, and Carson AC.** Methods of immunoprophylaxis against bovine anaplasmosis with emphasis on use of the attenuated *Anaplasma marginale* vaccine. *Immunity to blood parasites of animals and man.* Miller HH, Pino JA, McKelvey JJ editors. Ney York, New York USA, Plenum Publishing Corporation: 151-188, 1977.
13. **Comité de Enfermedades Parasitarias (a): Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal.** Experiencias sobre el uso de vacunas contra *Anaplasma marginale*. Cuarta Reunión Anual del Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. México, D. F., 452-467, 1995.
14. **Figueroa MJV, Cantó AGJ, Ramos AJA, Rojas-R EE, Santiago VC, Granjeno CG, García OMA, y Parrodi F.** Evaluación en condiciones de campo de la vacuna inactivada de *Anaplasma marginale* denominada "Plazvax". *Vet. Méx.*, 30: 221-225, 1999.
15. **Luther G.** History of our anaplasmosis vaccine. Louisiana State University 2007. Disponible en: <http://www.anaplasmosisvaccine.com/home.html>. Consulado, 24 de mayo, 2007.
16. **Rodríguez CDS, García OMA, Cantó AGJ, Hernández GS.** Ensayo de un inmunógeno experimental inactivado contra *Anaplasma marginale*. *Tec. Pec. Méx.*, 37: 1-12, 1999.
17. **Rodríguez CDS, García OMA, Hernández GS, Santos CNA, Abortes TR, Cantó AGJ.** *Anaplasma marginale* inactivated vaccine: dose titration

- against a homologous challenge. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 23: 239-252, 2000.
18. **Ocampo EV, Salazar VJE, Durán AM, García OMA, Cantó AGJ, and Rodríguez SD.** *Anaplasma marginale*: Lack of cross-protection between strains that share MSP1a variable region and MSP4. *Veterinary Microbiology*, 114: 34-40, 2006.
 19. **Franklin TE, and Huff J.** A proposed method of premunizing cattle with minimum inocula of *Anaplasma marginale*. *Res. Vet. Sci.*, 8 (4): 415-418, 1967.
 20. **Rogers RJ, Dimmock CK, de Vos AJ, and Rodwell BJ.** Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced *in vivo* against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Aust. Vet. J.*, 65 (9): 285-287, 1988.
 21. **Dennis RA, O'Hara PJ, Young MF, and Dorris KD.** Neonatal immunohemolytic anemia and icterus of calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 156: 1861-1869, 1970.
 22. **Dimmock CK, and Bell K.** Hemolytic disease of the newborn in calves. *Aust. Vet. J.*, 46 (2): 44-47, 1970.
 23. **Jorgensen WK, Bock RE, de Vos AJ, and Shiels IA.** Sheep-adapted *Anaplasma marginale* maintains virulence for cattle. *Aust. Vet. J.*, 70 (5): 192-193, 1993.
 24. **Rodríguez-C DS, García OMA, Abortes TR, Cantó AGJ, Barigye R.** Inmunología e inmunoprofilaxis de la anaplasmosis bovina. *Ciencia Veterinaria* (9) Moreno-Chan, R. editor, Fac. de Med. Vet. Y Zoot., UNAM, México, D. F.: 123-164, 2004.
 25. **Theiler A.** Further investigations into anaplasmosis of South African cattle, 7-46. In 1st Report of the Director of Veterinary Research, Department of Agriculture of the Union of South Africa, 1911.
 26. **Lignieres J.** Receptividad del carnero a la anaplasmosis y atenuación del parásito por pasajes sucesivos en este animal. *Rev. Fac. Agron. Vet. Univ. Buenos Aires, Argentina* 5:5, 1925. Cit. por REDLAB, 1992.
 27. **Osorno BM, Solana MP, Pérez MJ. and Trujillo LR.** Study of attenuated *Anaplasma marginale* vaccine in Mexico – Natural challenge of immunity in an enzootic area. *Am. J. Vet. Res.*, 36: 631-633, 1975.
 28. **Comité de Enfermedades Parasitarias (b). Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal.** Vacunas para anaplasmosis. Cuarta

- Reunión Anual del Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. México, D. F., 438-445, 1995.
29. **Kocan KM, Blouin EF, and Barbet AF.** Anaplasmosis control: past, present, and future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 916: 501-509, 2000.
 30. **Sharma SP, and Bansal GC.** Immune responses in cattle vaccinated with gamma-irradiated *Anaplasma marginale*. *Indian J. An. Sci.* 56: 490-493, 1986.
 31. **Maas J.** Anaplasmosis protection when buying bulls & heifers. UCD VET VIEWS July-August 2000. Disponible: http://www.vetmed.ucdavis.edu/vetext/INF-BE_cca/INF-BE_cca00/INF-BE_cca000708.html. Consultado 24 de mayo, 2007.
 32. **Bock RE, de vos AJ, Kingston TG, and Carter PD.** Assesment of a low virulence Australian isolate of *Anaplasma marginale* for pathogenicity, immunogenicity and transmissibility by *Boophilus microplus*. *Vet. Par.*, 118: 121-131, 2003.
 33. **García OMA, Abortes TR, Hernández SG, Cantó AGJ, y Rodríguez- C SD.** *Anaplasma marginale*: Diferentes grados de virulencia en dos aislados mexicanos. *Vet. Méx.*, 31 (2): 157-160, 2000.
 34. **Palmer GH, Knowles DP Jr, Rodriguez JL, Gnad DP, Hollis LC, Marston T, Brayton KA.** Stochastic transmission of multiple genotypically distinct *Anaplasma marginale* strains in a herd with high prevalence of *Anaplasma* infection. *J. Clin. Microbiol.*, 42 (11): 5381-5384, 2004.
 35. **Torioni de ES, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH, Suarez CE, Mc Elwain TF.** Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J. Clin. Microbiol.*, 36 (3): 777-782, 1998.
 36. **Gómez GA, Elías MJL, López TI, Rojas REE, Cantó AGJ, Preciado de la TJF, García OMA, y Rodríguez CSD.** Evaluación de una vacuna de baja virulencia de *Anaplasma marginale*. I. Inmunógeno fresco. XXIX Congreso Nacional de Buiatría (CD), Puebla, México, 2005.
 37. **Morales TI, Ordaz ChXA, Rojas REE, Canto AGJ, García OMA, Preciado de la TJF, y Rodríguez-C SD.** Evaluación de una vacuna de baja virulencia de *Anaplasma marginale*. II. Inmunógeno congelado. XXIX Congreso Nacional de Buiatría (CD), Puebla, México, 2005.

38. **Mota FY, Labra MR, Rojas REE, García OMA, Cantó AGJ, Preciado de la TJF, Rodríguez CSD.** Evaluación de una cepa mexicana congelada de *Anaplasma marginale* de baja virulencia (Méx31) ante un desafío heterólogo en bovinos en confinamiento. VII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria (CD), Acapulco, México, 2006.
39. **Martínez JCA, Montoya FMD, Cantó AGJ, García OMA, Preciado de la TJF, Rojas REE, Castañeda JMC, Hernández SG, Labra MR, Romano MJ, Montiel HJL, y Rodríguez CSD.** Evaluación inmunológica de la administración oral de probióticos en la vacunación contra *Anaplasma marginale*. VII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria (CD), Acapulco, México, 2006.
40. **Palmer GH.** Anaplasma vaccines. Veterinary and hemoparasite vaccines. I.G. Wright (ed.) CRC Press, Inc Boca Raton, Fl.: 2-29, 1989
41. **Vizcaino O, Corrier DE, Terry MK, Carson CA, Lee AJ, Kuttler KL, Ristic M, and Trevino GS.** Comparison of three methods of immunization against bovine anaplasmosis: evaluation of protection afforded against field challenge exposure. Am. J. Vet. Res. 41 (7): 1066-1068, 1980.
42. **Palmer GH, Barbet AF, Musoke AJ, Katende JM, Rurangirwa F, Shkap V, Pipano E, Davis WC, and McGuire TC.** Recognition of conserved surface protein epitopes on *Anaplasma centrale* and *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenya and the United States. Int. J. Parasitol., 18 (1): 33-38, 1988
43. **Barigye R, García OMA, Rojas REE, and Rodríguez CSD.** Identification of IgG2-specific antigens in Mexican *Anaplasma marginale* strains. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1026: 84-94, 2004.

El cultivo *in vitro* de *Anaplasma marginale*: ¿Involución o evolución?¹



Gabriela Sarahí Luna Castro²

Laura Elena Orozco Vega³

Carlos Agustín Vega y Murguía[†]

Sergio Darío Rodríguez Camarillo[†]

Patricia Ramírez Noguera⁴

I. Introducción	172
II. El agente causal: <i>Anaplasma marginale</i>	173
III. El Proceso de infección por <i>Anaplasma marginale</i>	175
IV. Cultivo de <i>Anaplasma marginale</i> en eritrocitos de bovino	177
V. Cultivo de <i>Anaplasma marginale</i> en células de artrópodo	186
VI. Cultivo de <i>Anaplasma marginale</i> en otro tipo de células.....	190
VII. Discusión y conclusiones	194
Referencias	199

1 Agradecimiento: Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo recibido al través del Proyecto SAGARPA-CONACYT 2004-C01-71.

2 CENID Parasitología Veterinaria / INIFAP; Carretera Federal Cuernavaca – Cuautla N° 8534, Col Progreso, Jiutepec, C.P. 62550, Morelos.

3 C. E. Huimanguillo, CIR Golfo Centro / INIFAP; Km. 1 Carretera Huimanguillo – Cárdenas, Huimanguillo, C.P. 86401, Tabasco.

4 Campo 1, FES Cuautitlán / UNAM; Km. 2.5 Carretera Cuautitlán – Teoloyucan, Cuautitlán Izcalli, C.P. 54700, Estado de México.

I. Introducción

En México el desarrollo de la ganadería ha sido restringido por la aparición de entidades nosológicas, como el complejo formado por las enfermedades causadas por los hemoparásitos y sus vectores. Entre ellas se encuentra la anaplasmosis bovina, enfermedad infecciosa no contagiosa, cuyas características son fiebre y anemia progresiva causada por bacterias gramnegativas intraeritrocíticas obligadas (1). Este padecimiento resulta importante por las enormes pérdidas económicas y gastos que ocasiona, además por la disminución en ganancia de peso, costos de tratamientos, tiempo de recuperación de los animales, baja producción de leche y, eventualmente, mortalidad (2-4), principalmente en las regiones tropicales y subtropicales. En los Estados Unidos, por ejemplo, se describe una mortalidad anual entre 50 mil a 100 mil animales, con costo de hasta 300 millones de dólares. Se han estimado tasas de infección de hasta 73% para el ganado de Santa Lucía (5) y de 78% para El Salvador (6). En Cuba, durante los primeros años de la década de 1990 en adelante, la anaplasmosis bovina se presentaba como una de las primeras causas de mortalidad en el ganado adulto; sólo en 1993 se estimó una pérdida superior a dos millones de dólares, según datos de la Dirección de Medicina Veterinaria de Cuba (2). En Argentina, en 2000 se notificó la existencia de un rebaño donde 50% de los animales tenía anticuerpos contra *A. marginale* por la prueba de aglutinación en tarjeta y en 2003 se informó alta incidencia de anaplasmosis, a pesar de no ser una enfermedad de declaración obligatoria (7). En Colombia es considerada como de gran importancia, ya que también constituye una restricción para el incremento de la productividad ganadera de ese país (8). En Venezuela se ha observado incidencia alta de la enfermedad (9) y en Paraná, Brasil, se informó de valores hasta 87.6% de animales positivos en una región endémica (10). En un estudio realizado en México, al norte de Veracruz, se mostró que 69% del ganado estaba infectado (11) y datos no publicados muestran que hasta 90% de animales mayores pueden ser PCR positivos a anaplasmosis (Preciado, comunicación personal). Esta enfermedad se ha descrito en muchas áreas del mundo, en India (12) y otras regiones de Asia y el Pacífico, es considerada como enfermedad endémica causante de pérdidas considerables en el ganado importado. Al sur de África se

informa de 50% a 75% de prevalencia de infección (13). Aunque su relevancia en las regiones tropicales y subtropicales es manifiesta, se ha detectado su presencia en Suiza, en una explotación ganadera en dos sitios diferentes, con 8.2% de muestras positivas por ELISA (14). Hasta el momento no se cuenta con un método de control eficaz, incluyendo el hecho de que los antibióticos usados para tratar los cuadros clínicos no son capaces de eliminar el estado de portador (15), por lo que resulta de gran importancia desarrollar estrategias para prevenirla, por ello el uso de líneas celulares como modelo de estudio para el cultivo de esta rickettsia, representa una herramienta tangible, útil para patógenos intracelulares que resultan ser microorganismos de difícil aislamiento y replicación (16, 17).

II. El agente causal: *Anaplasma marginale*

A la rickettsia *Anaplasma marginale* se le llegó a considerar protozooario hemático (18); sin embargo, el término *Anaplasma* no fue descrito hasta varios años más tarde (19, 20), refiriéndose a su aparente falta de cuerpo o citoplasma, en comparación con el resto de los hemoparásitos. Las investigaciones ulteriores demostraron que el género *Anaplasma* se ubica dentro del orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae (21). *Anaplasma marginale* es la especie tipo de este género y considerada como la más patógena para los bovinos; además de ella, se reconocen otras seis especies: *A. centrale*, causante de una forma benigna; *A. caudatum* y *A. bovis* (= *Ehrlichia bovis*), también del ganado bovino. *A. phagocytophilum* (= *Ehrlichia phagocytophila*), *A. platys* (= *Ehrlichia platys*) y *A. ovis*, se han involucrado en el padecimiento en humanos, ovinos y caprinos (22). Esta clasificación está basada no sólo en sus propiedades que la identifican como bacteria intracelular obligada, parásita dentro de vacuolas de células eucariontes, sino también con base en los análisis del gen que codifica la fracción 16s de su ARN ribosomal.

CUADRO 1

Atributos del genoma de la *Rickettsia Anaplasma marginale*, cepa St. Maries

Tamaño del genoma (pares de bases)	1,197,687
G + C (%)	49.8
Codificación para proteínas (%)	86
Genes que codifican proteínas	949
Funcionales	567
Familia conservada	107
Hipotéticas conservados	126
Hipotéticos	151
Seudogenes funcionales	14
Marcos abiertos de lectura en dominios divididos	8
Densidad de genes	0.79
Longitud de los genes (promedio)	1,077
ARN ribosomales	3
ARN de transferencia	37

Traducido de: Brayton et al., 2005 (23)

En un estudio elaborado recientemente (23) se describe el genoma completo de la cepa *St. Maries* de *A. marginale*, destacando su ADN circular de pequeño tamaño cercano a 1.2 millones de pares de bases. En el Cuadro 1 se muestran las características más relevantes de dicho genoma. La determinación de las secuencias codificadoras resultantes se llevó al cabo con base en la aplicación de los protocolos descritos en el sistema bioinformático BLAST, destacando 949 secuencias que codifican por alguna proteína o fracción de ésta. Como criterio de clasificación se utilizó la información relativa a la frecuencia de coincidencias con secuencias homólogas ya descritas y similitud de secuencia del producto; aquellas con >100 empates consistentes se identificaron como secuencias funcionales, si la ocurrencia de empates se encontraba en el rango de los 50 a 100, entonces fueron identificados como secuencias codificadoras de proteínas de familia conservadas o proteínas hipotéticas conservadas y las que arrojaron valores menores, se clasificaron como secuencias hipotéticas. Asimismo, el estudio reveló que de los 62 genes que codifican por las proteínas de superficie, son más abundantes para dos familias *msp1* y *msp2*,

abarcando a 49 de ellos, por lo que se les ha llegado a considerar como superfamilias. Diversas enzimas fueron identificadas para distintas vías metabólicas, como glicólisis, síntesis de ácidos grasos o la biosíntesis *de novo* para las purinas y pirimidinas; sin embargo, las asociadas a la síntesis de aminoácidos fueron escasas o incompletas, propiciando más evidencias del proceso de evolución reductiva (24, 25) derivada de su prolongada condición como parásito intracelular. *A. marginale* es un microorganismo sin forma definida. Se han establecido tres categorías de acuerdo con su talla dentro del eritrocito: el clásico cuerpo de inclusión (CI), una forma intermedia o cuerpo inicial y la de tamaño pequeño conocido como cuerpo poliédrico (26).

III. El proceso de infección por *Anaplasma marginale*

Esta especie de rickettsia presenta particularmente múltiples variantes en sus mecanismos de transmisión; por ejemplo, sus vectores pueden ser garrapatas, moscas o mosquitos, sin olvidar las prácticas iatrogénicas por parte del personal que maneja al ganado (27).

El estudio de su transmisión es fundamental para establecer un control efectivo de la enfermedad, esta bacteria requiere de vectores biológicos o mecánicos y la existencia de animales susceptibles (28). La transmisión por artrópodos hematófagos, como garrapatas (29) de los géneros *Boophilus* spp y *Dermacentor* spp (30-32), moscas de establo como *Stomoxys calcitrans* (29), mosquitos de los géneros *Siphona* spp y *Psophora* spp y por tábanos, *Tabanus* spp (33). La vía mecánica sucede cuando se introducen directamente los eritrocitos infectados, sea por inoculación natural a través de picaduras de artrópodos hematófagos parasitados o artificialmente con objetos punzantes contaminados (34). La vía vertical de tipo placenta-feto es factible cuando la madre sufre anaplasmosis aguda (35).

A diferencia de los pequeños cuerpos de inclusión que contienen de cuatro a seis rickettsias en los eritrocitos bovinos, en las garrapatas naturalmente infectadas se observan grandes colonias que contienen muchos organismos. El ciclo de desarrollo del microorganismo comienza en las células del intestino medio con la subsiguiente infección de las células musculares del intestino. El desarrollo final ocurre en las glándulas salivales, desde donde se transmite al portador vertebrado. En cada sitio de de-

sarrollo en la garrapata, *A. marginale* se multiplica dentro de inclusiones unidas a las membranas, que han sido denominadas como colonias. Cada ciclo involucra dos estadios: una forma reticulada o vegetativa y la forma densa infectiva.

La primera se divide por fisión binaria, se observa primero dentro de las colonias, que posteriormente se condensan para dar lugar al estado electrodenso capaz de sobrevivir fuera de las células e infectar a otras (36). Aparentemente no todas las cepas de *A. marginale* infectan a las garrapatas (37-39). Diversos factores no identificados influyen en la transmisión y desarrollo de este patógeno en las garrapatas, por ello es necesario conocerlos para facilitar el mejoramiento de estrategias para el control de la enfermedad (40).

La transmisión del microorganismo mediante diferentes especies de garrapata puede ocurrir de forma intraestadial y transestadial (30, 32, 41). Además puede ocurrir del estado de larva a adulto sin reexposición en el estadio de ninfa y por adultos machos que se transfieren del ganado infectado a otro susceptible. Con la cepa Virginia se ha demostrado que *A. marginale* conserva las propiedades de sus proteínas de superficie, sea que provenga de cultivos celulares de la garrapata *Ixodes scapularis* (estirpe IDE 8), de un bovino o de glándula salival de garrapata (42).

En cuanto a la persistencia de la rickettsia en sus portadores bovinos, se debe considerar el papel relevante de las principales proteínas de superficie (MSP, por sus siglas en inglés) formando los complejos MSP1 y MSP2, ubicadas en las membranas de los cuerpos iniciales, pues su caracterización ha sido vital para conocer su responsabilidad en el mecanismo de adhesión a la célula portadora. Se ha demostrado que tanto MSP1a como MSP1b son adhesinas para los eritrocitos de bovino (43, 44), lo que facilita su invasión; sin embargo, MSP1b no tiene la misma función en células de garrapata. El ganado inmunizado con células de *I. scapularis* (estirpe IDE 8) infectadas con *A. marginale* tiene mayor preferencia para reconocer a MSP1b, mientras, que el inmunizado con eritrocitos infectados con *A. marginale* tiene preferencia de reconocimiento para MSP1a (45). Asimismo, MSP2 sufre variación antigénica y selección en el portador bovino, y sería responsable de la infección persistente en animales susceptibles, ante el eventual escape a la acción del sistema inmune (46). Esta variabilidad ha orientado a algunos investigadores a postular que la inmunoprofilaxis en

lo futuro deberá sustentarse en vacunas regionales (47), aunque sin descartar la virulencia de los propios aislados (48). Todo el ganado bovino es potencialmente susceptible a la infección, aunque ciertas razas desarrollan resistencia a las garrapatas, e inducen decremento en la transmisión. Los portadores crónicos asintomáticos y otros animales resistentes son responsables también de preservar el agente etiológico en la naturaleza (49). En este contexto, se han descrito infecciones subclínicas en búfalos de agua, ovinos y caprinos (11). En bisontes se observó parasitemia moderada con respuesta a anticuerpos específicos, demostrándose la secuencia de infección bovino-bisonte-bovino (12). La rickettsia se detectó en la sangre de alces (*Cervus elaphus*) infectados, pero no se notaron signos clínicos de la enfermedad (39). Éstos resultan susceptibles a la infección con *A. marginale* y *A. ovis* y su sangre, infectada con ambos hemoparásitos, es infectiva para bovinos y chivos susceptibles, por lo que lo constituyen un reservorio (39).

IV. Cultivo de *Anaplasma marginale* en eritrocitos de bovino

En 1978, Davis *et al.* cultivaron *A. marginale* con eritrocitos de bovino con la finalidad de describir algunas técnicas para el análisis de las características de crecimiento y requerimientos de este microorganismo (50). Primeramente colectaron sangre de becerros con valores de eritrocitos infectados (ei) del 30% al 60%, los eritrocitos fueron lavados con solución salina balanceada de Hank. Se empleó suspensión de cultivo al 25% (v/v) sembrando en tres medios de cultivo químicamente definidos: HAM F-12, RPMI 1640, considerado el mejor porque proporcionó las características óptimas para el mantenimiento de la viabilidad del cultivo y medio extraminoácidos, en el cual las células comenzaron a mostrar signos de lisis a partir del día dos de iniciado el cultivo. Todos los medios fueron complementados con 15% de suero bovino fetal (SBF) y 200 mM de glutamina, sin antibióticos. Se distribuyeron en cajas Petri de 60 mm de diámetro con 4 mL de suspensión cada una, e incubándose en una atmósfera con 5% de CO₂ en aire o con 7% CO₂, 83% N₂ y 10% O₂, a 37°C durante un periodo de 1 a 5 días. Los cultivos se mantuvieron en agitación a 9 ci-

culos/min, el cambio de medio era gradual, agregando 1.0 mL de medio fresco por cada mL de medio gastado. En algunos cultivos al día 2 o 4 se adicionó 25% de eritrocitos sanos frescos, así, cuando no se agregaron eritrocitos sanos el número de cuerpos marginales se mantuvo o redujo ligeramente, empero, la tendencia de reducción pronunciada continuó con el medio extraaminoácidos. El seguimiento durante la duración del experimento se realizó con frotis teñidos con colorante de Wright, con este método observaron que la pérdida de cuerpos marginales coincidía con el incremento de *Anaplasma* libre en el medio de cultivo. Algunos cultivos se incubaron con ³H-Timidina o ¹⁴S-Metionina para medir la incorporación metabólica de éstos, por parte de *A. marginale*. El pico de radiactividad fue al primer día, disminuyendo gradualmente a partir del día tres; cuando se adicionaron eritrocitos sanos, se observó un repunte en la actividad metabólica. Para la recuperación de *A. marginale* cultivado, la metodología de lisis de los eritrocitos infectados se reportó como óptima. Con los inóculos provenientes del medio RPMI-1640, becerros esplenectomizados fueron infectados. Estos animales desarrollaron un cuadro clínico típico de anaplasmosis (50). Kessler *et al.* utilizaron la estrategia para el cultivo de *Plasmodium* spp (51), con algunas modificaciones: los eritrocitos infectados provenientes de un portador se suspendieron 1:8 en medio RPMI-1640 con 25 mM HEPES (N-2-hidroxiethyl piperazina-N'-2-ácido etanelsulfónico) y 10% de suero bovino adulto (SBA). Posteriormente esta suspensión se distribuyó en cajas Petri de 35 mm de diámetro con 1.5 mL de volumen cada una, la incubación fue a 38°C en atmósfera microaerofílica de 5% de CO₂ en aire y se cambió el medio diariamente. Los subcultivos se efectuaron por centrifugación del cultivo primario resuspendiendo las células en medio fresco. El ganado inoculado se observó tres veces a la semana al través de la temperatura rectal, la medición del volumen celular aglomerado (VCA) por el método del microhematocrito y la rickettsemia, expresada en valores del % de ei. En el experimento inicial se comenzó la siembra con 5% de ei obtenidos de una vaca de la raza Jersey, los subcultivos se efectuaron durante los días 4 y 8, este porcentaje se incrementó a 16.6 % durante los primeros ocho días, reduciéndose hasta 3% después de 18 días de cultivo, este primer experimento sirvió para proporcionar material biológico empleado en el siguiente ensayo; en el segundo experimento después de 13 días en cultivo se tomaron 9 mL del subcultivo 2

del experimento inicial y se inoculó a una vaca adulta de la raza Holstein-Friesian, una vez que en el bovino se alcanzó 2 % de rickettsemia se tomó una muestra de sangre para cultivarse nuevamente, esta vaca desarrolló anaplasmosis al día 13 post-inoculación (pi) y los cuerpos de inclusión fueron visibles al día 20 pi; para el tercer experimento se tomaron 2.5 mL de material del experimento anterior y se inocularon a un becerro de la raza Aberdeen Angus esplenectomizado, cuando la rickettsemia llegó al 4.6% se tomó sangre del becerro para cultivarla *in vitro*. También este bovino desarrolló la enfermedad. En esta serie de experimentos se valoró el efecto del paso de *Anaplasma* a través de las condiciones *in vivo* e *in vitro*, lo cual aparentemente no influyó en su comportamiento durante el cultivo, pues las fluctuaciones que presentó no fueron significativas y en condiciones naturales en las células hospederas típicas preservó sus características patológicas (52).

En ese mismo año, otro estudio de Kessler y Ristic determinó la interacción de *Anaplasma* con eritrocitos de ovino y bovino durante 42 días. El organismo mostró un periodo inicial de rápido crecimiento seguido de un gradual descenso en el porcentaje de ei. Para iniciar con los cultivos se obtuvo sangre infectada de un ovino esplenectomizado infectado con un aislado atenuado de *A. marginale*, las condiciones de cultivo fueron las mismas mencionadas en los experimentos anteriores, excepto por el porcentaje de ei utilizado, que en esta ocasión fue del 9%, así como el tiempo en los cambios de medio, que fueron cada cuatro días. En el primer ensayo, eritrocitos de ovino normales se combinaron con eritrocitos de ovino infectados a razón de 1:2 (v/v). El porcentaje de ei se incrementó durante las primeras 24 horas, decreciendo cíclicamente. En el segundo ensayo la combinación se realizó entre eritrocitos de ovino infectados y eritrocitos de bovino sanos, a la misma razón. En este caso, el porcentaje de ei tuvo un comportamiento similar al primer ensayo, no se encontraron diferencias estadísticas. El agente atenuado fue capaz de infectar a las células independientemente de la especie (53).

Más tarde, Mazzola y Kuttler infectaron eritrocitos de bovino con *A. marginale* también en condiciones microaerofílicas, a 37°C, utilizando medio RPMI-1640 adicionado con 10% de SBF y como soporte emplearon cajas Petri de 60 mm de diámetro, con 2 mL de medio de cultivo. El cambio de medio se realizó diariamente durante los primeros siete días, y poste-

riormente a intervalos de tres o cuatro días. Para determinar el porcentaje de infección realizaron frotis de los cultivos en suspensión y los tiñeron con colorante de Giemsa. Asimismo, a todos los animales infectados se les tomaba una muestra para la observación microscópica del frotis sanguíneo teñido con Giemsa, el VCA y el título de anticuerpos mediante las pruebas de fijación del complemento y aglutinación en tarjeta para anaplasmosis. Estos investigadores mantuvieron tres grupos de 20 cultivos cada uno; el grupo 1 tenía 1.4% de ei, al cabo de 16 días se tomaron 30 mL de cultivo y se inocularon a becerros susceptibles, el número de *Anaplasma* en cultivo se incrementó 4.5 veces a los tres días, los animales inoculados desarrollaron la infección a los 30 días pi; el grupo 2 se conservó durante 42 días, el valor de ei inicial fue del 3.5%, a los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42, por cada día becerros susceptibles fueron inoculados vía intravenosa con 5 mL de cultivo; para este caso, el número de la rickettsia en cultivo se incrementó 3.3 veces al día 11 y los becerros inoculados demostraron la enfermedad a los días 28 y 36 pi. En tanto, el grupo 3 fungió como testigo, mantenido en solución de Alsever durante 14 días, con 3.5% inicial de ei, al día 7 y 14 se inocularon con 15 ml de cultivo por cada día a becerros susceptibles, en este grupo el número inicial de *Anaplasma* se mantuvo durante todo el experimento, de la misma manera, el ganado infectado no presentó signos clínicos de anaplasmosis (54).

Diez años más tarde, en 1990, Orozco (55) evaluó el comportamiento de la rickettsia *in vitro*, para ello, manipuló la cepa Texcoco previamente criopreservada durante dos años e inoculada a un bovino convaleciente, al día 23 pi presentó 0.39% de parasitemia con 8% de VCA. Durante la realización de este primer ensayo se analizaron los efectos de diversos tipos de atmósfera, medios de cultivo, volumen de medio de cultivo. En los ensayos posteriores se utilizó la cepa Tizimín, ajustando a 5% la concentración inicial de ei, evaluando la concentración (%) y procedencia del SBA y sales amortiguadoras, además de la adición de un precursor de ácidos nucleicos, cambio de medio y realización de subcultivos a distintos intervalos. A manera de resumen, el cuadro 2, menciona las condiciones ensayadas.

CUADRO 2

Factores ensayados en cultivos estacionarios microaerofilicos de suspensiones de eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale* cepas "Texcoco" o "Tizimín", incubados a 37 °C en microplaca

Factor	Tratamientos			
Medio de cultivo	I) M-199	II) MEM	III) RPMI-1640	
Cantidad del medio	I) 100 µl	II) 200 µl		
Sal amortiguadora	I) ACES	II) BES	III) HEPES	IV) TES
Adición de precursores	Ácido orótico			
% de Suero*	I) 5 %	II) 10 %	III) 20 %	IV) 40 %
Suspensión (v/v)**	I) 5 %	II) 10 %	III) 20 %	IV) 40 %
Atmósfera	I) 93 %N ₂ , 5 % CO ₂ ; 2 %O ₂	II) 90 % N ₂ , 5 % CO ₂ ; 5 %O ₂	III) 5 % CO ₂ en aire	
Frecuencia en cambio del medio	I) 24 horas	II) 48 a 72 hrs	III) 168 horas	
Intervalo del subcultivo	4 días	8 días	16 días	32 días
Alimentación del Bovino donador	I) Concentrado	II) Forraje		

* Suero de Bovino Adulto

** 5% Eritrocitos infectados

Elaborado a partir de: Orozco, 1990 (53)

Este amplio estudio consistió en siete fases, en la primera las constantes del cultivo fueron: complementación con SBA al 40%, la adición de HEPES 25 mM, con pH de 6.8 ± 0.05 en el medio de cultivo y una suspensión al 10% con 0.39 % ei; como soporte se emplearon placas de 24 pozos con 16 mm de diámetro con cambio diario del medio de cultivo. Las variables fueron los medios de cultivo, la cantidad de medio y las atmósferas de incubación. La evaluación de los cultivos duró 24 días. En todas las interacciones (medio, cantidad y atmósfera) hubo fluctuaciones, empero, en MEM las fluctuaciones decrecieron hasta llegar a cero el día 16; los rendimientos en M-199 fueron superados por RPMI-1640, medio en el cual la viabilidad

de *Anaplasma* se hizo evidente, en los volúmenes de 200 μL y con las atmósferas compuestas por 2% O_2 , 5% CO_2 , 93% N_2 ; y 5% CO_2 en aire.

En la segunda fase se empleó RPMI-1640 adicionado con 25 mM HEPES, el pH y el porcentaje de ei fueron los mismos que en la fase anterior; las variantes fueron los porcentajes de suero bovino y las atmósferas mencionadas, así las mejores respuestas se observaron con la atmósfera de 5% CO_2 en aire y la complementación del medio de cultivo con 40% de SBA.

Para la tercera fase nuevamente se utilizó RPMI 1640 con atmósfera de 5% de CO_2 y 200 μL de medio de cultivo, las variables analizadas fueron las sales amortiguadoras: ACES (N-2 acetamido ácido aminoetanesulfónico), BES (N-N- bis/2 hidroxietil/2-ácido etanelsulfónico), HEPES y TES (N-tris/hidroximetil/N'-2-ácido etanolsulfónico). La respuesta biológica más satisfactoria se dio con la sal HEPES, en tanto con ASES TES y BES los porcentajes de ei fueron menores a 0.05%.

En la cuarta fase se estudió el efecto del cambio de medio a distintos intervalos, el resto de las condiciones fueron las mismas que en la tercera fase, adicionando además 25 mM HEPES, la duración de esta fase fue de 16 días, al día cuatro no se observaron a las bacterias en aquellos cultivos con cambios cada tercer y cada ocho días, en los cultivos con cambio diario se detectó al *Anaplasma* hasta el día 12. De esta manera, una vez establecidas las condiciones generales óptimas para el cultivo, en esta fase se analizó el uso de distintas concentraciones de ei para iniciar el cultivo, al término de 24 días se determinó que las caídas menos drásticas en el porcentaje de ei fue con la concentración inicial de 20%.

En la quinta fase se estudió la posible diferencia entre el SBA de animales con hábitos alimentarios diferentes, al mismo tiempo se evaluó el efecto de la adición de 0.75 mM de un precursor de ácidos nucleicos, concluidos los 24 días de duración del cultivo se estableció que los mejores rendimientos se realizaron con la adición de ácido orótico y el SBA del animal alimentado con concentrado.

Finalmente, el último ensayo consistió en apreciar las diferencias entre los cultivos sometidos a tiempos de subcultivo variado, el cultivo se inició con un donador con 1.87% de rickettsemia y se aplicaron todas las condiciones previamente establecidas a lo largo de las fases del experimento, los subcultivos se hicieron a razón de 1:2. Los porcentajes de ei fueron mayores en los subcultivos más espaciados; en subcultivos tempranos el

porcentaje disminuyó gradualmente conforme se incrementaba el número de subcultivos. A manera de conclusión, después de todos los ensayos se determinó que la suspensión de eritrocitos al 20% de infección en medio RPMI-1640 complementado con 25 mM de HEPES, ácido orótico y 40% de SBA de animales alimentados con concentrado, con cambios de medio diarios y subcultivos espaciados incubada con atmósfera de 5% CO₂, proporcionan las mejores condiciones de mantenimiento para los cultivos.

Para determinar la infectividad *in vivo* se tomaron 1.5 mL de cultivo de 36 días con 0.8% de ei y se inoculó un bovino esplenectomizado de tres años de edad raza Holstein Frieisan; sin embargo, no hubo evidencia de signos de anaplasmosis, tampoco se logró demostrar a la bacteria durante los 32 días de la observación clínica al observar frotis teñidos con Giemsa del bovino inoculado (55).

Blouin *et al.* utilizaron la cepa Virginia de *A. marginale* para inocularla en un sustrato de eritrocitos sanos, no infectados; primeramente inyectaron a un becerro esplenectomizado con dicha cepa, al alcanzar 2% de rickettsemia se le depositaron adultos machos de *Dermacentor andersoni*, que fueron alimentados por este becerro durante siete días, a continuación se inoculó un cultivo previamente establecido de eritrocitos de bovino susceptible suspendidos en RPMI 1640 con 25 mM HEPES, L-glutamina y 20% de SBF a la proporción de 1:8, en placas con pozos de 35 mm de diámetro con 3.0 mL de volumen, a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ en aire y con cambios de medio diariamente. En los eritrocitos se observó la rickettsia a partir de los 30 min pi, con formación de vacuolas a partir de las membranas del eritrocito, conservándose hasta el día 6 sin evidencia de división (56).

Recientemente, Castañeda *et al.*, en 2006 (57), valoraron el crecimiento y viabilidad de esta rickettsia, a través de dos ensayos. Los aislados mexicanos elegidos fueron procedentes de casos clínicos, uno de Morelos y otro de Aguascalientes, y multiplicados en becerros esplenectomizados. A lo largo de los ensayos se establecieron las constantes de incubación que fueron temperatura de 37°C y cambio de medio cada 48 horas.

En el primer ensayo, se obtuvo la sangre infectada del bovino donador; el porcentaje de ei inicial fue de 46.5%, alcanzado después de varios pasos de lavado por centrifugación con solución de Vega y Martínez (VYM) (58). La variante estudiada en el cultivo fue la altura proporcionada de me-

dio de cultivo a 3, 4 y 5 mm, por una suspensión al 5% (v/v) de eritrocitos infectados con medio F-12 y 5% de SBF, en placas con pozos de 35 mm de diámetro, en atmósfera microaerofílica. Los cuerpos de inclusión se observaron con tinción de Giemsa a partir del día 1 hasta el 31, con el pico de infección al día 14 con valor de 43.30% ei y declinando posteriormente; asimismo, los mayores rendimientos promedio se obtuvieron en la altura de 5 mm de medio proporcionada.

El segundo ensayo se inició con 14.99% de ei, a partir de sangre colectada del donador a los 30 días pi. Para la siembra se aplicaron 5 mm de altura de medio de cultivo en placas con 24 pozos de 16 mm de diámetro con suspensión inicial de 10% de ei en diferentes medios: F-12, M-199 y RPMI 1640 con 10% de SBF. Además del efecto del medio de cultivo se evaluó el efecto de dos diferentes atmósferas: la de 5% de CO₂ en aire del primer ensayo y otra compuesta de 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂. Periódicamente se tomaron muestras para frotis que se tiñeron con colorante de Giemsa y para la tinción vital con acetato de carboxi-metil-rodamina (CMRA) para observarse con el microscopio de luz blanca y de epifluorescencia, respectivamente. La morfología observada a lo largo de este estudio coincidió con el tradicional cuerpo de inclusión sencillo o doble, localizado mayoritariamente en la periferia del eritrocito. Los mayores valores de ei se observaron en los cultivos en la atmósfera I (5% de CO₂ en aire), en tanto que en los de la atmósfera II (5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂), los valores de ei disminuyeron aceleradamente, aunado a la presencia hemólisis. Las tinciones con CMRA realizadas desde el inicio del cultivo hasta el día 9 mostraron formas infectivas clásicas fluorescentes, indicativas de la viabilidad de *A. marginale*, con uno a tres CI en la periferia del eritrocito en todos los casos, sin diferenciar entre medios de cultivo o condiciones de atmósfera. Hacia los días 15 a 20 se empezaron a observar diferencias en la cantidad de CI por célula, algunas rickettsias manifestaban formas y tamaños diferentes a la clásica, también la intensidad de luminosidad se redujo. Otro aspecto interesante fue la presencia de formas extracelulares de *Anaplasma*. Para los días 21 a 26 se incrementó el número de bacterias fuera de los eritrocitos, aumentando las formas atípicas y disminuyendo el número de CI por célula. Los autores de este trabajo argumentan acerca de la ventaja del uso de colorantes que permiten la visualización de microorganismos vivos, sobre aquellos colorantes que no determinan viabilidad (57).

Para 1997, Waghela *et al.* (59) emplearon un sistema de co-cultivo de eritrocitos con células endoteliales de arteria pulmonar de bovino previamente caracterizada. Los becerros donadores se inocularon con 1×10^9 ei del aislado Texas de *A. marginale*.

Para el primer experimento, al día 25 pi se tomó sangre de los donadores, los cuales contaban con 24% de rickettsemia, se lavó la sangre y los eritrocitos se mantuvieron en solución salina de Puck con 2% de glucosa y antimicrobianos, al momento de su uso se enjuagaron en solución salina de Hank. Los medios de cultivo ensayados fueron RPMI 1640 con 25 mM de HEPES, MEM según la fórmula de Glasgow (G-MEM) y Leibovitz L-15 con 20 mM de TES, 2 mM de $MgCl_2$, 25 mM de glucosa, 5 mM de adenosina y 5 mM de inosina; todos adicionados con 0.02% de $NaHCO_3$, 10% de caldo triptosa-fosfato (CTF), 2 mM de L-glutamina, 100 UI de penicilina (P), 100 μg de estreptomycin (E), 25 μg de anfotericina B (AB) y 20% de SBF. Como contenedores se emplearon placas de 24 pozos con 1.5 mL de medio de cultivo, la incubación fue a 37°C en atmósfera de 5% de CO_2 . En el décimo pase las células fueron inoculadas y diariamente se removió 1.0 mL de medio gastado y se sustituyó con medio fresco, al mismo tiempo se tomaron muestras para realizar la tinción de Giemsa, semanalmente se adicionaron a cada pozo 25 μL de eritrocitos provenientes de novillos sanos, no infectados. Los subcultivos se realizaron con el material resuspendido, transfiriendo a un nuevo pozo con eritrocitos sin infectar. Periódicamente se tomaron 5 μL del sedimento de eritrocitos y se prepararon para microscopía electrónica, a la par otra técnica de detección aplicada fue la hibridación, para lo cual se tomaron 100 μL de muestra. Como resultado, en la primera semana el mejor rendimiento se logró con el medio G-MEM, aunque a las 2.5 semanas el rendimiento fue muy similar en todos los medios. El porcentaje de infección se mantuvo durante 16 semanas. La infección se diseminó al endotelio, en ausencia de las células endoteliales se observaron cuerpos iniciales degenerados, a los 30 días pi.

En un segundo experimento se tomaron muestras de donadores con 21% de rickettsemia, empleando el medio G-MEM y una dosis de 1.56×10^2 ei por pozo, el propósito de este ensayo fue valorar el impacto de una diferente dosis de ei respecto del primer experimento.

Un tercer experimento tuvo como objetivo evaluar dos factores: el rendimiento de los subcultivos a dos tiempos distintos y el movimiento de

los cultivos en suspensión, se inició con un porcentaje de parasitemia de 23 puntos y se sembró a dosis de 3.12×10^9 ei en G-MEM con cambios de medio diarios y graduales de 1.0 mL, el cultivo se mantuvo en movimiento durante una hora a 250 rpm, todos los subcultivos fueron preparados con diluciones con eritrocitos sanos 1:3, a la primera y sexta semanas de incubación. Asiduamente se prepararon muestras para microscopía electrónica e hibridación. Los autores concluyen, después de dar seguimiento durante 16 semanas los cultivos, que *A. marginale* puede crecer en un sistema de cultivo continuo por un número limitado de pases, los factores como lapso entre pases, concentración inicial de ei y condiciones de movimiento o estacionarias no influyen directamente en el crecimiento de esta rickettsia (59).

V. Cultivo de *Anaplasma marginale* en células de artrópodo

En 1976 se informa de la supervivencia de la rickettsia (60), en células de mosquito *Aedes albopictus* suspendidas en medio de cultivo para mosquitos, enriquecido con SBF, derivado de la fagocitosis de eritrocitos infectados, en los que la presencia de la rickettsia es revelada por tinción con el colorante de Giemsa; en un segundo estudio por los mismos autores (61), se logra mantener a la rickettsia durante 60 días, según observaciones mediante microscopio electrónico; sin embargo, estos mismos autores concluyen que aún cuando la ultraestructura e identidad de *A. marginale* es fácilmente determinada, no se aporta evidencia en cuanto a que los organismos se hayan multiplicado o se encuentren viables.

Entre los primeros ensayos para multiplicar la rickettsia *A. marginale* en cultivos de células de garrapata, se encuentran los de Samish *et al.*, en 1988 (26), utilizando la línea celular RML 15 de *D. variabilis*, en confluencia al momento de la infección e incubada en atmósferas de 2.5% o 5% de CO₂ en aire, a 28°C y en placas de 12 pozos con 21 mm de diámetro o matraces de 25 cm² de superficie. Inicialmente, a partir de becerros esplenectomizados previamente infectados con la cepa TA de *A. marginale*, se prepararon suspensiones de eritrocitos infectados entre 9% y 11% rickettsemia en medio Leibovitz L-15 adicionado con MEM y sales de Hank,

enriquecido con 1-prolina (0.1 mg/mL) y 25 mM HEPES; estas suspensiones fueron mezcladas a diferentes densidades, 1×10^5 , 1×10^4 y 1×10^3 eritrocitos por mm^2 , en monoestratos de la línea celular. El día de la siembra se añadió 20% SBF al medio y 24 horas más tarde, el medio sobrenadante fue reemplazado con una mezcla que contenía sólo 5% SBF; cambios de medio se efectuaron una o dos veces a la semana.

Periódicamente se tomaron muestras que fueron depositadas en tubos de Leighton conteniendo cubreobjetos en cuya superficie se dejó sedimentar la muestra y pasadas 24 horas, recolectados para ser coloreados con tinción de Giemsa. Sus observaciones concluyen que la actividad fagocítica se alcanza a las dos horas de iniciado el cultivo, pero cuando la densidad de siembra fue de 1×10^3 ei, se alcanza 100% de fagocitosis al día uno; sin embargo al día cuatro pi todos los eritrocitos han sido lisados dentro de las células, para el día 10 se observan < 4 partículas parecidas a *Anaplasma* en las células infectadas y que se incrementan para el día 14, detectándose hasta ocho partículas en cada célula infectada, logrando observarse en números considerablemente mayores dentro del citoplasma en el día 20 pi. La identidad de las partículas fue determinada con colorante de Giemsa y verificada mediante ensayos de inmunofluorescencia.

Para 1989, Hidalgo *et al.* (62) dieron a conocer que *A. marginale* fue propagada en una línea celular derivada de embriones de la garrapata *D. variabilis* y que el desarrollo de la rickettsia fue vigilado empleando la microscopía electrónica de transmisión, mientras que su identidad se verificó con el apoyo de la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales. La línea celular embrionaria fue infectada empleando alguno de los siguientes procedimientos; el primero, a partir de porciones del intestino medio de garrapatas adultas que se diseccionaron entre 5 y 10 días después de haber sido alimentadas y de desprenderse de un becerro previamente infectado con el aislado Mississippi de *A. marginale*. El segundo a partir de porciones del intestino de ninfas que también se diseccionaron entre 5 y 10 días después de haber sido desprendidas de un becerro previamente infectado con el aislado Virginia de *A. marginale* y el tercero empleando intestinos de garrapatas adultas infectadas durante su estadio de ninfas con el aislado Virginia de *A. marginale*. Los cultivos se incubaron a 28 o 37 °C y los pases o subcultivos realizados a intervalos de siete a diez días. Los primeros cultivos positivos se encontraron a cua-

tro días pi, con valores de entre 2% y 5% de células infectadas, alcanzado valores mayores a los siete o diez días. La morfología del *A. marginale* fue muy similar a la observada en los CI marginales en eritrocitos infectados, con estructuras circundadas por una triple membrana y repleta de microorganismos. Con el tiempo se observaron microcolonias características de la infección en células del intestino de garrapatas naturalmente infectadas (63). Aparentemente no se observó ningún efecto citopático para las células y conforme se hacían los pases, se observaba el incremento en las células embrionarias de la garrapata, así como en el número de células infectadas, los cuales se vieron más favorecidos cuando la temperatura de incubación era de 28°C. Empleando cualquiera de los tres procedimientos, se obtuvieron cultivos continuos de *A. marginale*; con el primero, por una duración de 11 meses y 22 pases, y al momento del informe en el segundo y tercero, llevaban 18 pases durante un periodo de nueve meses. Sin embargo, en ningún caso se hicieron intentos para verificar si la rickettsia era infectiva para el portador bovino.

Munderloh *et al.*, en 1996 (64), intentan cultivar a la rickettsia *A. marginale* en el laboratorio, utilizando cuatro líneas celulares derivadas de garrapatas; tres de ellas: *Rhipicephalus appendiculatus*, *D. variabilis* y *D. albipictus*, reconocidas como vectores biológicos transmisores y una derivada de *I. scapularis*, reconocida como no transmisora; pero, sorprendentemente, sólo la línea IDE8 (65), cuyo origen es *I. scapularis*, resulta exitosa, atribuyéndoselo a su capacidad fagocítica. Se utilizó la cepa Virginia de *A. marginale* después de haber sido pasada cinco veces en becerros y que había demostrado ser capaz de transmitirse por garrapatas (66, 67), previamente criopreservada con DMSO al 10% en N₂ líquido. Una vez descongelada, se puso en contacto, con monoestratos de la línea celular en confluencia en matraces de cultivo de 25 cm² de superficie, en volúmenes de 2 µL por mm² e incubados a 34°C durante toda la noche. El medio de cultivo utilizado fue L-15B, suplementado con 5% SBF inactivado, 10% CTF y 0.1% de lipoproteína bovina concentrada y enriquecido con 0.25% NaHCO₃ y 10 mM del ácido 3-(*N*-Morpholino) propano-sulfónico (MOPS), como sal amortiguadora.

Para favorecer la interacción entre la rickettsia y las células de garrapatas, a los cultivos de una noche se les añadieron más células frescas y la mezcla se centrifugó a 2000 xg durante 60 minutos, resuspendiendo

el sedimento en el medio enriquecido e incubándose nuevamente en matrices de cultivo de 25 cm² de superficie, haciendo el cambio de medio una vez por semana y los cultivos vigilados periódicamente, para observación al microscopio de las células teñidas con el colorante de Giemsa. Con esta metodología, *A marginale* fue capaz de invadir las células y multiplicarse hasta producir colonias contenidas dentro de una vacuola envuelta en una membrana. La primera identificación positiva se realizó al día 34 pi del cultivo, alcanzando a infectar aparentemente al 30% del estrato sin provocar ningún efecto citopático. Durante los primeros cinco meses del cultivo, el crecimiento fue muy lento, mientras la rickettsia lograba adaptarse a las células portadoras, alcanzando hasta 60% de infección, realizando diluciones 1:2 o 1:3 (v/v) de la suspensión celular en medio de cultivo fresco. Durante el periodo de adaptación, el realizar subcultivos añadiendo nuevas células IDE8 no infectadas no pareció acelerar el proceso. Una vez adaptada la rickettsia al cultivo, se pudieron realizar subcultivos con suspensiones de células no infectadas en diluciones desde 1:3 hasta en 1:20; en este último caso, obteniendo 100% de infección en las células de garrapata a los 21 días después del pase, llegando a notarse el efecto citopático en las células altamente infectadas. El cultivo se logró mantener de forma continua por un periodo de 16 meses con 14 pases intermedios. *Anaplasma marginale* en células de garrapata *I. scapularis*, (línea IDE8) fue diferente morfológicamente, de la descrita para células de garrapata o de ganado bovino, tradicionales. Inicialmente aparecieron con características pleomórficas dentro de endosomas poco definidos y conforme se adaptaban mejor a las condiciones *in vitro*, se observaban más claramente las vacuolas parasitóforas con mayor cantidad de cuerpos cocoides electrodensos. De manera semejante, las formas reticulares típicas descritas para tejidos de garrapata, fueron evidentes hasta después de cinco meses en cultivo y más fácilmente distinguibles de los fagolisosomas. Células altamente infectadas terminan por desintegrarse, liberando en el medio los microorganismos. La identidad de la rickettsia fue confirmada cuando los cultivos se encontraban en los pases 2 y 4 (con 5 y 9.5 meses de antigüedad, respectivamente), se inocularon en forma individual por vía endovenosa en becerros Hereford esplenectomizados. Éstos padecieron la infección con evidentes signos de anaplasmosis entre dos a cuatro semanas pi, incluyendo anemia severa. Igualmente, garrapatas *D. andersoni*, alimentadas

en uno de los becerros, también fueron capaces de transmitir la infección a otro becerro susceptible.

VI. Cultivo de *Anaplasma marginale* en otro tipo de células

Hidalgo (68, 69) propagó a la rickettsia en cultivos de células de ganglios linfáticos de bovino. La sangre de los donadores se colectó cuando el porcentaje de parasitemia fue de 85 puntos y los ei se mantuvieron en nitrógeno líquido con 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) en solución Hank. Para la inoculación los ei se descongelaron a 37°C y se resuspendieron en medio de cultivo MEM a razón de 1:60, el cual se complementó con 10% de SBF +P+E y vitamina B₁₂. Los monoestratos de células de ganglios linfáticos se conservaron en contenedores de 75 cm² de superficie en incubación estática a 37°C. Las técnicas para la demostración del microorganismo consistieron en la fijación de células para tinciones de Giemsa y naranja de acridina, así como para inmunofluorescencia directa. Durante 120 horas se dio seguimiento a este experimento, los valores de la rickettsia tuvieron un incremento exponencial durante las primeras 24 horas, disminuyendo en las 48 horas posteriores, alcanzando los mayores rendimientos a las 17.1 horas de iniciado el cultivo. Usando este material igualmente, Hidalgo estudió el efecto de la adición de oxitetraciclina en el desarrollo de *A. marginale*, encontrando que este fármaco influye rápida y negativamente en el número de bacterias en cultivo desde las primeras 12 horas, manteniéndose su efecto hasta las 120 horas. Este autor cita a Marble y Hanks (70), quienes en 1971 informaron de la propagación de *A. marginale* durante 20 semanas en médula ósea de conejo suspendida en medio M-199 adicionado con 5% de suero ovino, con subcultivos; sin embargo, no se evidenció la replicación del microorganismo ni tampoco la infectividad al ser inoculado en animales; el propio Hidalgo cita un experimento previo, realizado por él mismo en el cual intentó el cultivo continuo en esta misma estirpe celular, en el que el número de anaplasmas se redujo hasta llegar a cero al cabo de tres pases (68, 69).

En el trabajo de Hurska *et al* (71) (citado por Orozco, 1990), emplearon médula ósea, eritrocitos de bovino y células renales suspendidas en

medio M-199, adicionado con 10% de SBF, sin obtener evidencia de la multiplicación del microorganismo. Asimismo, el ensayo de Marble y Hanks en 1972 (72), (citado por Orozco, 1990) que tuvo una duración de ocho semanas, en él se trabajó con matriz ósea de conejo diluida en medio M-199 con 5% de SBF, vitamina B₁₂, bicarbonato de sodio y antibiótico, finalmente se obtuvo una concentración de 10⁶ células/mL que fueron incubadas a 37°C por 72 horas, la presencia de la bacteria se demostró durante 140 días sin evidencia de multiplicación. También reseña el experimento de Trueblood que en 1973 (73) intentó su multiplicación en ganglios linfáticos de bovino, empleando como medio M-199 suplementado con 3% SBF a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire; la sangre infectada para el cultivo se preservó en glicerina al 10% a -70°C. Al momento de su uso, se descongeló y se iniciaron tres modalidades de cultivo: la primera fue iniciar el cultivo e infectar a las 48 horas, la rickettsia se detectó en el sobrenadante desde el día 7 al 9 pi, este sobrenadante fue inoculado a bovinos susceptibles, los cuales se enfermaron al día 28 pi.

La segunda modalidad consistió en que los recipientes del cultivo se mantuvieron en agitación constante, y en la tercera se adicionaron antibióticos. En conclusión, los resultados obtenidos no variaron respecto de la primera modalidad. Otros investigadores (74-76) citados de igual forma por Orozco (55), intentaron el cultivo *in vitro* de esta bacteria; los dos primeros ocuparon monoestratos de células de: corazón, riñón, pulmón, médula ósea e hígado de bovinos sanos y enfermos de anaplasmosis, manteniéndolos hasta cuatro semanas sin lograr infectar a animales susceptibles; el segundo evaluó líneas celulares renales embrionarias, de piel, músculo, intestino, pulmón y riñón humano y fibroblastos de ratón en medio MEM con 10% de SBA, la infección fue evidente en el citoplasma de células renales a las 24 horas posinoculación; el tercero empleó médula ósea, ganglios linfáticos de bazo y timo de ganado sano e infectado, después de algunos pases se inocularon bovinos sin que presentaran signos del padecimiento.

A medida que se han incrementado los conocimientos de la biología de *A. marginale*, los intentos por establecer un cultivo *in vitro* continuaron, intentando preservar las características patógenas y antigénicas de la rickettsia, por lo que se hicieron más numerosos y complejos. Tomando en cuenta los resultados poco satisfactorios obtenidos en los

estudios con eritrocitos, y, ante la lejanía de los primeros ensayos en células nucleadas hechos en la década de 1970 en adelante, se inició el desarrollo de novedosas metodologías cada vez más sofisticadas; por ejemplo, Blouin *et al.*, en 1993 (77), demostraron la presencia de la rickettsia a lo largo de nueve semanas en células nucleadas de bovino. Para este estudio algunos becerros fueron inoculados con el aislado Virginia de *A. marginale*, posteriormente garrapatas macho de *D. andersoni* fueron alimentadas durante siete días en éstos, cuando los becerros alcanzaron una rickettsemia de entre 3% y 5 %, se removieron las garrapatas y se incubaron a 25°C durante cinco días, exponiéndose a un segundo periodo de alimentación de 12 días. Una vez removidas las garrapatas, se decontaminaron. Para la detección de la bacteria en las glándulas salivales se usó microscopía electrónica y de luz; al confirmarse la presencia de la rickettsia se realizaron disecciones de las glándulas salivales, para ser sumergidos diez pares de glándulas en 1.0 mL de medio de cultivo MEM, más adelante se centrifugaron y el sobrenadante fue inoculado a monoestratos de células de turbinadas y de aorta de bovino obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC). Cabe señalar que tres días antes de la inoculación se realizó el pase de estas células en contenedores de 5 cm² de superficie en medio G-MEM con 15% de suero de ternera, 5% de CTF y P + E con dosis de 100 UI y 100 µg/mL, respectivamente, con pH de 6.8 a 7 y volumen de medio de 2.0 mL. Los cultivos se mantuvieron en rotación a 80 rpm durante 30 min a 37 °C, después de dos horas el medio fue removido del monoestrato y reemplazado por medio fresco. Para el mantenimiento de los cultivos el cambio de medio fue cada tres días, reemplazando 2/3 partes del medio viejo y sustituyendo con medio fresco. A las dos o cuatro semanas se realizó el subcultivo 1:3 (v/v). Se observaron cuerpos de inclusión mediante la tinción de Wright y se prepararon muestras para microscopía electrónica y para hibridación de ADN, en la cual se utilizó 10% del cultivo de las células turbinadas y 15% en el caso de células endoteliales. Para esta última técnica se usó un fragmento de 965pb del gen *msp1β*. En los resultados, morfológicamente se identificó al *Anaplasma*, observándose adjunta a las membranas de las células portadoras una hora pi; después de 18 horas se observaron cambios en la morfología del microorganismo, pues cambiaron las formas reticuladas a formas más electrodensas, a las dos semanas posinoculación se obser-

varon inclusiones intracitoplasmáticas cercanas al núcleo de las células turbinadas, el número de inclusiones disminuyó conforme aumentaba el número de pase. La membrana y la pared celular fueron separadas por una vacuola repleta de anaplasmas, éstas se identificaron hasta seis semanas pi. La técnica de hibridación arrojó resultados positivos en los endotelios a las seis semanas pi, después de cuatro pases, y en los cultivos donde no se realizaron pases, a partir de la novena semana pi; en tanto, en las células turbinadas los resultados positivos se presentaron la séptima semana pi, después de cuatro pases. Para el desafío *in vivo* se inocularon a diferentes tiempos, células suspendidas en 2.0 mL de MEM vía intravenosa a cinco becerros, el seguimiento de los animales se realizó con frotis teñidos con Giemsa, prueba de fijación del complemento y ELISA. Infortunadamente, estos becerros no presentaron signos clínicos de anaplasmosis, resultaron negativos a la prueba de fijación del complemento, pero con la prueba de ELISA, tres de cinco animales presentaron títulos significativos de anticuerpos. Adicionalmente, en uno de los becerros infectados con los cultivos, a las diez semanas pi, se colocaron 50 hembras de *D. andersoni* para alimentarse, concluido el periodo de alimentación, las garrapatas se transfirieron a becerros sanos, que tampoco desarrollaron signos de anaplasmosis (77).

En el informe del 2004 (78), el grupo de investigadores de la doctora Munderloh describe el cultivo en líneas de células endoteliales de bovino (*Bos taurus*) y de mono Rhesus (*Maccaca mulata*) con un porcentaje de infección de hasta 90 puntos Cabe destacar que en dicho experimento también se estudió la interacción de otra especie, *A. phagocytophilum*, con sus células blanco. Todas las líneas celulares aquí utilizadas como soporte, fueron comercialmente adquiridas del ATCC. Primero, la infección se dio en una línea de células de garrapata, derivada de embriones de *I. scapularis*, cuyo establecimiento se dio con anterioridad (64, 65), esta línea se denomina ISE 6 y se mantuvo en medio de cultivo L15-B300 con 5% de CTF, 5% de SBF y 0.1% de lipoproteína concentrada bovina, la temperatura de incubación fue de 34°C con atmósfera de 5% CO₂; al pase 36 se inoculó con la cepa Virginia Am291 de *A. marginale*, al inocular a la rickettsia se adicionó al medio de cultivo, 25 mM de HEPES y 0.25% NaHCO₃, para lograr pH de 7.5 a 7.7, posteriormente el material de este cultivo se transfirió a las células portadoras de mamífero: retina fetal de mono Rhesus (RF/6A),

córnea de bovino adulto (BCE C/D-1b), células turbinadas de bovino (BT) y de aorta pulmonar de bovino (CPAE).

Para el seguimiento de la infección en células de mamífero se realizaron tinciones de Giemsa al 4% durante 30 minutos a 37°C, además de inmunofluorescencia directa. Para el mantenimiento de los cultivos se emplearon diversos medios según las necesidades de cada línea, todos complementados con L15-B300, RPMI-1640 o MCDB 131 y cortisona, dependiendo de las necesidades de cada estirpe celular. Se agregó además 10% de SBF, la temperatura se incrementó a 37°C y los subcultivos se realizaron semanalmente con dilución 1:4. Al término del experimento se realizaron preparaciones para microscopía electrónica y extracción de ADN para la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando cuatro juegos de iniciadores: uno para identificar a los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma*, dos para *msp2* y otro más para la región conservada de *msp1β*. Finalmente, el crecimiento de la bacteria se observó en células endoteliales de retina y córnea, *A. marginale* presentó un patrón de crecimiento más lento en comparación con *A. phagocytophilum*. Desde el pase inicial de las células de garrapata, el porcentaje de infección fue cercano a los 100 puntos, a los 10 días pi de las células de mamífero, el porcentaje de infección fue en decremento según el número de pases. A los 30 días el porcentaje de infección fue de 70 puntos, para estas fechas los pases se realizaron en dilución 1:5. En la estirpe de córnea la rickettsia se mantuvo hasta cuatro pases, en células de aorta pulmonar la infección sólo alcanzó 30% durante dos semanas. Así en la estirpe de retina se formaron grandes CI con numerosos cuerpos iniciales electrodensos, durante los primeros días. Eventualmente las células presentaban lisis liberando los CI hacia el exterior, expandiéndose por todo el monoestrato. La ubicación de *Anaplasma* se presentó a la periferia de las membranas celulares y nucleares. En las estirpes de aorta y células turbinadas no se demostró el desarrollo continuo del microorganismo.

VII. Discusión y conclusiones

Se advierte que todos los grupos de investigadores involucrados en estos intentos por mantener y multiplicar a la rickettsia *A. marginale* en condiciones *in vitro*, han partido de la premisa de que la rickettsia es un parásito

intracelular obligado, ya que no logramos identificar ningún grupo en el que se buscara llevar a cabo un cultivo axénico, carente de estirpe celular que soportase el crecimiento de la rickettsia. Los ensayos de clasificación de microorganismos similares ahora especifican que una característica esencial de la familia Anaplasmataceae y del género *Anaplasma* spp sea su condición de parásito obligado.

Derivado de lo anterior surgen varios factores a considerar, para la realización del método idóneo. El primero de ellos está constituido por las características del aislado o cepas de la rickettsia utilizada. Un gran número de trabajos muestra que la rickettsia ha sido multiplicada varias veces en sus portadores o antecesores, sean éstos bovinos o artrópodos y que al momento de iniciar los estudios se encontraban viables. Además se indagó en varios de ellos que la identidad entre el aislado o cepa inicialmente utilizado en el cultivo coincidiera en algunas de las características que le confirieran la misma identidad con los microorganismos obtenidos después de cultivados. Este planteamiento estaría soportado por la aplicación práctica de los postulados de Koch, para buscar la identidad del agente etiológico antes y después del proceso del cultivo.

Destaca también, como factor relevante para el cultivo de esta rickettsia, el medio de cultivo o soporte tanto para las células que actúan como portadoras, como las propias rickettsias. En ello notamos gran variabilidad; sin embargo, es sorprendente la frecuencia en el uso del medio RPMI-1640 diseñado para sostener cultivos de células de mamífero, pues se aplica en la mayoría de los casos, ya que el número de experimentos realizados con ese medio de cultivo es más que abundante, en contraste con otros medios. Por el contrario, en detrimento de la abundancia, destaca que aquellos que aparentemente han sido capaces de mantener la viabilidad de la rickettsia por mayores periodos, son minoría. Aunado a lo anterior, también se hace evidente que los autores han buscado la forma de dotarles de los elementos que, a su juicio, pudieran favorecer el crecimiento, tanto de la rickettsia *A. marginale*, como de células de soporte. Estos aditivos han sido desde simples formulaciones para mantener el efecto amortiguador del pH, como el NaHCO_3 o las sales tampón (ACES, BES, HEPES, entre otros), hasta precursores de material genético (Timidina, hipoxantina, inosina o el ácido orótico), todo ello con la intención de favorecer su propagación. Pero, sorprendentemente, no se converge en re-

sultados estadísticamente significativos que establezcan la calidad de indispensable, para cualquiera de estos componentes. Otros factores como la temperatura de incubación o la atmósfera que la circunda, no han sido claramente discriminados ya que hay tanto resultados satisfactorios como insatisfactorios con cualquiera de las opciones elegidas.

Otro aspecto que llama la atención, son las manipulaciones para alcanzar la invasión de las células portadoras. En algunos casos se ha pretendido usar la fuerza de la centrifugación para provocar el contacto estrecho entre las fases infectantes y las posibles células portadoras; en otros casos se ha aprovechado la capacidad fagocíticas de algunas estirpes celulares, para que ingieran uno o varios eritrocitos infectados y que, ya adentro de la célula, la rickettsia reaccione y se multiplique; otros más han buscado la desintegración del CI para que se liberen los cuerpos iniciales, quienes supuestamente serían los encargados de invadir nuevas células. Aun cuando, por ejemplo, ya se sabe que existen componentes de la membrana de la rickettsia que juegan un papel como adhesinas, tanto para eritrocitos o células de garrapata, no parece explícito que se esté tomando ventaja, particularmente de esta cualidad o que se hayan identificado factores que la inhiban.

De los primeros ensayos referidos en este trabajo, destaca que las células en las que se pretendía mantener a la rickettsia, no eran los eritrocitos que son, aparentemente, la célula portadora terminal en el proceso de infección por *A. marginale* en el bovino. En apariencia, hasta ese momento no había elementos de juicio para considerar que los eritrocitos de origen mamífero (carentes de núcleo), y particularmente los del bovino, pudieran considerarse como sustrato para la multiplicación de un agente infeccioso. Es posible que con la descripción de Trager y Jensen, en 1978 (51), donde se documenta el crecimiento continuo del parásito intracelular *P. falciparum*, utilizando eritrocitos como soporte, haya servido para influir en otros grupos de investigadores de esta posibilidad. No cabe duda que los esfuerzos realizados poco tiempo después para el desarrollo del cultivo *in vitro* de otros hemoparásitos, *v.gr. Babesia spp* (79, 80), reforzaron la idea de incluir a los eritrocitos como material apropiado para tal efecto.

Indudablemente la estrategia de utilizar células de garrapata, pareciera como la natural segunda opción como célula portadora, para buscar la multiplicación de la rickettsia; en cierta forma ya había estudios que lo-

graban describir las fases de su ciclo evolutivo en el posible transmisor biológico. Ante la evidencia de su presencia en esos tejidos, sólo era cuestión de encontrar las estirpes de células de garrapatas capaces de reproducirse en condiciones *in vitro*, por periodos prolongados y sin menoscabo de sus características primordiales. Hasta cierto punto quizá no hubiesen sido deseables células que al transformarse, perdieran las cualidades que le permitiesen seguir funcionando como célula portadora de *A. marginale*. Aparentemente ese no fue el caso, pues no sólo se describieron esas líneas celulares, sino que además se desarrollaron los medios de soporte idóneos para su mantenimiento y multiplicación. Al utilizarlas, se ha logrado mayor comprensión del proceso, al coincidir en algunos casos la lentitud en el desarrollo de la célula de garrapata, como el dilatado periodo prepatente que se observa en los animales con las infecciones inducidas por la rickettsia. Queda pendiente encontrar la manera de establecer la vinculación entre los tres tipos de células en los que están, aparentemente, involucradas en el ciclo de infección y transmisión de la rickettsia, por un lado, las células de garrapata y, por el otro, los eritrocitos de bovino o las células endoteliales. Sólo últimamente se ha descrito que estas últimas, son capaces de ser infectadas por *A. marginale* dentro del portador bovino (81).

Se aprecia que las metodologías que han intentado el cultivo *in vitro* de *A. marginale*, son complejas, disímolas, sin muchas características comunes o particularidades que permitan reconocer categóricamente que el cultivo es exitoso, ni aseverar el desarrollo del procedimiento del cultivo *in vitro* de la rickettsia represente un avance evolutivo o, por el contrario, un retroceso. Sirva de contraste lo que acontece con el cultivo *in vitro* de *Babesia* spp, el cual tiene metodologías comunes y uniformes, ampliamente reconocidas por los laboratorios que desempeñan tal actividad. Esa misma metodología, con ligeras variantes, ha sido utilizada para cultivar especies diferentes (58, 79, 80), obtener poblaciones derivadas de un solo ancestro o clonas (82, 83), determinar características físicas o bioquímicas de los protozoarios (84, 85), servir como fuentes de antígeno o para comprobar componentes inmunológicos (86) o determinar la susceptibilidad a sustancias químicas; todo esto implica que una metodología de proceso uniforme, como es el mantenimiento del cultivo *in vitro* de un patógeno, ofrece múltiples ventajas, tanto para generar conocimiento como para indagar en sus aplicaciones prácticas. No cabe duda que los estudios para

determinar el procedimiento óptimo para el cultivo en el laboratorio de la rickettsia *A. marginale*, han hecho amplias contribuciones al conocimiento de la fisiología de la rickettsia y que con el resurgimiento de la biotecnología y el abundamiento de sus herramientas se lleguen a concretar mayores logros en la generación de esos conocimientos; pero quizás habrá que esperar a que las aplicaciones de los procesos aquí descritos alcancen mayor difusión y, de acuerdo con esta dimensión, definir con mayor claridad el progreso alcanzado.

 Referencias

1. **Ristic M.** Anaplasmosis. In: Ristic M, McIntyre, (editors.) DISEASES OF CATTLE IN THE TROPICS. La Haya: Martinus Nijhoff Publishers 1981:327-344.
2. **Corona B, Rodríguez M, Martínez S.** Anaplasmosis bovina. REDVET 5(VI) 2005.
3. **Medellín- L J A.** Anaplasmosis y Babesiosis en Tamaulipas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica, Universidad Autónoma de Tamaulipas, 1998.
4. **Rodríguez- Camarillo SD, García- Ortiz MA, Cantó- Alarcón GJ, Hernández, SG, Santos N Abortes- Torres R.** Ensayo de un inmunógeno experimental inactivado contra *Anaplasma marginale*. Téc Pecu Méx 1999; 37(1):1-12.
5. **Hung-Jones ME, Scotland K, Appewhaiti LM, Alexander FM.** Seroprevalence of anaplasmosis and babesiosis in livestock on St. Lucía. Trop Anim Health Prod 1988; 20: 137-9.
6. **Payne RC, Scott JM.** Anaplasmosis y babesiosis in El Salvador. Trop Anim Health Prod 1982; 14: 75-80.
7. **Spath EJ.** <http://www.inta.gov.ar/balcarse/gsa/informepidem/comercio/htm>. 2003.
8. **Benavides E, Vizcaíno O, Britto CM, Romero A, Rubio A.** Attenuated trivalent vaccine against babesiosis and anaplasmosis in Colombia. Ann N Y Acad Sci 2000; 916: 613- 16.
9. **Melendez RD, Forlano M.** Seroprevalence and incidence of babesiosis and anaplasmosis in a Corora breed herd from Venezuela. Rev Bra Parasitol Vet 1997; 6:105-109.
10. **Vidotto MC, Andrade GM, Palmer GH, McElwain TF, Knowles DP.** Seroprevalence of *Anaplasma marginale* on cattle in Parana state, Brazil, by major surface protein 5 competitive enzyme linked immunosorbent assay. Ann NY Acad Sci 1998; 849: 424-26.
11. **Cossio- BR, Rodríguez- CS, García- OMA, García- TD, Aboytes-Torres R.** Bovine anaplasmosis prevalence in northern Veracruz state, México. Prev Vet Med 1997; 32: 164-170.

12. **Chitravel V, Lourdsamy M, Ravindranath TK, Prabhakaran V, Kokilaprabhakaran A.** A report on the incidence of anaplasmosis in Jersey bulls. *Indian Vet J* 1998; 75: 256- 7.
13. **Masika PJ, Sonandi A, Van-Averbeke W.** Perceived causes, diagnosis and treatment of babesiosis and anaplasmosis in cattle by livestock farmers in communal areas of the Central Eastern Cape Providence, South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 1997; 68:40-44.
14. **Kinhm U.** Anaplasmosis bovina en Suiza. Informe sanitario 2002; 15 (37):177.
15. **Coetzee JF, Apley MD, Tocan KM.** Comparison of the efficacy of enrofloxacin, imidocarb and oxytetracycline for clearance of persistent *Anaplasma marginale* infections in cattle. *Vet Ther* 2006; 7: 347-360.
16. **Sultan KR, Haagsman HP.** Species-specific primary cell cultures: a research tool in veterinary science. *Vet Sci Tomorrow* 2001; 1: 1-7.
17. **Lew A, Jorgensen W.** Molecular approaches to detect and study the organisms causing bovine tick borne diseases: babesiosis and anaplasmosis. *African J. Biotechnology* 2005; 4:292-302.
18. **Smith T, Kilborne FL.** Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or Southern Cattle fever. *USDA Bureau of Anim Bull* 1893; I: 1-301.
19. **Theiler A.** Gall sickness of South Africa (Anaplasmosis in cattle). *J Comp Pathol Therap* 1910a; 23:98-115.
20. **Theiler A.** *Anaplasma marginale*. The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. *Rept Govt Bacteriol Transvaal So Africa* 1910b; 7:1908-1909.
21. **Ristic M, Kreier JP. Family III.** Anaplasmataceae Philip 1957, 980AL. In: Krieg NR, & Holt JG (editors) *BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY* Vol.1 Williams & Wilkins; Baltimore: 1984; 719-729.
22. **Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, et. al.** Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: Unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia*, and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, description of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51:2145-2165.

23. **Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, et. al.** Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. PNAS 2005; 102:844-849.
24. **Andersson SGE, Kurland CG.** Reductive evolution of resident genomes. Trends Microbiol 1998; 6:263-268.
25. **Wren BW.** Microbial genome analysis: insights into virulence, host adaptation and evolution. Nat Rev Genet 2000;1: 30-39.
26. **Ristic M, Watrach AM.** Anaplasmosis VI. Studies and hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. Am J Vet Res 1963; 24: 267-77.
27. **Palmer GH, Brown WC, Rurangirwa FR.** Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. Microb and Infec 2000; 2:167.
28. **Palmer GH, McElwain TF.** Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. Vet Parasitol 1995; 57:233-53.
29. **Yeruham J, Braverman Y.** The transmission of *Anaplasma marginale* to cattle by blood-sucking arthropods. Refuah Vet 1981;38: 37-44.
30. **Kocan KM, Holbert D, Edwards W, Ewing SA, Barron- SJ, Hair JA.** Longevity of colonies of *Anaplasma marginale* in midgut epithelial cells of *Derma-centor andersoni*. Am J Vet Res 1986.
31. **Potgieter FT, Kocan KM, McNew RW, Ewing SA.** Demonstration of colonies of *Anaplasma marginale* in the midgut of *Rhipicephalus simus*. Am. J. Vet. Res. 44: 2256-61. 1993; 47: 1657-61.
32. **Zaugg JL, Stiller D, Coan ME, Lincoln SD.** Transmission of *Anaplasma marginale* (Theiler) by males of *Derma-centor andersoni* (Stiles) fed on an Idaho field infected chronic carrier cow. Am J Vet Res 1986; 47: 2269-71.
33. **Ristic M.** Anaplasmosis. In: BLOOD DISEASES OF MAN AND ANIMALS. Vol. II. Academic NY: Press Inc 1968:474-537.
34. **Richey EJ, Palmer GH.** Bovine anaplasmosis. The compendium food animal 1990;12:1661-69.
35. **Zaugg JL.** Seasonally of natural transmission of bovine anaplasmosis under desert mountain range conditions. JAVMA 1990;196: 1106-1109.

36. **Kocan KM, Blouin EF, Palmer GH, Eriks IS, Edwards WL.** Strategies to interrupt the development of *Anaplasma marginale* in its tick vector. The effect of bovine derived antibodies. *Ann NY Acad Sci* 1996; 791:157-165.
37. **Smith RD, Levy MG, Kuhleschmidt MS, Adams JH, Rzechula DG, Hardt TA, Kocan KM.** Isolate of *Anaplasma marginale* not transmitted by ticks. *Am J Vet Res* 1986; 47:127-29.
38. **Wickwire KB, Kocan KM, Barron SJ.** Infectivity of three *Anaplasma marginale* isolates for *Dermacentor andersoni*. *Am J Vet Res* 1987; 48: 96-99.
39. **Zaugg JL, Goff WL, Foreyt W, Hunter DL.** Susceptibility of elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* and *Anaplasma ovis*. *J Wildl Dis* 1996; 32: 62-66.
40. **Walade SM, Young AS, Morzaria SP.** Artificial feeding of Ixodid ticks. *Parasitol Today* 1996;12: 272-278.
41. **Kocan KM, Hair JA, Edwing SA, Stralton LG.** Transmission of *Anaplasma marginale* Theiler by *Dermacentor andersoni* Stiller and *Dermacentor variabilis* (say). *Am J Vet Res* 1981: 42: 15-18.
42. **Barbet AF, Blentlinger R, Jooyoung Y, Lundgren AM, Blouin EF, Kocan KM.** Comparison of surface proteins of *Anaplasma marginale* grown in tick cell culture, tick salivary glands, and cattle. *Inf Imm* 1999; 67 (1): 102-107.
43. **De la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, Kocan KM.** Differential Adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen to bovine erythrocytes and tick cells. *Int J Parasitol* 2001; 31:145-153.
44. **McGarey DJ, Allred DR.** Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesions. *Infection and Immunity*. 1994; 62:4587-4593.
45. **De la Fuente J, Garcia-Garcia JC, Sauer JR, Saliki JT, Kocan KM.** Applications of a cell culture system for studying the interaction of *Anaplasma marginale* with tick cells. *Anim Health Res Rev* 2002; 3: 57-68.
46. **Kocan KM, De la Fuente J, Blouin EF, Garcia-Garcia, JC.** *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptation of a tick-borne rickettsia. *Parasitology* 2004;129: S285-S300.

47. **Rodríguez- CSD, García- OMA, Aboytes- TR, Cantó- AGJ, Barigye R.** Inmunología e inmunoprofilaxis de la anaplasmosis bovina. *Ciencia Veterinaria* 2004; 9:123-164.
48. **García- OMA, Angeles-OLE, Hernández SG, García- TD, Aboytes TR, Rodríguez- CSD.** Caracterización de la virulencia de un aislado mexicano de *Anaplasma marginale*. *Téc Pecu Méx* 1998; 36:197-202.
49. **Blood DC, Radostis DM, Hennderson JA.** *Veterinary Medicine*, 6th ed. Great Britain: Bailliere-Tindal, 1983.
50. **Davis WC, Talmadge JE, Parish SM, Jonson MI, Vibber SD.** Synthesis of DNA and protein by *Anaplasma marginale* in bovine erythrocytes during short-term culture. *Inf Imm* 1978; 22:597- 602.
51. **Trager W, Jensen J.** Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976; 193:673-675.
52. **Kessler RH, Ristic M, Sells DM, Carson CA.** *In vitro* cultivation of *Anaplasma marginale*: growth pattern and morphologic appearance. *Am J Vet Res* 1979b;40: 1767- 1773.
53. **Kessler RH, Ristic M.** *In vitro* cultivation of *Anaplasma marginale*: invasion of and development in noninfected erythrocytes. *Am J Vet Res* 1979; 40:1774- 1776.
54. **Mazzola V, Kuttler KL.** *Anaplasma marginale* in bovine erythrocyte cultures. *Am J Vet Res* 1980; 41, (12):2087-2088.
55. **Orozco- Vega, LE.** Comportamiento de *Anaplasma marginale* en condiciones de laboratorio tesis de maestría. México DF: UNAM 1990.
56. **Blouin EF, Kocan KM, Ewing SA.** Preliminary attempts to infect bovine erythrocytes *in vitro* with a tick-derived stage of *Anaplasma marginale*. *Ann NY Acad Sci* 1992; 653: 72- 77.
57. **Castañeda JM, Mosqueda G, JJ, Rojas R, Rodríguez-CE, Vega S y MCA.** Evaluación de la supervivencia de *Anaplasma marginale* en cultivo estacionario microaerofílico. *Memorias de XXX Congreso Nacional de Buiatría Acapulco, Guerrero.* 145-146. 2006.
58. **Vega CA, Buening GM, Rodriguez SD, Carson CA, McLaughlin K.** "Cryopreservation of *Babesia bigemina* for *in vitro* cultivation". *Am J Vet Res* 1985b; 46: 421-423.

59. **Waghela SD, Cruz D, Droleskey RE, DeLoach JR, Wagner GG.** *In vitro* cultivation of *Anaplasma marginale* in bovine erythrocytes co-cultured with endothelial cells. *Vet Parasitol* 73: 43-52.
60. **Mazzola V, Amerault TE, Roby T.** Survival of *Anaplasma marginale* in *Aedes albopictus* cells. *Am J Vet Res* 1976; 37: 987-989.
61. **Mazzola V, Amerault TE, Roby T.** Electron microscope studies of *Anaplasma marginale* in *Aedes albopictus* culture system. *Am J Vet Res* 1979; 40:1812-15.
62. **Hidalgo RJ, Jones EW, Brown JE, Ainsworth AJ.** *Anaplasma marginale* in tick cell culture. *Am J Vet Res* 1989a; 50:2028-2032.
63. **Oberst RD, Kocan KM, Hair JA, Ewing SA.** Staining characteristics of colonies of *Anaplasma marginale* Theiler in *Dermacentor andersoni* Stiles. *Am J Vet Res* 1981; 42:2006-2009.
64. **Munderloh UG, Blouin EF, Tocan KM, Ge NL, Edwards W, Curtí TJ.** Establishment of the tick (Acari:Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. *J Med Entomol* 1996; 33: 656-664.
65. **Munderloh UG, Liu Y, Wang M, Chen C, Kurtii TJ.** Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*. *J Parasitol* 1994; 80: 533-543.
66. **Kocan KM, Goff WL, Stiller D, Claypool PL, Edwards W, Ewing SA, Hair JA, Barron SJ.** Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible cattle. *J Med Entomol* 1992a; 29:657-666.
67. **Kocan KM, Stiller D, Goff WL, Claypool PL, Edwards W, Ewing SA, McGuire TC, Hair JA, Barron- SJ.** Development of *Anaplasma marginale* in male *Dermacentor andersoni* transferred from parasitemic to susceptible cattle. *Am J Vet Res* 1992b; 53: 499-507.
68. **Hidalgo RJ.** Culture of *Anaplasma marginale* in lymph node cells. *Proc Ann Meet U S Anim Health Assoc* 1974; 78: 77-85.
69. **Hidalgo RJ.** Propagation of *Anaplasma marginale* in bovine lymph node cell culture. *Am J Vet Res* 1975; 36: 635-640.
70. **Marble DW, Hanks MA.** A tissue culture method for an *Anaplasma marginale*. *Anim Sci Div College of Agriculture*. 1971; 172:197-205; Citado

- por: Hidalgo R. J. Propagation of *Anaplasma marginale* in bovine lymph node cell culture. Am J Vet Res 1975; 36:635- 40.
71. **Hurska JC, Kreier OI, Block WE.** Studies in tissue culture of *Anaplasma marginale*. Proc 5° Natl Res Conf on Anaplasmosis. 1968; 21-24; Citado por: Orozco- Vega LE. Comportamiento de *Anaplasma marginale* en condiciones de laboratorio tesis de maestría México DF: UNAM 1990.
 72. **Marble DW, Hanks MA.** *Anaplasma marginale* grown in stable rabbit bone marrow cells. Proc 6° Natl Res Conf on Anaplasmosis 1972; 53-54. Citado por: Orozco- Vega, LE. Comportamiento de *Anaplasma marginale* en condiciones de laboratorio tesis de maestría. México DF: UNAM 1990.
 73. **Trueblood M A.** Cultivations of *Anaplasma marginale*. Proc 6th Natl Anaplasmosis Conf Las Vegas Nevada Pp 54-58. 1973.
 74. **Dimopoulos G T, y Schrader GT.** Personal communications. , Dept Vet Sci. Baton Rouge, LU. 70803: Louisiana State University.
 75. **Luther G.** Personal communication. Dept Vet Sci Louisiana State University, Baton Rouge, LU. 70803. EE.UU.A.
 76. **Summers WA.** Personal communication. Dept. Microbiol. School of Medicine, Indiana University, Indianapolis, IN. 46202. EE.UU.A.
 77. **Blouin EF, Kocan KM, Murphy GL, Ge N.** Persistence of tick-derived *Anaplasma marginale* in cultured bovine turbinate and endothelial cells. Rev Elev Med Vet Pays Trop 1993; 46: 49-56.
 78. **Munderloh UG, Lynch MJ, Herron MJ, Palmer AT, Kurtti TJ, Nelson RD, Goodman JL.** Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. Vet Microbiol 2004; 101:53-64.
 79. **Levy MG, Ristic M.** *Babesia bovis*. Continuous cultivation in a microaerophilus stationary phase culture. Science 1980; 207:1218-1225.
 80. **Vega CA, Buening GM, Green TJ, Carson CA.** *In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*. Am J Vet Res 1985a; 46:416-420.
 81. **Carreño AD, Allegan AR, Barbet AF, Palmer GH, Noh SM, Johnson CM.** *In vivo* endothelial cell infection by *Anaplasma marginale*. Vet Pathol 2007; 44: 116-118.
 82. **Rodriguez-CSD, Buening GM, Green TJ, Carson CA.** Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation. Inf Imm 1983:42:15-18.

83. **Vega CA, Buening GM, Rodriguez SD, Carson CA.** "Cloning of *in vitro* propagated *Babesia bigemina*". Vet Parasitol 1986a; 22: 223-233.
84. **Rodriguez SD, Buening GM, Vega CA y Carson CA.** "Enzymatic characterization of *Babesia bovis*". J Protozool 1986;33: 507-511.
85. **Vega CA, Buening GM, Rodriguez SD, Carson CA.** "Concentration and enzyme content of *in vitro* cultured *Babesia bigemina*-infected erythrocytes". J Protozool 1986b; 33: 514-518.
86. **Cantó AG, Vega MCA Smith RD.** "Ensayos de vacunación contra *Babesia bovis* utilizando antígenos procedentes de cultivo *in vitro*". Tec Pecu Mex 1982; 43:43-54.

La inmunidad innata: nuevos hallazgos



Carlos Ramón Bautista Garfias

I. Introducción	208
II. Componentes de la inmunidad innata o natural	208
III. Células de inmunidad innata	209
IV. La inflamación	210
V. Defensinas y cathelicidinas	211
VI. Galectinas	212
VII. Quimiocinas y citocinas	212
VIII. Proteínas de choque térmico	213
IX. Proteína C-reactiva	213
X. El sistema del complemento	214
XI. Los receptores tipo-Toll	215
XII. Proteínas de reconocimiento de peptidoglicano	218
XIII. Otras familias de reconocimiento de patógenos: NLR y RLR	218
XIV. Evasión de la respuesta inmune innata por organismos patógenos ..	218
XV. Manipulación de la inmunidad innata	219
XVI. Conclusiones	220
Referencias	221

I. Introducción

La respuesta inmunitaria involucra la interrelación de mecanismos, tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa. En el primer caso, generalmente se tiene el concepto de que las barreras mecánicas, fisiológicas, químicas y microbiológicas evitan la entrada de agentes patógenos al organismo. Sin embargo, cabe señalar que el epitelio intestinal, aparte de funcionar como barrera contra los agentes patógenos y desempeñar diversas funciones que mantienen la homeostasis, también participa en la respuesta inmunitaria innata del intestino mediante su capacidad para secretar moco y péptidos antimicrobianos. Similarmente este epitelio tiene la capacidad de secretar citocinas y responder a quimiocinas exógenas (1).

La respuesta inmunitaria por cuestiones de estudio, se ha dividido en innata y adquirida; ambas están en estrecho ligadas y constituyen un todo. La primera, que es inmediata, incluye componentes celulares y productos solubles del portador, como péptidos antimicrobianos, fragmentos del complemento, citocinas y quimiocinas. Tales mecanismos de defensa son importantes para los seres vivos, como vegetales (2), invertebrados (3), artrópodos (4, 5, 6), peces (7, 8), batracios (9) y mamíferos (10, 11, 12), entre otros.

La segunda se generó durante la evolución como ventaja de supervivencia adicional al sistema inmunitario innato existente (13). Esta respuesta inmunitaria adquirida proporciona protección de larga duración, toma días para desarrollarse y requiere de mutaciones somáticas que propician el desarrollo de receptores antígeno-específico (clonalmente diversos) en células T (inmunidad celular) y moléculas efectoras, llamadas anticuerpos (inmunoglobulinas) (10).

Debido a la limitación de espacio y a la gran cantidad de información que se ha generado en el área, en especial durante los últimos cinco años, se describen los componentes más sobresalientes de la inmunidad innata, tratando de enfocar, hasta donde es posible, los aspectos relevantes con la medicina veterinaria.

II. Componentes de la inmunidad innata o natural

Entre los principales elementos que participan en la respuesta inmunitaria innata, se encuentran: defensinas y cathelicidinas (14), células NK (15), cé-

lulas NKT (15), linfocitos T (15), células dendríticas (16), células cebadas (17, 18), basófilos (19), eosinófilos (20), neutrófilos (21, 22), macrófagos (23), inflamación (24), algunas quimiocinas (25, 26), algunas citocinas (27, 28), complemento (29), lectina ligadora de manosa (30), ficolinas (30), proteína C-reactiva (31), proteínas de choque térmico (32), galectinas (33), receptores tipo Toll (34), proteínas de reconocimiento de peptidoglicano (35) y receptores tipo-NOD y tipo-RIG (36).

III. Células de inmunidad innata

Linfocitos de inmunidad innata: Células NK, NKT y Linfocitos T

Se ha señalado que actualmente se están identificando los mecanismos moleculares para explicar cómo los linfocitos NK, NKT y las células T detectan células infectadas y transformadas, y directamente proporcionan resistencia por medio de la citolisis y la producción de citocinas (15). También se ha demostrado que los antígenos bacterianos son capaces de estimular linfocitos NKT de humano y de ratón (37). Asimismo, se ha descubierto un área nueva que se relaciona con las consecuencias de las interacciones de los linfocitos de la inmunidad innata (NK, NKT y las células T) con las células dendríticas (CD). En este sentido, los linfocitos de la inmunidad innata inducen la maduración de las CD a través de mecanismos de contacto que todavía se desconocen. Asimismo, las CD expanden el número y amplifican la función de los linfocitos de la inmunidad innata; finalmente, las CD en maduración procesan antígenos, particularmente de las células lisadas por los linfocitos de la inmunidad innata, y elucidan una inmunidad adaptativa tipo Th1 (32). Por ejemplo, los linfocitos NK están involucrados en los mecanismos inmunitarios tempranos que controlan la infección por protozoarios parásitos del género *Plasmodium* (38, 39). Recientemente se ha observado que hay estrecha interacción entre las células dendríticas y los linfocitos NK (40). En este sentido, estudios llevados a cabo con linfocitos NK de bovino sugieren que estas células son de importancia en la respuesta inmunitaria innata de dichos rumiantes (41).

Asimismo, se ha indicado que las células dendríticas (CD) que capturan células tumorales *in vivo*, también maduran en respuesta a los linfocitos NKT de la inmunidad innata, inician una vigorosa respuesta inmune

adaptativa contra tumores (42). Cabe recordar que las CD se han reconocido como eslabón entre las respuestas inmunitarias innata y adquirida por medio de la maduración de dichas células que requiere, además del antígeno, la ligadura de CD40 y la coestimulación por CD80/86 (16).

En el caso de los linfocitos T gamma-delta, se ha sugerido que representan el eslabón entre la respuesta inmunitaria innata y la adquirida (43, 44, 45). En estudios recientes, se ha demostrado que esta clase de linfocitos participan en la defensa contra tumores (46) y responden directamente a los patrones moleculares asociados a patógenos (47). Asimismo, constituyen una subpoblación de linfocitos muy importante en los bovinos, sobre todo en animales jóvenes (48) que quizá desempeña un papel primordial en la resistencia de edad observada en la babesiosis de los bovinos (48).

IV. La inflamación

La inflamación ocurre como respuesta innata a la lesión celular provocada por traumas o infecciones (virales, bacterianas y parasitarias), constituyendo una red compleja de interacciones moleculares y celulares cuya finalidad es facilitar el retorno de la homeostasis fisiológica y la reparación del tejido. La respuesta está constituida tanto por eventos locales como por una activación sistémica mediada por citocinas. Los efectos de las citocinas sobre las células blanco pueden ser inhibidos o amplificados por otras citocinas, hormonas y antagonistas del receptor de citocina y receptores circulantes (49). El factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), la interleucina-1 (IL-1), la IL-6 y la IL-12 son las clásicas citocinas proinflamatorias. Localmente contribuyen a la activación de células inflamatorias y junto con la quimiocinas, que inducen la expresión de moléculas de adhesión, provocan el reclutamiento local de dichas células. Cuando las causas de la reacción inflamatoria son de alta intensidad, la producción de citocinas se incrementa y éstas son liberadas en la circulación provocando la "respuesta de fase aguda" (24, 49). Asimismo, las citocinas inhibitoras como la IL-10 inactivan algunas funciones efectoras de los linfocitos T y monocitos mononucleares, al inhibir la liberación de citocinas proinflamatorias; por tanto, para que la inflamación sea efectiva –y que exista una diferencia entre salud y enfermedad– requiere tanto de su activación como de su inactivación (24, 50). Un desajuste de la regulación de la respuesta inflama-

toria propicia enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes, en las que las citocinas TGF-, IL-6 e IL-1 actúan como factores de diferenciación y la IL-23 como factor de expansión y supervivencia de las células Th17 (51, 52) –células distintas de las Th1 y Th2 anteriormente descritas (53), que producen la IL-17, citocina proinflamatoria que sensibiliza y estimula fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y células epiteliales a producir distintos mediadores, entre éstos la IL-1, IL-6, TNF α , metaloproteasas y quimiocinas que inducen la inflamación (54). En este contexto, nuevas investigaciones indican que otra citocina recientemente descubierta, la IL-27, aparte de promover las respuestas tipo Th1, también actúa como un potente inhibidor del desarrollo de las células Th17 (55). Cabe señalar que aunque IL-23 e IL-27 son citocinas relacionadas, tienen funciones diferentes en la regulación de la inflamación (52, 56).

V. Defensinas y cathelicidinas

Los péptidos de defensa del portador se encuentran en todas las clases de seres vivos y constituyen un componente fundamental de la respuesta inmunitaria innata (14). Las investigaciones recientes sugieren que estos péptidos desempeñan papeles diversos y complejos en la respuesta inmunitaria y que, en los animales superiores, sus funciones no están restringidas solamente a la respuesta inmunitaria innata (14). Aparte de tener efectos antimicrobianos, tienen funciones inmunomoduladoras que incluyen alteración de la expresión de genes del portador, actividad de quimiocinas o inducción de la producción de quimiocinas, inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias producidas por el lipopolisacárido, promoción de la curación de heridas, y la modulación de las respuestas de células dendríticas y células de la respuesta inmunitaria adaptativa (14).

En sentido, las defensinas y cathelicidinas son pequeñas moléculas antimicrobianas producidas principalmente por leucocitos y células epiteliales que funcionan como moléculas efectoras de la inmunidad innata. Estos péptidos tienen amplio abanico de acciones contra microorganismos, incluyendo bacterias gram-positivas y gramnegativas, hongos y virus (57, 58, 59). En este contexto, se considera que las defensinas son moléculas efectoras importantes en la inmunidad innata del intestino contra microorganismos patógenos (53, 60). Asimismo, se ha sugerido que las

cathelidicinas, las defensinas y las dermicidinas constituyen péptidos antimicrobianos efectores de la inmunidad innata en la piel (61). Se ha señalado que a pesar de que la piel del ser humano está permanentemente expuesta a microorganismos, rara vez se infecta. Una de las razones de esta resistencia natural podría ser la existencia de una barrera química (62) que consiste de péptidos y proteínas antimicrobianas constitutivas e inducibles (AMP, por sus siglas en inglés). Muchas de las AMP se pueden inducir *in vitro* por medio de citocinas proinflamatorias o bacterias (62).

VI. Galectinas

Las galectinas conforman una familia de lectinas de animales con dominios de reconocimiento de carbohidratos conservados para beta-galactosido. Se expresan en diferentes células inmunitarias y sus niveles de expresión parecen depender de la diferenciación y activación de la célula. Las investigaciones recientes sobre estas moléculas indican que éstas son importantes en la respuesta inmunitaria a través de la regulación de la homeostasis y funciones de las células inmunitarias (63-67). De las 15 galectinas conocidas, la galectina-3 se ha implicado en la regulación de la interfase entre la inmunidad innata y la inmunidad adquirida (33).

VII. Quimiocinas y citocinas

Los miembros de la superfamilia de las quimiocinas están involucrados de manera crucial en la respuesta inmunitaria, tanto innata como adquirida (25). Entre otras actividades, estas moléculas participan en el reclutamiento de células, actividad microbicida, activación celular, polarización de células T CD4+ y efectos sobre células estructurales (25). Recientemente se demostró que la CCR5, que se expresa en células T efectoras y de memoria, así como en células dendríticas, funciona como un receptor que reconoce y liga la proteína bacteriana de choque térmico 70 (HSP70). Así, la HSP70 puede estimular respuestas de células T CCR5+ o de células dendríticas, particularmente en superficies epiteliales (68).

Las citocinas, por su parte, participan de manera sustancial en la respuesta inmunitaria innata. Entre otros ejemplos, es conocido desde hace

tiempo que las infecciones virales activan la respuesta inmunitaria innata que da lugar a la rápida producción de interferones Tipo I (69). Asimismo, se ha demostrado que la interleucina-15 (IL-15) --citocina esencial para el desarrollo, maduración y funcionalidad de los linfocitos NK y NKT-- es también de importancia en la inmunidad innata contra la infección viral en las mucosas (70). Otro ejemplo más de la participación de las citocinas en la respuesta inmunitaria innata, es el caso de los bovinos en los que se ha demostrado que la respuesta inmunitaria innata contra *Babesia bovis* depende de la inducción de citocinas tipo Th1 y de células tipo NK en el bazo (27).

VIII. Proteínas de choque térmico

Se ha observado que en los mamíferos, las proteínas como la HSP60 (proteína de choque térmico) (59) que está especializada en el reconocimiento de y ligue a estructuras microbianas, pueden desempeñar funciones biológicas importantes; por ejemplo, el aumento de la eficiencia de reconocimiento de lipopolisacárido (LPS) en las células de la inmunidad innata (71, 72). Asimismo, se ha sugerido que las proteínas de choque térmico toman parte en la modulación del proceso de fagocitosis (73). Además de servir como acompañantes de péptidos inmunogénicos derivados de tumores y de células infectadas con bacterias o virus, las proteínas de choque térmico por sí mismas proporcionan señales activadoras para las células presentadoras de antígeno y las células asesinas naturales (NK) (69, 32). Así, la HSP70 libre de péptidos, después de ligarse a los receptores tipo Toll en las células presentadoras de antígeno, provoca la secreción de citocinas proinflamatorias, ello propicia estimulación inespecífica del sistema inmunitario (32).

IX. Proteína C reactiva

Esta molécula --miembro representativo de las proteínas de fase aguda-- forma parte de la familia de las pentraxinas (31), es capaz de activar la vía clásica del complemento por medio de la interacción con C1q (74). La CRP (CRP, por sus siglas en inglés) es una molécula de reconocimiento de

patrones que se une a configuraciones moleculares específicas expuestas durante la muerte celular o que se encuentran en las superficies de agentes patógenos (75). La CRP liga residuos de fosforilcolina en las paredes celulares de bacterias como *Streptococcus pneumoniae* e interacciona con células fagocíticas a través de receptores FcγRI y FcγRII y activa la vía clásica del complemento (76). Esta proteína es protectora en la bacteremia murina causada por pneumococos por medio del incremento de la eliminación complemento-dependiente y la muerte de las bacterias. Se ha indicado que el reconocimiento de bacterias por la CRP y la unión a receptores FcγRI puede amplificar la respuesta protectora temprana de citocinas a la infección bacteriana (18).

X. El sistema del complemento

El sistema del complemento es uno de los sistemas de inmunidad innata más organizados en los invertebrados y vertebrados sin mandíbula (por ejemplo, las lampreas) y ha sobrevivido en los vertebrados con sus componentes básicos casi sin cambio durante 600 a 700 millones de años (29).

El sistema del complemento, conformado por más de 30 componentes séricos y de superficie celular colabora con los sistemas de inmunidad innata y de inmunidad adquirida, en el reconocimiento y eliminación de patógenos (77, 78, 29). En este sentido, la lectina ligadora de manosa (MBL, por sus siglas en Inglés) y las ficolinas (H-ficolina, L-ficolina y M-ficolina en humanos) son proteínas de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos que actúan en la inmunidad innata (30) y, cuando hay reconocimiento de patógenos, disparan la activación del complemento vía las lectinas a través de serinproteasas adheridas (MASP, por sus siglas en inglés) (79, 80).

Las ficolinas constituyen un grupo de proteínas que se encuentran en diversos tejidos que contienen tanto un dominio tipo colágeno como otro de tipo fibrinógeno. Las ficolinas presentes en el suero son lectinas con una especificidad de reconocimiento común para N-acetilglucosamina (GlcNAc) (81). El dominio tipo fibrinógeno es responsable de la unión a carbohidratos. La lectina ligadora de manosa (MBL) es también una lectina colagenosa en el suero que es específica para la unión a manosa y a GlcNAc. La organización de su dominio es similar al de las ficolinas, excepto

que la MBL tiene un dominio de reconocimiento de carbohidratos en lugar de un dominio tipo fibrinógeno (81). En este contexto, se ha demostrado que la MBL está presente en la circulación del neonato humano y es funcional en los adultos (82).

Recientemente se ha demostrado que la lectina ligadora de manosa (MBL, por sus siglas en inglés) no sólo activa el complemento por la vía de las lectinas, también lo hace por la vía alterna (83). Se ha señalado que la importancia de este descubrimiento radica en: a) la demostración de que los individuos deficientes en C4 o C2 poseen un sistema de activación del complemento por derivación (*bypass*), b) reafirmación del conocimiento de la probable historia evolutiva del complemento y c) la vía de activación del complemento por derivación puede mediar daños inmunopatológicos (84).

Asimismo, cabe señalar que para que la inmunidad innata se realice dentro de los pulmones al inicio de la infección con el neumococo *Streptococcus pneumoniae*, se requiere la presencia de C3 (85). Recientemente se ha propuesto el concepto de que existe una intensa interacción entre el sistema del complemento (MBL, C3, C1q) y los TLR que define la calidad y la magnitud de las respuestas inmunitarias (86).

XI. Los receptores tipo-Toll

La capacidad del sistema inmunitario innato para reconocer patógenos microbianos se efectúa mediante familias de receptores altamente conservadas para el reconocimiento de patrones moleculares que activan las vías de defensa del portador. Una de esas familias comprende los receptores tipo-Toll (TLR) que son expresados en diversas células del sistema inmunitario innato en la que cada miembro de la familia está dotado con la habilidad para reconocer distintas clases de moléculas microbianas conservadas (34). Los receptores tipo-Toll (TLR) son proteínas transmembranales expresadas por células del sistema inmunitario innato de los mamíferos que participan en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos microbianos (34, 87), a la fecha se conocen 11 (Cuadro1).

Hay dos mecanismos distintos por medio de los que la activación de los TLR contribuyen a la defensa del portador. En el primero, la activación de los TLR puede mediar directamente las respuestas innatas por medio de la regulación de la fagocitosis e inicio de la actividad antimicrobiana. En

el segundo, la activación de los TLR pone en funcionamiento la liberación de citocinas (88, 89) y la diferenciación de células dendríticas inmaduras a maduras, capacitando al sistema inmunitario innato para instruir la respuesta inmunitaria adaptativa (16).

La señalización a través de los TLR es mediada por dos moléculas adaptadoras diferentes: MyD88 (*myeloid differentiation primary-response protein* 88) y TRIF (Toll/interleukin-1 receptor (TIR)-domain-containing adaptor protein inducing IFN) (90).

Asimismo, se ha señalado que las lesiones sensibilizan al sistema inmunitario innato a respuestas incrementadas mediadas por TLR2 o TLR4, lo que sugiere que la reactividad de TLR aumentada pudiera contribuir al desarrollo de una inflamación sistémica incrementada después de una lesión severa (91).

Recientemente se ha informado que la activación de macrófagos de humano vía TLR regula la expresión del receptor de vitamina D y de los genes de vitamina D1-hidrolasa, lo que conduce a la inducción del péptido antimicrobiano cathelicidina y a la muerte intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* (92).

De la misma manera, se ha informado que la activación de los TLR induce la diferenciación de monocitos en macrófagos o en células dendríticas, lo que parece influir de manera fundamental en los mecanismos de defensa efectivos del portador contra agentes patógenos (93).

En este contexto, también se ha demostrado que la activación de los TLR por la microflora comensal es fundamental para la protección contra lesiones en el intestino y la mortalidad asociada (94). Sin embargo, aun los microorganismos comensales pueden inducir respuestas dañinas cuando las defensas del portador están imposibilitadas por traumas, heridas o inmunosupresión. En el caso del intestino humano, aparte de los TLR requeridos para la defensa contra patógenos entéricos invasores, se requiere de receptores adicionales de reconocimiento de patrones: el dominio de oligomerización de nucleótido (Nod, por sus siglas en inglés)1 y Nod2 (95). Por medio de la localización espacial y funcional de los TLR y las moléculas Nod, el intestino normal mantiene un estado de inflamación controlada. Por el contrario, los pacientes con "enfermedad inflamatoria del intestino" muestran inflamación en respuesta a la flora normal (95). En consecuencia, cabe señalar que el tracto gastrointestinal está colonizado

normalmente por una comunidad compleja y dinámica que no sólo provee una “resistencia de colonización” a bacterias potencialmente patógenas, sino que también contribuye de manera importante al desarrollo del sistema inmunitario intestinal (96). En órganos como la córnea (97) y los pulmones (98), los TLR desempeñan una parte primordial en la respuesta inmunitaria innata.

CUADRO 1.
Receptores tipo Toll identificados en células de vertebrados

Receptor	Ejemplo de estructuras reconocidas	Especies animales en las que se ha identificado	Referencias
TLR1	(en asociación con TLR2) Triacil lipopeptidos	Bovino, Humano, Ratón, Gallina doméstica	87, 99, 100, 101
TLR2	Lipoproteínas, peptidoglicanos, zymosan	Bovino, Cerdo, Gallina doméstica, Humano, Ratón, Conejo	10, 99, 100, 102-105
TLR3	ARN de doble cadena	Bovino, Humano, Ratón, Gallina doméstica	87, 99, 100,101
TLR4	Lipopolisacárido, taxol	Bovino, Gato, Gallina doméstica, Perro, Humano, Ratón, Conejo, Caballo	60, 87, 99, 100, 102, 105-107
TLR5	Flagelina	Bovino, Humano, Ratón, Gallina doméstica	87, 99-101
TLR6	(en asociación con TLR2) diacil lipopéptidos, ácido lipoteicoico, zymosan	Bovino, Humano, Ratón, Gallina doméstica	87, 99-101
TLR7	Imidazoquinolina	Bovino, Humano, Ratón, Gallina doméstica	87, 99-101
TLR8	ARN viral de cadena única	Bovino, Humano, Ratón	87, 99, 100
TLR9	ADN bacteriano (CpG)	Bovino, Cerdo, Humano, Ratón	87, 99, 100, 108
TLR10	Se desconoce	Bovino, Humano, Gallina doméstica	87, 99, 101
TLR11	Bacterias uropatógenas	Ratón	109

XII. Proteínas de reconocimiento de peptidoglicano

Las proteínas de reconocimiento de peptidoglicano (PGRP, por sus siglas en Inglés) son moléculas de respuesta inmunitaria innata que están conservadas desde los insectos hasta los mamíferos. Los insectos tienen hasta 19 PGRP, que activan vías de transducción de señales Toll o *Imd* o inducen cascadas proteolíticas que generan productos antimicrobianos, inducen fagocitosis, hidrolizan peptidoglicano y protegen a los insectos de las infecciones. En los mamíferos se han descubierto cuatro PGRP que se cree que funcionan como receptores de reconocimiento de patrones. Sin embargo, todos los PGRP de mamífero son secretados generalmente como homo y heterodímeros unidos por puentes disulfuro (35).

XIII. Otras familias de reconocimiento de patógenos: NLR y RLR

Los avances más recientes sobre el conocimiento de la respuesta inmunitaria innata, han llevado a la propuesta de que existen tres familias de sensores de patógenos: la primera la constituyen los receptores tipo-Toll (TLR mencionados en el apartado anterior) que reconocen estructuras microbianas en bacterias, virus, hongos y protozoarios; la segunda la conforman los receptores tipo-NOD (NLR, por sus siglas en inglés) que detectan bacterias; y la tercera la forman los receptores tipo-RIG (RLR, por sus siglas en inglés) que reconocen virus (36). En este sentido, se ha sugerido que estas tres familias interactúan entre sí durante la primera fase de respuesta del portador contra la infección, de tal forma que podrían proporcionar un repertorio importante y complejo de la respuesta inmunitaria innata frente a un patógeno invasor específico (36).

XIV. Evasión de la respuesta inmune innata por organismos patógenos

Los microorganismos patógenos durante la evolución con sus portadores han desarrollado mecanismos para evitar ser dañados por la respuesta

inmunitaria, tanto innata como adquirida de los segundos. Así, parásitos intracelulares, como *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp, son capaces de alterar las funciones antimicrobianas de los macrófagos; prácticamente sabotean a estas células y no sólo eso sino que además sobreviven dentro de esas células (110, 111). Las filarias (nematodos parásitos) causantes de la filariasis linfática han desarrollado mecanismos para sobrevivir en el portador que impiden la activación de respuestas tanto Th1 como Th2 (112). En el caso de los artrópodos hematófagos, se ha descubierto una variedad de actividades en su saliva que incluyen la inhibición de la activación de macrófagos, inhibición de las células NK, inhibición de neutrófilos e inhibición de la inflamación, entre otras (113).

XV. Manipulación de la inmunidad innata

Con base en la importancia que tiene el sistema inmunitario innato para dirigir las vías entrelazadas del reconocimiento microbiano, inflamación, eliminación microbiana y muerte celular, particularmente a través de la activación de los TLR, en la actualidad se investiga el uso de compuestos naturales y artificiales para regular la respuesta inmunitaria innata y tratar las enfermedades inflamatorias (114, 115). Asimismo, los nuevos conocimientos sobre el funcionamiento de la inmunidad innata están influyendo sobre el desarrollo y comprensión del efecto de los adyuvantes inmunológicos (115-119). En este sentido, los lactobacilos –miembros de la flora microbiana comensal del tracto intestinal de humanos y mamíferos– son capaces de estimular la respuesta inmunitaria innata (120) y de modular las funciones inmunitarias de las células dendríticas (121, 122), por lo que se ha sugerido que podrían ser ventajosos como adyuvantes de vacunas (123, 124).

En este contexto, se ha demostrado que *Lactobacillus casei* funciona por sí solo como estimulante de la inmunidad innata, generando protección contra *Trichinella spiralis* (125) y *Babesia microti* (126) en ratones y contra *Eimeria* spp (127) en pollos de engorda. Asimismo, se ha observado que *L. casei* funciona como adyuvante cuando se administra junto con antígenos de *T. spiralis* en ratones (128) y antígenos de intestino de la mosca del cuerno *Haematobia irritans* en bovinos (129). Investigaciones recientes indican que la estimulación de interferones de Tipo I es esencial para un buen funcionamiento de las vacunas de ADN contra virus (28).

XVI. Conclusiones

Los nuevos descubrimientos de los últimos años han demostrado la complejidad e importancia de lo que se pensaba era la respuesta inmunitaria innata –notablemente el descubrimiento de los receptores tipo Toll (TLR)- y su intrincada participación en el desarrollo de la respuesta inmunitaria adquirida. En este sentido, la investigación sobre este tipo de receptores apenas se ha iniciado en medicina veterinaria y cabe destacar que de los 11 TLR conocidos, diez se han identificado en bovinos y ocho en la gallina doméstica (Cuadro 1), seguramente tales hallazgos se ampliarán en lo futuro.

Constantemente se está descubriendo algo nuevo en esta área del conocimiento; por ejemplo, la participación de la familia de factores de transcripción denominada “Factor regulador de Interferón” (IRF, por sus siglas en Inglés), que desempeña una participación trascendental, tanto en las respuesta de inmunidad innata como en las de la adaptativa y particularmente con el hallazgo de su papel en la inmunorregulación por medio de los receptores tipo-Toll y otros receptores de reconocimiento de patrones moleculares (130).

En este contexto, ya se tiene un mejor conocimiento de la estructura y función de las cinco proteínas adaptadoras (MyD88, MAL, TRIF, TRAM y SARM) involucradas en la iniciación de los mecanismos de señalización de los TLR (131). La importancia de los TLR en la respuesta inmune innata ha destacado, de tal forma que actualmente se les estudia para conocer su participación en enfermedades producidas por parásitos protozoarios (132) y nematodos (133), así como en la inmunidad innata del recién nacido (134). Debido a que los TLR también participan en diversos procesos inflamatorios locales y sistémicos (asma, psoriasis, artritis reumatoide, entre otros), se ha comenzado a estudiarlos como blancos potenciales de intervención terapéutica (135).

Asimismo, el mejor conocimiento de la respuesta inmunitaria innata permitirá el desarrollo de mejores métodos de control contra enfermedades infecciosas y parasitarias (por ejemplo, el desarrollo de mejores adyuvantes inmunológicos utilizados en vacunas), así como, en el caso de humanos, el evitar enfermedades autoinmunes.

 **Referencias**

1. **Oswald IP.** Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defense of the pig intestine. *Vet Res*, 2006; 37: 359-368
2. **Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L.** Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* 2004; 198: 249-266.
3. **Iwanaga S, Lee BL.** Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol*, 2005; 38: 128-150.
4. **Little TJ, Hultmark D, Read AF.** Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nature Immunol* 2005; 651- 654.
5. **Kim T, Kim YJ.** Overview of innate immunity in *Drosophila*. *J Biochem Mol Biol* 2005; 38: 121-127.
6. **Kurata S, Arika S, Kawabata S.** Recognition of pathogens and activation of immune responses in *Drosophila* and horseshoe crab innate immunity. *Immunobiology* 2006; 211: 237-249.
7. **Jones SRM.** The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish. *Development Comp Immunol* 2001; 5: 841-852.
8. **Magnadóttir B.** Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol* 2006; 20:137-151.
9. **Mangoni ML.** Temporins anti-infective peptides with expanding properties. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 1060-1069.
10. **Janeway CA, Jr Medzhitov R.** Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216.
11. **Bannerman DD, Paape MJ, Hare WR, Hope JC.** Characterization of the bovine innate immune response to intramammary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *J Dairy Sci* 2004; 87: 2420-2432.
12. **Newburg DS.** Innate immunity and Human milk *J Nutr* 2005; 135: 1308-1312.
13. **Cooper MD, Alder MN.** The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 2006; 124: 815-822.

14. **Bowdish DM, Davidson DJ, Hancock RE.** A re-evaluation of the role of host defense peptides in mammalian immunity. *Curr Protein Pept Sci* 2005; 6: 35-51.
15. **Muñiz C, Steinman RM, Fujii SI.** Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2005; 202: 203-207.
16. **Fujii SI, Liu K, Dmith C, Bonito AJ, Steinman RM.** The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J Exp Med* 2004; 199: 1607-1618.
17. **Mekori YA, Metcalfe DD.** Mast cells in innate immunity. *Immunol Rev* 2000; 73:131-140.
18. **Mold C, Du Clos, TW.** C-reactive protein increases cytokine responses to *Streptococcus pneumoniae* through interactions with Fc gamma receptors. *J Immunol* 2006; 176: 7598-7604.
19. **Arinobu Y, Iwasaki H, Gurish M F, Mizuno S, Shigematsu H, Ozawa H, Tenen DG, Austen KF, Akashi K.** Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *PNAS* 2005; 102: 18105-18110.
20. **Rothenberg ME, Mishra A, Barndt EB, Hogan SP.** Gastrointestinal eosinophils. *Immunol Rev* 2001; 179: 139-155.
21. **Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW.** The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res* 2003; 34: 597-627.
22. **Laskay T, Van Zandbergen G, Solbah W.** Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol* 2003; 11: 210-214.
23. **Reece JJ, Siracusa MC, Scott AL.** Innate immune responses to lung-stage helminth infection induce alternatively activated alveolar macrophages. *Infect Immun* 2006; 74: 4970-4981.
24. **Han J, Ulevitch RJ.** Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nature Immunol* 2005; 6: 1198-1205.
25. **Esche C, Stellato C, Beck LA.** Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 615-628.
26. **Mackay CR, Sallusto F.** A new role for CCR5 in innate immunity – binding to bacterial heat shock protein 70. *Eur J Immunol* 2006; 36: 2293-2295.

27. **Goff WL, Johnson WC, Horn RH, Barrington GM, Knowles DP.** The innate immune response in calves to *Boophilus microplus* tick transmitted *Babesia bovis* involves type-1 cytokine induction and NK-like cells in the spleen. *Parasite Immunol* 2003; 25: 185-188.
28. **Leitner WW, Bergmann-Leitner ES, Hwang LN, Restifo NP.** Type I interferons are essential for the efficacy of replicase-based DNA vaccines.
29. **Endo Y, Takahashi M, Fujita T.** Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology*, 2006; 211: 283-293.
30. **Frederiksen PD, Thiel S, Larsen CB, Jensenius JC.** M-ficolin, an innate immune defence molecule, binds patterns of acetyl groups and activates complement. *Scand. J Immunol* 2005; 62: 462-473.
31. **Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A, Mantovani A.** Pentraxins at the crossroad between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 337-366.
32. **Mulhoff G.** Heat shock proteins in immunity. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 172: 279-304.
33. **Bernardes ES, Silva N M, Ruas LP, Mineo JR, Loyola AM, Hsu DK, Liu FT, Chammas R, Roque-Barreira MC.** *Toxoplasma gondii* infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. *Am J Pathol* 2006; 168: 1910-1920.
34. **Bautista – Garfias CR, Mosqueda – Gualito JJ.** Papel de los receptores tipo toll en la inmunidad innata y su implicación en medicina veterinaria. *Vet Mex* 2005; 36: 453-468.
35. **Dziarski R, Gupta D.** Mammalian PGRPs: novel antimicrobial proteins. *Cell Microbiol* 2006; 8: 1059-1069.
36. **Creagh EM, O'Neill LAJ.** TLRs NLRs, RLRs. A trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* 2006; 27: 352-357.
37. **Wu D, Xing GW, Poles MA, Horowitz A, Kinjo Y, Sullivan B, Bodmer-Narkevitch V, Plettenburg O, Kronenberg M, Tsuji M, Ho DD, Wong CH.** Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells. *PNAS* 2005; 102: 1351-1356.
38. **Baratin M, Roetyneck S, Lepolard C, Falk C, Sawadogo S, Uewmatsu S, Akira S, Riffel B, Tiraby JG, Alexopoulou L, Kirsching C, Gysin J, Vivier E, Ugolini S.** Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-

- dependent innate responses to *Plasmodium falciparum*. Proc Nat Acad Sci USA 2005; 102: 14747-14752.
39. **Roland J, Solulard V, Sellier C, Drapier A M, Di Santo JP, Cazenave PA, Pied S.** NK cell responses to *Plasmodium* infection and control of intra-hepatic parasite development. J Immunol 2006; 177: 1229-1239.
 40. **Degli-Esposti MA, Smyth MJ.** Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. Nature Rev Immunol 2005; 5: 112-124.
 41. **Endsley JJ, Endsley MA, Estes DM.** Bovine natural killer cells acquire cytotoxic/effector activity following activation with IL-12/15 and reduce *Mycobacterium bovis* BCG in infected macrophages. J Leukocyte Biol 2006; 79: 71-79.
 42. **Steinman RM.** Dendritic cells mobilize NKT lymphocytes as adjuncts and adjuvants for anti-tumor immunity. Cancer Immunol 2006; 6 (Sup 1): 22.
 43. **Tagawa T, Nishimura H, Yajima T, Hara H, Kishihara K, Matsuzaki G, Yoshino I, Maehara Y, Yoshikai Y.** V(delta)1+gammadelta T cells producing CC chemokines may bridge a gap between neutrophils and macrophages in innate immunity during *Escherichia coli* infection in mice. J Immunol 2004; 173: 5156-5164.
 44. **Holtmeier W, Kabelitz D.** Gammadelta T cells link innate and adaptive immunity. Che Immunol Allergy 2005; 86: 151-183.
 45. **Shrestha N, Ida JA, Lubinski AS, Pallin M, Kaplan G, Haslett PAJ.** Regulation of acquired immunity by T-cell/dendritic-cell interactions. Ann NY Acad Sci 2005; 1062: 79-94.
 46. **Zocchi MR, Poggi A.** Role of gammadelta T lymphocytes in tumor defense. Front Biosci 2004; 9: 2588-2604.
 47. **Hedges JF, Lubick KJ, Jutila MA.** T cells respond directly to pathogen-associated molecular patterns. J Immunol 2005; 174: 6045-6053.
 48. **Yasuda M, Ogawa D, Nasu T.** Kinetics and distribution of bovine T-lymphocyte in the intestine: T cells accumulate in the dome region of Peyer's patch during prenatal development. Devel Comp Immunol 2005; 29: 555-564.

49. **Licastro F, Candore G, Lio D, Porcellini Colonna-Romano G, Franceschi C, Caruso C.** Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Imm Ageing* 2005; 2: 8-21.
50. **Serhan CN, Savill J.** Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunol* 2005; 6: 1191-1197.
51. **Bettelli E, Oukka M, Kuchroo V.** TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 2007; 8: 345-350.
52. **Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR.** Autoimmune inflammation from the TH17 perspective. *Autoimmun Rev* 2007; 6: 169-175.
53. **Mosmann TR, Coffman RL.** TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-173.
54. **Iwakura Y, Ishigame H.** The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006; 116: 1218-1222.
55. **Stumhofer Js, Laurence A, Wilson EH, Huang E, Tato CM, Johnson LM, Villarino AV, Huang Q, Yoshimura A, Sehy D, Saris CJM, O'Shea JJ, Hennighausen L, Ernst M, Hunter CA.** Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 176-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol* 2006; 7: 937-945.
56. **Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ.** Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 221-242.
57. **Ganz T.** Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 710-720.
58. **Kougias P, Chai H, Lin PH, Yao Q, Lumsden AB, Chen C.** Defensins and cathelicidins: Neutrophil peptides with roles in inflammation, hyperlipidemia and atherosclerosis. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 3-10.
59. **Klotman ME, Chang TL.** Defensins in innate antiviral immunity. *Nature Rev Immunol* 2006; 6: 447-456.
60. **Dil N, Qureshi MA.** Differential expression of inducible nitric oxide synthase is associated with differential Toll-like receptor-4 expression in chicken macrophages from different genetic backgrounds. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; 84: 191-207.

61. **Barak O, Treat JR, James W D.** Antimicrobial peptides: effectors of innate immunity in the skin. *Adv Dermatol* 2005; 21: 357-374.
62. **Schroder JM, Harder J.** Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 469-486.
63. **Liu FT.** Galectins: a new family of regulators of inflammation. *Clin Immunol* 2000; 97: 79-88.
64. **Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S.** Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol* 2002; 23: 313-320.
65. **Liu FT.** Regulatory roles of galectins in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136: 385-400.
66. **Chen HY, Liu FT, Yang RY.** Roles of galectin-3 in immune responses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005; 53: 497-504.
67. **Nieminen J, St-Pierre C, Sato S.** Galectin-3 interacts with naive and primed neutrophils, inducing innate immune responses. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 1127-1135.
68. **Whittall T, Wang Y, Younson J, Kelly C, Berqmeier L, Peters B.** LeHInteraction between the CCR5 chemokine receptors and microbial HSP70. *Eur J Immunol* 2006; 36: 2304-2314.
69. **Tsan MF, Gao B.** Heat shock protein and innate immunity. *Cell Mol Immunol* 2004; 1: 274-279.
70. **Gill N, Rosenthal KL, Ashkar AA.** NK and NKT cell-independent contribution of interleukin-15 to innate protection against mucosal viral infection. *J Virol* 2005; 79: 4470-4478.
71. **Habich C, Kempe K, Burkart V, van der Zee R, Lillicrap M, Gaston H, Kolb H.** Identification of the heat shock protein 60 epitope involved in receptor binding on macrophages. *FEBS Lett* 2004; 568: 65-69.
72. **Habich C, Kempe K, van der Zee R, Rumenepef R, Akiyama H, Kolb H, Burkart V.** Heat shock protein 60: Specific binding of lipopolysaccharide. *J Immunol* 2005; 174: 1298-1305.
73. **Vega VL, De Maio A.** Increase in phagocytosis after geldamycin treatment of heat shock; role of heat shock proteins. *J Immunol* 2005; 15: 5280-5287.

74. **Jiang H, Robery FA, Gewurz H.** Localization of sites through which C-reactive protein binds and activates complement to residues 14-26 and 76-92 of the human C1q A chain. *J Exp Med* 1992; 175: 1373-1379.
75. **Black S, Kushners I, Samols D.** C-reactive protein. *J Biol Chem* 2004; 279: 48487-48490.
76. **Mold C, Rodriguez W, Rodic-Polic B, Du Clos TW.** C-Reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with FcR. *J Immunol* 2002; 169: 7019-7025.
77. **Fujita T, Matsushita M, Endo Y.** The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev* 2004; 198: 185-202.
78. **Seelen MAJ, Roos A, Daha MR.** Role of complement in innate and autoimmunity. *J Nephrol* 2005; 18: 642-653.
79. **Matsushita M, Endo Y, Fujita T.** Cutting edge: Complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol* 2000; 164: 2281-2284.
80. **Ma YG, Cho MY, Zhao M, Park JW, Matsushita M, Fujita T, Lee BL.** Human mannose-binding lectin and L-ficolin function as specific pattern recognition proteins in the lectin activation pathway of complement. *J Biol Chem* 2004; 279: 25307-25312.
81. **Matsushita M, Fujita T.** 2001 Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol Rev* 2001; 180: 78-85.
82. **Murayama H, Galvan M, Waffarn F, Tenner AJ.** Human cord blood leukocyte innate immune responses to defense collagens. *Pediatr Res* 2003; 54:724-731.
83. **Selander B, Martensson U, Weintraub A, Holmstrom E, Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, Truedsson L, Sjöholm AG.** Mannan-binding lectin activates C3 and the alternative complement pathway without involvement of C2. *J Clin Invest* 2006; 116: 1425-1434.
84. **Atkinson JP, Frank MM.** Bypassing complement: evolutionary lessons and future implications. *J Clin Invest* 2006; 116: 1215-1218.
85. **Kerr AR, Paterson GK, Riboldi-Tunncliffe A, Mitchell TJ.** Innate immune defense against pneumococcal pneumonia requires pulmonary complement component C3. *Infect Immun* 2005; 73: 4245-4252.
86. **Kohl J.** The role of complement in danger sensing and transmission. *Immunol Res* 2006; 34: 157-176.

87. **Janssens S, Beyaert R.** Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 637-646.
88. **Ozato K, Tsujimura H, Tamura T.** Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system. *Biotechniques* 2002; 33: S66-S75.
89. **Werling D, Hope JC, Howard CJ, Jungi TW.** Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology* 2004; 111: 41-52.
90. **Medzhitov R.** Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 134-145.
91. **Paterson HM, Murphy TJ, Purcell EJ, Shelley O, Kriynovich SJ, Lien E, Mannick JA, Lederer JA.** Injury primes the innate immune system for enhanced Toll-like receptor reactivity. *J Immunol* 2003; 171: 1473-1483.
92. **Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik S, et al.** Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006;
93. **Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE et al.** TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med* 2005; 11: 653-660.
94. **Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R.** Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 11:229-241.
95. **Abreu M T, Fukata M, Arditi M.** TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* 2005, 174: 4453-4460.
96. **Bauer E, Williams BA, Smidt H, Verstegen MWA, Mosenthin R.** Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Curr Issues Intestinal Microbiol* 2006; 7: 35-52.
97. **Kumar A, Yu FSX.** Toll-like receptors and corneal innate immunity. *Curr Mol Med* 2006; 6: 327-337.
98. **Noble PW, Jiang D.** Matrix regulation of lung injury, inflammation and repair. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 401-404.
99. **Werling D, Piercy J, Coffrey TJ.** Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine-presenting cells. Potential role in pathogen discrimination? *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 112: 2-11.

100. **Iwasaki A, Medzhitov R.** Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunol* 2004; 5: 987-995.
101. **Iqbal M, Philbin VJ, Smith AL.** Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 104: 117-127.
102. **Werling D, Jungi TW.** TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 91: 1-12.
103. **Liu Y, Wang Y, Yamakuchi M, Isowaki S, Nagata E, Kanmura Y.** Upregulation of toll-like receptor 2 gene expression in macrophage response to peptidoglycan and high concentration of lipopolysaccharide is involved in NF-kappa b activation. *Infect Immun* 2001; 69: 2788-2796.
104. **Fukui A, Inoue N, Matsumoto M, Nombra M, Yamada K, Matsuda Y.** Molecular cloning and functional characterization of chicken toll-like receptors. A single chicken toll covers multiple molecular patterns. *J Biol Chem* 2001; 276: 47143-47149.
105. **Martin T R, Frevert CW.** Innate Immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc*, 2005; 2: 403-411.
106. **Asahina Y, Yoshioka N, Kano R, Moritomo T, Hasegawa A.** Full-length cDNA cloning of Toll-like receptor 4 in dogs and cats. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 96: 159-167.
107. **Ainsworth DM, Wagner B, Franchini M, Grunig G, Erb HN, Tan JY.** Time-dependent alterations in gene expression of interleukin-8 in the bronchial epithelium of horses with recurrent airway obstruction. *Am J Vet Res* 2006; 67: 669-677.
108. **Shimosato T, Kitazawa H, Katoh S, Tomioka Y, Karima R, Ueha S, et al.** Swine Toll-like receptor 9(1) recognizes CpG motifs of human cell stimulant. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1627: 56-61.
109. **Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, et al.** A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; 303: 1522-1526.
110. **Sacks D, Sher A.** Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature Immunol* 2002; 3: 1041-1047.
111. **Denkers WY, Butcher BA.** Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends in Parasitol* 2006; 21: 35-41.

112. **Babu S, Blauvelt CP, Kuramswami V, Nutman TB.** Regulatory networks induced by live parasites impair both Th1 and Th2 pathways in patent lymphatic filariasis: implications for parasite persistence. *J Immunol* 2006; 176: 3248-3256.
113. **Titus RG, Bishop JV, Mejia JS.** The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential of these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol* 2006; 28: 131-141.
114. **Fasciano S, Li L.** Intervention of Toll-like receptor-mediated human innate immunity and inflammation by synthetic compounds and naturally occurring products. *Curr Med Chem* 2006; 13: 1389-1395.
115. **Schiller M, Metze D, Lugar TA, Grabbe S, Gunzer M.** Immune response modifiers – mode of action. *Exp Dermatol* 2006; 15: 331-341.
116. **Borsutzky S, Kretschmer K, Becker PD, Muhlradt PF, Kirschning CJ, Weiss S, Guzman CA.** The mucosal adjuvant macrophage-activating lipopeptide-2 directly stimulates B lymphocytes via the TLR2 without the need of accessory cells. *J Immunol*, 2005; 174: 6308-6313.
117. **Tada H, Aiba S, Shibata KI, Ohteki T, Takada H.** Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with Toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun* 2005; 73: 7967-7976.
118. **Neutra MR, Kozlowski PA.** Mucosal vaccines: the promise and the challenge, *Nature Rev Immunol* 2006; 6: 148-158.
119. **Seya T, Akazawa T, Tsujita T, Matsumoto M.** Role of Toll-like receptors in adjuvant-augmented immune therapies. *eCAM*: 2006; 3: 31-38.
120. **Maldonado Galdeano C, Perdigón G.** The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin Vacc Immunol* 2006; 13: 219-226.
121. **Christensen HR, Frokiaer H, Pestka J.** Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface makers in murine dendritic cells. *J. Immunol* 2002; 168: 171-178.
122. **Drakes M, Blanchard T, Czinn S.** Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infect Immun* 2004; 72: 3299-3309.

123. **Hanniffy S, Wiedermann U, Repa A, Mercenier A, Daniel C, Fioramonti J, et al.** Potential and opportunities for use of recombinant lactic acid bacteria in human health. *Adv Appl Microbiol* 2004; 56: 1-64.
124. **Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, Ruthel G, Demmin GL, Warfiel K L, Bavari S, Klaenhammer TR.** Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *PNAS* 2005; 102: 2880-2885.
125. **Bautista-Garfias CR, Ixta-Rodríguez O, Martínez-Gómez F, López MG, Aguilar-Figueroa BR.** Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis* infection. *Parasite*, 2001; 8: S226-S228.
126. **Bautista-Garfias CR, Gómez MB, Aguilar BR, Ixta O, Martínez F, Mosqueda J.** The treatment of mice with *Lactobacillus casei* induces protection against *Babesia microti* infection. *Parasitol Res* 2005; 97: 472-477.
127. **Bautista- Garfias CR, Arriola -González MT, Trejo- Castro L, Ixta-Rodríguez O, Rojas- Ramírez E.** Comparación entre el efecto de *Lactobacillus casei* y el de una vacuna comercial en pollos contra la coccidiosis. *Téc Pec Méx* 2003; 41: 317-327.
128. **Bautista- Garfias CR, Posadas A, Ixta O.** Inmunización de ratones BALB/c con un antígeno de larvas musculares de *Trichinella spiralis* utilizando *Lactobacillus casei* como adyuvante. *Vet Mex* 2004; 35: 359-368.
129. **Bautista CR, Giles I, Montenegro N, Figueroa JV.** Immunization of bovines with concealed antigens from *Haematobia irritans*. *Ann NY Acad Sci* 2004; 1026: 284-288.
130. **Honda K, Taniguchi T.** IRFs: masters regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature Rev Immunol* 2006; 6: 644-659.
131. **O'Neill LAJ, Bowie A.** The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 353-364.
132. **Gazzinelli RT, Denkers EY.** Protozoan encounters with Toll-like receptor signaling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:895-906.
133. **De Veer MJ, Kemp JM, Meeusen ENT.** The innate host defense against nematodo parasites. *Parasite Immunol* 2007; 29: 1-9.

134. **Levy O.** Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Immunol* 2007; 7: 379-390.
135. **Cristofaro P, Opal SM.** Role of Toll-like receptors in infection and immunity. *Drugs* 2006; 66: 15-29.

Ciencia Veterinaria

Volumen 10

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Se terminó de imprimir en Noviembre de 2007,
en Publidisa Mexicana SA de CV,
Calzada Chabacano N° 69, Planta Alta,
Colonia Asturias Deleg. Cuahémoc, 06850, México D.F.
Tel. +52 55 5740 9040.

El tiraje de esta impresión consta de 300 ejemplares,
más sobrantes para reposición.

Forros impresos en cartulina sulfatada de 240 grs.
Interiores en papel bond de 90 grs.