



- 9 Nutritional characterization and ruminal degradation kinetics of some forages with potential for ruminants supplementation in the highland tropics of Colombia.

Caracterización nutricional y de la cinética de degradación ruminal de algunos de los recursos forrajeros con potencial para la suplementación de rumiantes en el trópico alto de Colombia.

- 21 Evaluation of canine semen that has gone through a freezing and thawing process with different glycerol concentrations as a crioprotector.

Evaluación del semen canino, sometido a congelación con diferentes concentraciones de glicerol como crioprotector.

- 32 Effect of rotary plows on some physical properties of a clay loam soil.

Efecto de los arados rotativos sobre algunas propiedades físicas de un suelo franco arcilloso.

- 46 Quantification techniques of the protein microbial synthesis in rumen: a review.

Técnicas de quantificação da síntese microbiana no rúmen: uma revisão.

- 55 Important considerations about *in vitro* production of equine embryos.

Consideraciones importantes acerca de la producción *in vitro* de embriones equinos.

- 65 Toxicity with phenylbutazone in a horse: a case report.

Intoxicación con fenilbutazona en un equino: reporte de un caso.

Indizada en:

Categoría B en PUBLINDEX, LATINDEX, DIALNET, DOAJ, REVIVEC, IMBIOMED, Washington State University Libraries, ULRICH WEB, Biblioteca del Instituto de Biotecnología (UNAM), PERIODICA, EBSCO, PROQUEST, Gale Thomson, AGRIS, PKP Public Knowledge Project



UNIVERSIDAD CES

Un Compromiso con la Excelencia

Resolución del Ministerio de Educación Nacional No. 1371 del 22 de marzo de 2007

REVISTA CES MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA (ISSN: 1900-9607)

*Órgano oficial de difusión científica de la facultad de
Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad CES
Medellín – Colombia*

Indizada en:

Categoría B en PUBLINDEX, LATINDEX, DIALNET, DOAJ, REVIVEC, IMBIOMED,
Washington State University Libraries, ULRICH WEB, Biblioteca del
Instituto de Biotecnología (UNAM), PERIODICA, EBSCO, PROQUEST,
Gale Thomson, AGRIS, PKP Public Knowledge Project.

DIRECTIVOS CES

JOSÉ MARÍA MAYA MEJÍA
Rector

SANTIAGO HENAO VILLEGAS
Decano facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

DIRECTOR

Gregory Mejía Sandoval, Ing. Agr, Esp, Msc, cPhD.

EDITORES TÉCNICOS

Jhon Didier Ruiz Buitrago, MV, Msc, cPhD.
Héctor Augusto Jiménez Arboleda, Ing. Forestal, MV.

CARTAS AL EDITOR



COMITÉ CIENTÍFICO

Miguel Cerezo García, Lic. Biol, Ph.D, Posdoc
Universidad de Jaume I de Castellón, España.

Pablo Otero, MV, Ph.D.
Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Mónica G. Agnusdei, Ing. A, MsC, Ph.D. INTA
(Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria),
Balcarce, Argentina.

Patricio Retamal, MV, MsC, Ph.D. Pontificia
Universidad Católica de Chile, Chile.

Esmeralda Lon Wo Chansay, MV, Ph.D.
Instituto de Ciencia Animal (ICA), Cuba.

Juan Guillermo Maldonado, MVZ, Ph.D.
Universidad de Antioquia, Colombia.

Juan David Rodas Gonzáles, MV, Ph.D.
Universidad de Antioquia, Colombia.

Rolando Barahona Rosales, Z, Ph.D.
Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

Luis Fernando Uribe, MV, Ph.D.
Universidad de Caldas, Colombia.

Ruth Rebeca Bonilla Buitrago, Biol, Ph.D.
CORPOICA, Colombia.

COMITÉ EDITORIAL

Enrico Lippi Ortolani, MV, PhD, Posdoc.
Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Carlos Julio Márquez, I. Ag, Ph.D.
Universidad Nacional, Colombia.

Juan Gonzalo Morales Osorio, I.A, PhD.
Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

María Solange Sánchez, I.A, PhD.
Grupo Nutresa, Colombia.

Paul W. Paré, B.A. en Ch, PhD. Posdoc.
Universidad de Texas Tech, USA.

Aurora Romero Tejeda, MV, PhD.
Instituto de enfermedades infecciosas de Legnaro, Italia.

Guillermo Gervasini, MV, PhD.
Universidad de Extremadura, España.



INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

*Publicar en español
publicar en inglés y portugués*

MAESTRÍA EN PEQUEÑAS ESPECIES ANIMALES

http://www.ces.edu.co/Nuevo_Posgrados_Maestrias.aspx

EDUCACIÓN CONTINUA

http://www.ces.edu.co/Nuevo_EContinuada_Veterinaria.aspx

CONTENIDO

ARTÍCULOS ORIGINALES DE INVESTIGACIÓN

Nutritional characterization and ruminal degradation kinetics of some forages with potential for ruminants supplementation in the highland tropics of Colombia

9

Caracterización nutricional y de la cinética de degradación ruminal de algunos de los recursos forrajeros con potencial para la suplementación de rumiantes en el trópico alto de Colombia

Juan Fernando Naranjo, Zoot, ePhD.
César A Cuartas, Zoot, cPhD.

Evaluation of canine semen that has gone through a freezing and thawing process with different glycerol concentrations as a crioprotector

21

Evaluación del semen canino, sometido a congelación con diferentes concentraciones de glicerol como crioprotector

Rubén Uribe Valderrama, MV, MSc.
María Elena Arango Rodríguez, MV.
Laura Rendón Álvarez, MV.
Carlos Mauricio Acevedo Naranjo, MV.

Effect of rotary plows on some physical properties of a clay loam soil

32

Efecto de los arados rotativos sobre algunas propiedades físicas de un suelo franco arcilloso

Samir Safar, I. Agrónomo.
Hugo González, I.A, cPhD.
Nelson Luis Cappelli, I.A, PhD.

46 **Quantification techniques of the protein microbial synthesis in rumen: a review**

Técnicas de quantificação da síntese microbiana no rúmen: uma revisão

Román David Castañeda Serrano, MVZ.
Lina María Peñuela Sierra, MVZ.

55 **Important considerations about *in vitro* production of equine embryos**

Consideraciones importantes acerca de la producción *in vitro* de embriones equinos

Giovanni Restrepo Betancur, MV, Zoot, MSc.
Sara Restrepo Escobar, Ing. Agrop.

CASO CLÍNICO

65 **Toxicity with phenylbutazone in a horse: a case report**

Intoxicación con fenilbutazona en un equino: reporte de un caso

Jorge Mario Cruz Amaya, MV, PhD.
Luis Mauricio Montoya Flórez MVZ.

El 2011: año de gran significado para nuestra profesión y Facultad

En el 2011 los médicos veterinarios zootecnistas celebramos los 250 años del nacimiento de la profesión. También este año la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia cumple su primera década de vida. Ambos aniversarios son motivo para celebrar los logros, pero más importante es fijar ahora nuevos horizontes para nuestro programa y para el desarrollo del sector.

En la ceremonia de lanzamiento del Año Mundial de la Medicina Veterinaria, el doctor Bernard Vallat, Director General de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), declaró: “Todo el mundo sabe que los veterinarios son los médicos de los animales, pero pocos son conscientes de que realmente cumplen una función fundamental en la prevención y control de las enfermedades infecciosas de los animales, entre ellas, las transmisibles al hombre, el bienestar animal, la producción alimentaria o la inocuidad de los alimentos. Este año es una oportunidad muy especial para rendir homenaje a la contribución cotidiana de los veterinarios a la sociedad civil que representa un bien público mundial”.

Menciono dos hechos que sin duda alguna se convierten en retos grandes para que nuestra profesión avance con la celeridad que la humanidad lo exige. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estima que unas 920 millones de personas en el mundo sufren de hambre y desnutrición, un 13,2% de la población mundial. Un segundo hecho, no menos importante, es que el 60% de las epidemias humanas son causadas por patógenos que se encuentran en los animales.

La falta de médicos veterinarios zootecnistas en el mundo es un importante factor restrictivo para la seguridad e inocuidad alimentaria mundial y como Universidad tenemos el gran reto de aportar con profesionales de alta calidad, que ayuden a reducir la brecha socioeconómica de la población rural, a que se disminuyan los niveles de pobreza y hambre, a realizar investigaciones epidemiológicas exhaustivas que ayuden a evitar nuevas epidemias en el ámbito mundial.

Desde nuestra Facultad rendimos un homenaje a todos los profesionales que en su vida diaria realizan un trabajo ético, honesto y que hacen que la medicina veterinaria y la zootecnia sean profesiones dignas e influyentes en el desarrollo socioeconómico del país.

Santiago Henao Villegas

Decano de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Universidad CES

2011: A year of great significance for our profession and Faculty

In 2011, we animal husbandry veterinary physicians celebrate 250 years of the birth of the profession. Also this year the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry reaches its first decade of life. Both anniversaries are motivation to celebrate the accomplishments, but more importantly focus on new horizons for our program and the development of this field.

At the opening ceremony to the World Veterinary Year, Dr. Bernard Vallat, Director General of the World Organization for Animal Health (OIE), stated: "Everybody knows that veterinarians are the physicians of animals, but few are aware that they play a fundamental role in the prevention and control of infectious diseases in animals, including those that are transmissible to humans, animal welfare, food production and food safety. This year is a special opportunity to pay tribute to the daily contribution of veterinarians to civil society that represents a global public good.

I would like to mention two facts that without a doubt are becoming important challenges for our profession to advance with the swiftness that humanity demands. The Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations estimates that approximately 920 million people in the world suffer from hunger and malnutrition, 13.2% of the world population. A second fact, of no less importance, is that 60% of human epidemics are caused by pathogens that are found in animals.

The lack of animal husbandry veterinary physicians in the world is an important limiting factor to the security and safety of world food supplies and as a University we are faced with the great challenge of providing high quality professionals, in order to help to reduce the socioeconomic breach of rural populations, in order to decrease the levels of poverty and hunger, to perform exhaustive epidemiological research that will help avoid new epidemics on a global scale.

From our Faculty we pay tribute to all those professionals that in their daily lives perform ethical, honest work and who ensure that veterinary medicine and animal husbandry are dignified and influential professions in socioeconomic development.

Santiago Henao Villegas

Dean of faculty of Veterinary and Zootechnic
Universidad CES

Nutritional characterization and ruminal degradation kinetics of some forages with potential for ruminants supplementation in the highland tropics of Colombia*

Caracterización nutricional y de la cinética de degradación ruminal de algunos de los recursos forrajeros con potencial para la suplementación de rumiantes en el trópico alto de Colombia

Caracterização nutricional e cinética de degradação ruminal de alguns dos recursos forrageiros com potencial para o suplementação de gado na nas regiões tropicais de altitude da Colômbia

Juan F Naranjo¹*, Zoot, ePhD; César A Cuartas², Zoot, cPhD

*Autor para correspondencia: Juan Fernando Naranjo. Calle 42#74-79. Barrio Laureles. Medellín. Colombia.
Correo electrónico: jnaranjo@cipav.org.co

¹ Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria. CIPAV. Carrera 2a Oeste 11-54, Cali, Colombia. Teléfono (57) (2) 8930931, Fax (57) (2) 8935535.

² Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción. Agropecuaria. CIPAV. Carrera 2a Oeste 11-54, Cali, Colombia. Teléfono (57) (2) 8930931, Fax (57) (2) 8935535.

(Recibido: 17 de septiembre, 2010; aceptado: 20 de mayo, 2011)

Abstract

The aim of this study was to characterize the nutritional quality of nine forage resources: Comfrey (*Symphytum peregrinum*), White Mulberry (*Morus alba*), Sleeping Hibiscus (*Malvaviscus penduliflorus*), Nacadero (*Trichanthera gigantea*), tree marigold (*Tithonia diversifolia* Hemsl.) Gray, Ramie (*Boehmeria nivea* L.) Gaud, Arboloco (*Montanoa quadrangularis* Bipontinus Schultz), Chachafruto (*Erythrina edulis* Triana ex Michelle) and Andean Alder (*Alnus acuminata* Kunth), with potential for inclusion in strategic supplementation programs in the highland tropics of Colombia. The forages that showed the highest levels of PC were Comfrey (28,42%), Chachafruto (26,52%), Arboloco (26,35%) and those that showed the lowest were the Sleeping Hibiscus (15,92%) and Andean Alder (16,88%). The

*Para citar este artículo: Naranjo JF, Cuartas CA. 2011. Caracterización nutricional y de la cinética de degradación ruminal de algunos de los recursos forrajeros con potencial para la suplementación de rumiantes en el trópico alto de Colombia. Rev CES Med Vet Zootec. Vol 6 (1): 9-19

lowest NDF contents were presented by White Mulberry (33,55%) and Andean Alder (35,79%) while the highest were observed for Chachafruto (49,64%) and Ramie (48,54%). The nutrient content of forages evaluated can be included in supplementation programs, due to they can enhance the energy density of the diet and may increase dry matter intake.

Key Words

Degradation, nutrition, rumen, supplementation, tropics.

Resumen

El objetivo de este estudio fue caracterizar la calidad nutricional de nueve recursos forrajeros: Consuelda (*Symphytum peregrinum*), Morera (*Morus alba*), San Joaquín (*Malvaviscus penduliflorus*), Nacedero (*Trichanthera gigantea*), Botón de oro (*Tithonia diversifolia* Hemsl. Gray), Ramio (*Boehmeria nivea* L. Gaud), Arboloco (*Montanoa quadrangularis* Bipontinus Schultz), Chachafruto (*Erythrina edulis* Triana ex Michelle) y Aliso (*Alnus acuminata* Kunth), con potencial para su inclusión en los programas de suplementación estratégica en el trópico de altura en Colombia. Los forrajes que mostraron los mayores niveles de Proteína Cruda (PC) fueron Confrey (28,42%), Chachafruto (26,52%), Arboloco (26,35%) y los que mostraron los más bajos fueron San Joaquín (15,92%) y Aliso (16,88%). Los contenidos más bajos de Fibra en Detergente Neutro (FDN) los presentaron Morera (33,55%) y Aliso (35,79%), mientras que los más altos se observaron para Chachafruto (49,64%) y Ramio (48,54%). Los contenidos de nutrientes de los forrajes evaluados pueden incluirse en planes de suplementación ya que mejoran la densidad energética de la dieta y podrían incrementar el consumo de materia seca.

Palabras Clave

Degradación, nutrición, rumen, suplementación, trópico.

Resumo

O objetivo deste estudo foi caracterizar a qualidade nutricional de nove recursos forrageiros: Confrei (*Symphytum peregrinum*), amoreira (*Morus alba*), San Joaquín (*Malvaviscus penduliflorus*), Nacedero (*Trichanthera gigantea*), Botón de oro (*Tithonia diversifolia* Hemsl. Gray), rami (*Boehmeria nivea* L. Gaud), Arboloco (*Montanoa quadrangularis* Bipontinus Schultz), chachafruto (*Erythrina edulis* Triana ex Michelle) e Amieiros (*Alnus acuminata* Kunth), com potencial para sua inclusão em programas de suplementação estratégica nas regiões tropicais de altitude da Colômbia. As forrageiras que apresentaram os maiores níveis de PC foram Confrei (28,42%), Chachafruto (26,52%), Arboloco (26,35%) e as que mostraram os menores níveis foram a San Joaquín (15,92%) e Amieiros (16,88%). Os menores teores de FDN estavam na Amoreira (33,55%) e Amieiros (35,79%), enquanto os mais altos foram observados para Chachafruto (49,64%) e Rami (48,54%). Os conteúdos de nutrientes das forrageiras avaliadas foram incluídos nos planos de suplementação já que aumentam a densidade energética da dieta e podem aumentar a ingestão de matéria seca.

Palabras Clave

Degradação, nutrição, rumen, suplementação, trópicos.

Introducción

El factor más importante que influye en la respuesta de la producción de un animal es la cantidad total de nutrientes absorbidos. Por tanto, el consumo y la digestibilidad son parámetros clave en cualquier sistema de evaluación de alimentos³⁷. La digestibilidad y utilización de nutrientes son, en este sentido, una descripción cualitativa del consumo neto de alimentos⁴². Adicional a la composición química, se han desarrollado varios métodos para caracterizar los recursos alimenticios en términos de su digestibilidad. Dichos métodos comprenden procedimientos *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. Las mediciones *in vivo* proporcionan una medición estándar de la digestibilidad ya que representan la respuesta del animal a la dieta actual.

Con el propósito de reducir las dificultades en las rutinas de laboratorio y de mejorar la precisión de las pruebas, en los últimos años se han desarrollado un importante número de pruebas *in vitro* e *in situ* (digestibilidad enzimática, producción de gas y la técnica de las bolsas suspendidas en rumen) que permiten estimar la digestibilidad y la dinámica de la degradación ruminal de las fracciones nutricionales de los alimentos, con el fin de estudiar la variación en las respuestas ante cambios en las condiciones ruminales¹⁶.

La interpretación de la cinética de degradación de los alimentos para rumiantes ha tomado especial importancia en los sistemas de suplementación y un ejemplo específico es el caso de la proteína. Para hacer un uso adecuado de los sistemas de suplementación proteica, es necesario tener información acerca de la degradación ruminal de la proteína presente tanto en el forraje como en el suplemento. Los sistemas propuestos para calcular los requerimientos de proteína para rumiantes han reconocido la importancia de la degradación de la proteína en el rumen, como el principal factor que determina la cantidad de proteína que se absorbe en el intestino delgado^{1, 29}.

La calidad nutritiva de los forrajes influye significativamente en la producción animal bajo pastoreo de tal manera que los intentos para caracterizar todos

los recursos que componen la dieta de los bovinos en el trópico alto son de vital importancia para un adecuado ajuste de los planes de alimentación.

La utilización de alimentos concentrados en los sistemas de producción ganadera en el trópico de altura (clima frío) en Colombia es una práctica frecuente y en muchos casos indispensable dados los altos requerimientos nutricionales de los animales. El empleo de estos suplementos aumenta en gran medida los costos de producción y pueden generar disfunciones digestivas bajo condiciones intensivas de utilización.

La propuesta de incluir forrajeras en las dietas de ganaderías de trópico alto busca la reducción de los costos de producción, la incidencia de enfermedades metabólicas así como el incremento del desempeño productivo y reproductivo del animal.

Para considerar la inclusión de forrajes en dietas de rumiantes, es necesario conocer el valor nutricional y la calidad de los forrajes, el valor nutricional puede expresarse en términos de su composición química (concentración de nutrientes); y la calidad estará determinada por la digestibilidad, la naturaleza de los productos y la cinética de digestión que se espera sea expresada en consumo efectivo por los animales²⁵. Siguiendo estas consideraciones este trabajo se dirigió para dar cuenta de algunas características nutricionales y de calidad de forrajes que según su disponibilidad podrían ser incluidos en dietas de vacas lecheras.

En el presente estudio se caracterizaron nutricionalmente nueve recursos forrajeros promisorios: Confrey (*Symphytum peregrinum*), especie rastrera utilizada principalmente en la alimentación alternativa de conejos; Morera (*Morus alba*), es una especie arbustiva ampliamente empleada en el mundo para la alimentación de humanos y animales de todo tipo, por su gran valor nutricional; San Joaquín (*Malvaviscus penduliflorus*) arbustiva de uso principalmente ornamental; Nacedero (*Trichanthera gigantea*), arbustiva de uso común en alimentación de rumiantes y monogástricos; Botón de Oro (*Tithonia diversifolia* Hemsl. Gray), especie arbustiva utilizada en alimentación de rumiantes y en apicultura

por sus propiedades como melífera; Ramio (*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.), especie de porte bajo, utilizada principalmente en alimentación de cerdos; Arboloco (*Montanoa quadrangularis* Schultz Bipontinus), especie arbórea nativa (distribuida por todos los andes en el trópico) usada en restauración ecológica, artesanías y construcciones; Chachafruto (*Erythrina edulis* Triana ex Michelle), arbórea leguminosa uso tradicional en la alimentación campesina y Aliso (*Alnus acuminata* Kunth), arbórea de la familia Betulaceae fijadora de nitrógeno mediante la simbiosis con bacterias del género Frankia, utilizada como maderable y en procesos de restauración ecológica por su amplia adaptación al trópico de altura.

Materiales y métodos

Ubicación

Los recursos forrajeros evaluados fueron colectados de un banco mixto de forrajes con varios años de establecimiento, ubicados en el predio “Cien años de soledad” ubicada en la vereda el Tablazo, Municipio de Rionegro. El lugar de recolección presenta una altitud de 2450 m, temperatura promedio anual de 18 °C, precipitación promedio anual de 3150 mm. Según Holdridge (1967)¹⁷, la zona ecológica es bmh-MB (bosque muy húmedo montano bajo).

Muestras

Para cada una de las especies caracterizadas, se obtuvieron diferentes muestras correspondientes a diferentes alturas de la planta —la porción evaluada en todos los casos, fue el foliolo con el pecíolo—. El material vegetal colectado se secó en una estufa de aire forzado a 60 °C (aproximadamente 48 horas) y se molió con criba de 1 mm^{14, 23, 46}. El material seco y molido constituyó la muestra para la realización de los diferentes análisis.

Para las pruebas de degradabilidad se realizaron en el centro de producción agropecuaria Paysandú (de propiedad de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín) se emplearon dos vacas secas de la

raza Holstein de aproximadamente 650 kg, que se encontraban canuladas al rumen, con todos los permisos requeridos para su utilización como individuos de experimentación animal. Los animales fueron revisados por un médico veterinario, encontrando a que los animales no presentaban signos estado de salud. Las vacas se encontraban pastoreando pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) durante todo el tiempo de la prueba.

Métodos

Para la determinación de la degradabilidad se utilizó la metodología propuesta por Ørskov (2000)³¹ con nueve tiempos de incubación en el rumen: 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 horas, utilizando 4 repeticiones por cada tiempo. La introducción de bolsas en el rumen se realizó de forma invertida, es decir, las bolsas se sacaron al mismo tiempo y se lavaron simultáneamente de acuerdo a las recomendaciones hechas por Nocek (1987)²⁶. Todos los por menores pertinentes a la técnica se ejecutaron de acuerdo a los procedimientos descritos por el laboratorio del grupo Biotecnología Ruminal (BIORUM) de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín⁴.

Para cada tiempo de incubación se contó con cuatro bolsas de nylon (ANKOM Co, Faiport, NY, USA) de dimensión interna: 5 x 9 cm con tamaño de poro de 53 µm. En cada bolsa se depositaron cinco gramos del material. Las bolsas se secaron en estufa de aire forzado a 65 °C y posteriormente se utilizaron los residuos para realizar las determinaciones de MS.

La estimación de la FDN y la FDA se realizó en un digestor ANKOM® 200 (ANKOM Co, Faiport, NY, USA) según las metodologías propuestas por Van Soest (1994)⁴² y Van Soest y Robertson (1985)⁴⁴, y siguiendo los procedimientos sugeridos por el Laboratorio de Biotecnología Ruminal (BIORUM) de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín⁴ en donde también fueron llevadas a cabo dichas pruebas.

Las determinaciones de PC fueron realizadas en el laboratorio de suelos de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín; de acuerdo al método de Kjeldahl (2002)¹³.

Para estimar los parámetros de la cinética de degradación ruminal se utilizó el modelo matemático de Mitscherlich I¹⁹ modificado, teniendo en cuenta que es un modelo que recoge las características apropiadas para describir este tipo de procesos biológicos³¹.

Donde, D es la fracción degradada en el tiempo t de incubación, a el intercepto con el eje Y en $t=0$ y representa la fracción soluble o el sustrato rápidamente degradable, b representa el sustrato potencialmente degradable, kd es la constante de la cinética de degradación y c es el punto de inflexión. Este modelo se diferencia de otros modelos utilizados para hacer la caracterización de los parámetros de la cinética ruminal por incluir un parámetro adicional, que según Solano y Vargas (1997)³⁹ representa el punto de inflexión del modelo, es decir, el tiempo en el que comienza el crecimiento exponencial de la curva de degradación y que en otros modelos se asume como periodo pre-fermentativo (*lag*).

La estimación de los parámetros de cinética ruminal del modelo se realizó mediante el procedimiento SOLVER de Microsoft EXCEL[®] 2000 según el protocolo descrito por Correa (2004)⁸ para lo cual se utilizó el programa EXCEL de Microsoft Office[®].

Los datos fueron ajustados por regresiones no lineales mediante el procedimiento PROC NLIN iterando por el método de Marquardt con ayuda del programa estadístico SAS System Versión 8 (1999)

Resultados

La composición química de los forrajes tropicales está fuertemente afectada por las condiciones ambientales y por la calidad de los suelos (fundamentalmente deficientes en nitrógeno)^{3, 21, 36}. También afectan la calidad nutritiva, los altos contenidos de pared celular y los bajos de carbohidratos solubles^{3, 21, 28}.

En general, las gramíneas tropicales se caracterizan por un alto contenido de carbohidratos estructurales, bajos

contenidos de carbohidratos solubles y proteína total inferior al 7%^{7, 9, 32}. Los valores de digestibilidad no suele superar el 55%^{3, 42}. Los resultados del presente estudio indican que los recursos evaluados están en un rango de PC entre 15,92% (San Joaquín) y 28,42% (Confrey), los valores de FDN se presentaron entre 33,55% (Morera) y 49,64% (Chachafruto) (Tabla 1).

En la tabla 1 se presentan las características evaluadas de la composición química de los forrajes.

Tabla 1. Composición química de los recursos forrajeros evaluados en porcentaje (%) de la Materia Seca (MS), Proteína Cruda (PC), Fibra en Detergente Neutro (FDN), Fibra en Detergente Ácido (FDA).

<i>Forraje</i>	<i>MS</i>	<i>PC</i>	<i>FDN</i>	<i>FDA</i>
<i>A. acuminata</i>	23,6	16,88	35,79	31,06
<i>M. quadrangularis</i>	23,3	26,25	43,95	33,68
<i>T. diversifolia</i>	19,1	24,13	38,62	34,48
<i>E. edulis</i>	18,4	26,52	49,64	32,18
<i>S. peregrinum</i>	17,3	28,42	42,05	39,28
<i>M. alba</i>	24,6	24,77	33,55	32,7
<i>T. gigantea</i>	20,1	21,2	43,66	41,66
<i>B. nivea</i>	18,2	24,42	48,54	45,39
<i>M. penduliflorus</i>	19,5	15,92	43,78	24,58

Se ha sugerido que las especies forrajeras potencialmente utilizables para suplementar animales en el trópico deben contener niveles de proteína entre 15-30% (en base seca) 27, 32, 36. Los contenidos de proteína de los forrajes evaluados se encuentran en el rango sugerido.

Se reconoce que es posible mejorar el consumo de nutrientes en los animales, incrementando la digestibilidad de las fracciones potencialmente

digestibles o la velocidad de paso de las fracciones no digeribles en rumen^{3, 9, 15}, pero estas estrategias deben desarrollarse conociendo muy bien la cinética de los forrajes en su tránsito por el tracto digestivo de los

animales. En este estudio se describen los parámetros más importantes de la cinética de degradación nutricional (en porcentaje de la MS) (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros de la cinética de degradación ruminal en porcentaje (%) de la MS, la PC y la FDN estimados a partir del modelo matemático de Mitscherlich I modificado.

<i>Forraje</i>	<i>SM</i>				<i>PC</i>				<i>FDN</i>			
	<i>a</i>	<i>B</i>	<i>Kd</i>	<i>tC</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>kd</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>kd</i>	<i>C</i>
<i>A. acuminata</i>	23,71	24,71	0,06	2,59	0,00	32,31	0,05	2,28	0,00	20,17	0,09	26,45
<i>M. quadrangularis</i>	27,07	45,78	0,13	3,51	34,02	51,98	0,12	3,71	8,86	68,21	0,11	2,67
<i>T. diversifolia</i>	31,97	45,58	0,25	10,07	35,60	58,82	0,24	8,09	3,97	81,46	0,22	8,10
<i>E. edulis</i>	21,13	35,20	0,04	0,76	40,91	38,13	0,03	0,72	5,60	43,94	0,05	1,06
<i>S. peregrinum</i>	30,05	41,20	0,07	2,12	43,58	38,07	0,11	8,85	22,51	53,79	0,09	4,32
<i>M. alba</i>	33,32	51,55	0,09	1,74	35,86	61,12	0,10	2,47	6,23	83,72	0,07	0,80
<i>T. gigantea</i>	35,24	48,06	0,07	2,68	21,20	77,80	0,07	3,30	21,43	51,33	0,07	3,12
<i>B. nivea</i>	36,11	44,35	0,13	2,62	40,46	56,96	0,17	4,91	32,91	57,96	0,17	7,32
<i>M. penduliflorus</i>	11,62	65,73	0,08	1,23	1,33	94,94	0,07	1,09	13,36	69,37	0,07	1,59

a = Fracción soluble ; *b* = Fracción degradable;
kd = Tasa de degradación (%/hora) *c* = Tasa de pasaje (%/hora)

Discusión

Juárez y Pell (1999)¹⁸ determinaron la composición nutricional de 15 gramíneas tropicales, encontrando en promedio 8% de PC y 70,2% de FDN. estos resultados sugieren que los forrajes evaluados en cuanto a su composición química, podrían ser considerados como recursos potencialmente utilizables en la suplementación de rumiantes en el trópico. En relación al contenido de MS es muy superior a lo reportado para el pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) (11,95%)¹⁰, que es la base de

la alimentación en sistemas de lechería especializada. Este aspecto tiene importantes implicaciones desde el punto de vista nutricional y alimenticio, ya que en la medida que se aumenta el contenido de MS, se aumenta la densidad de los nutrientes.

Los contenidos de FDN de los forrajes evaluados estuvieron por debajo de 50%, sugiriendo su posibilidad para ser incluidos en planes de suplementación de vacas lecheras y favoreciendo el consumo de materia seca^{15, 24}. El contenido de FDN se relaciona positivamente con el llenado del rumen y con la densidad del forraje,

es decir, limita el consumo. Además los contenidos de FDN afecta la disponibilidad de energía ^{7, 11, 29}.

Para estimar los contenidos energéticos de los forrajes se usa frecuentemente el contenido de FDA ^{10, 29}. Los valores encontrados en este estudio oscilan entre 24,58 y 45,39%. Estos resultados sugieren que las dietas de los animales que se suplementen con ellos pueden incrementar sus contenidos energéticos, ya que la FDA está altamente correlacionada con la digestibilidad de la materia seca ⁴³.

Shayo y Udén (1999) ³⁷ evaluaron gran variedad de forrajes tropicales, entre ellos Botón de Oro, Chachafruto y Nacedero, para los cuales reportaron valores de PC de 18,6; 26,7 y 25,3% y FDN de 55,1; 65,5 y 54,8%, respectivamente. En este trabajo los valores reportados para PC de los mismos forrajes son semejantes. Sin embargo, los resultados de FDN son diferentes, reportándose en este trabajo valores inferiores. Diferentes estudios han ratificado que los contenidos de FDN de los forrajes, están afectados significativamente por la edad de cosecha de las plantas ^{3, 45}.

En los resultados obtenidos de la prueba de degradabilidad se observó que seis especies (Nacedero, Ramio, Arboloco, Botón de Oro, Morera, Confrey y San Joaquín) alcanzaron una degradabilidad de la MS superior al 70%, estos valores sugieren la posibilidad de utilizarlos para suplementación de rumiantes en trópico alto, aunque las estrategias de utilización para cada recurso tengan particularidades a tener en cuenta. Para esta fracción las especies arbóreas Aliso y Chachafruto presentaron valores muy bajos de degradabilidad (cerca al 50%) lo que les limita sus posibilidades de utilización. Aunque se encuentran reportes de gramíneas en trópico alto con degradabilidad superior al 70%, los recursos forrajeros utilizados en este estudio podrían generar efectos sustitutivos parciales sobre el consumo de forrajes de madurez avanzada o residuos fibrosos por los aumentos en la densidad energética de la dieta ²⁹.

La información sobre la cinética de la degradabilidad de estos recursos es bastante escasa, y en algunos casos inexistentes en la literatura científica. *M. alba* es uno

de los recursos de este tipo más utilizados y evaluados en la alimentación de rumiantes. Lara y Lara (1998) ²⁰ evaluaron la cinética de la degradación ruminal de la MS de la Morera se encontró para la fracción *a* 35,7%; fracción *b* 64,0%; *Kd* 0,062; degradabilidad potencial (*DP*) 99,7% y degradabilidad efectiva (*DE*) 74,6% (*Kp*=0,04). En el presente trabajo se encontró para fracción *a* 33,32%; fracción *b* 51,55%; *Kd* 0,09; *DP* 84,87% (*Kp*=0,04).

En otro trabajo Flores *et al.* (1998) ¹⁴ evaluaron los parámetros nutricionales de algunas arbóreas leguminosas y no leguminosas con potencial para suplementación de rumiantes en el trópico. En dicho trabajo se reportaron los siguientes valores: para la MS una fracción *a* 38,63%; 49,55% y 59,24%; *Kd* 0,063; 0,179 y 0,332; Digestibilidad ruminal *in situ* de la materia seca (DRISMS) a las 96 horas de 87,32%; 87,5% y 88,97% para Nacedero, San Joaquín y Morera, respectivamente. En este estudio se encontró para los mismos forrajes una fracción *a* 35,24%; 11,62% y 33,32%; *Kd* 0,07; 0,08 y 0,09; DRISMS a las 96 horas de 82,29%; 77,40% y 81,35%. Es evidente la enorme diferencia que se presenta en ambos trabajos, existen múltiples factores que afectan este tipo de determinaciones entre las que se pueden contar el modelo matemático para determinar los parámetros de la cinética ruminal, las fuentes de variación intrínsecas de la técnica y los factores asociados al material utilizado.

Los resultados más bajos en cuanto a la cinética de degradación de la MS se expresaron en los recursos arbóreos Aliso y Chachafruto, lo cual probablemente se debió a que las muestras seleccionadas se obtuvieron de árboles que no se encontraban bajo corte, y por lo tanto presentaban grados de lignificación superiores a los encontrados en arbóreas utilizadas frecuentemente y por tanto expuestas a una renovación constante de su follaje. A pesar que son numerosos los reportes de inclusión del aliso en arreglos agroforestales, a nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que reporta la composición química y de cinética ruminal de este recurso.

En el caso del Chachafruto también es escasa la información en nutrición de rumiante ya que generalmente en alimentación animal se han utilizado principalmente sus frutos. Los resultados obtenidos en este trabajo son importantes ya que generan un punto de partida para tomar

decisiones o adelantar estudios de evaluación posteriores, en corroborar la calidad nutricional favorable que tienen estos recursos, con los parámetros de desempeño animal. Con respecto al Arboloco, a pesar que el material fue obtenido igualmente de arbóreas que no se encontraban bajo corte, los resultados de la cinética ruminal (*a* 22,07; *b* 45,78 y *Kd* 0,13) y de su composición nutricional (PC 26,25% FDN 43,95%) sugieren que este recurso podría ser evaluado en pruebas de alimentación que involucren mediciones en términos de producción animal.

Numerosos factores afectan la proporción de PC degradada en el rumen en relación y contenida en los alimentos. Las dos consideraciones más importantes de la química de la PC dietética son: 1) las concentraciones proporcionales de nitrógeno no protéico (NNP) y la proteína verdadera (PV), y 2) las características físicas y químicas de la proteína que comprende la fracción de proteína verdadera del alimento^{27, 29}.

Algunas características de las proteínas muestran la contribución de la estructura tridimensional en las diferentes *Kd*'s que pueden presentar, las diferencias en los enlaces intra e inter-moleculares, las barreras inertes como las paredes celulares y los factores antinutricionales. Las diferencias entre la estructura tridimensional de los enlaces químicos que ocurren entre moléculas de proteína y entre proteínas y carbohidratos también son factores que afectan la degradación de las proteínas. Los resultados de este estudio permiten inferir que los contenidos de PC de los forrajes se refieren en gran proporción a proteína verdadera, además, ésta no presenta limitantes físico-químicas para los microorganismos ruminales que limiten su degradación. Quedan en este estudio interrogantes en cuanto al balance energía-proteína que se daría en el animal, dado que no se conocen los contenidos de carbohidratos solubles ni de extracto libre de N de los recursos utilizados, por tal motivo se debe tener cierto cuidado con la interpretación de estos resultados.

La prueba de degradabilidad de la FDN presentó el mismo comportamiento de la MS; sin embargo, es importante mencionar que estos forrajes (Nacedero, Ramio, Arboloco, Botón de Oro, Morera y San Joaquín) además de presentar bajos niveles de FDN, presentan

una degradabilidad de ésta superior al 70%. Este hecho contrasta con lo que sucede con la con la gran mayoría de las gramíneas tropicales que no alcanzan degradabilidades de la FDN superiores al 60% 6,35, los recursos evaluados en este trabajo mostraron una mayor degradación de esta fracción.

Los resultados de la degradabilidad de la PC permiten decir que todos los forrajes a excepción del aliso, se degradan rápidamente y en gran magnitud en el rumen. El tipo de proteína de estos recursos pareciera no representar obstáculos limitantes a los microorganismos ruminales para efectuar sus labores degradativas, por esta razón se podría explicar parte del proceso. El Aliso demuestra en esta fracción sus características recalcitrantes al ofrecer muchas limitaciones para poder ser degradado.

El conocimiento de la cinética de la degradación ruminal de las proteínas de los alimentos es fundamental para formular dietas que contengan cantidades adecuadas de proteína degradable en rumen (PDR) para los microorganismos y proteína degradable en rumen (PNDR) para el animal²⁹. La concentración de NNP y PV, y las características físicas y químicas de la PV son factores que afectan la cantidad de PDR²⁹. De esta manera las diferencias encontradas en la *Kd* son debidas a las características propias de cada uno de los forrajes evaluados así como de las estructuras y uniones moleculares, los contenidos de pared celular que actúan como barrera en el proceso degradativo y factores antinutricionales que eventualmente puedan contener los alimentos. El aporte relevante que hace este estudio, es generar información necesaria para incluir este tipo de forrajes en programas de alimentación.

La generación de información sobre recursos alternativos de alimentación no va dirigida solamente a los pequeños productores como es frecuente en este tipo de trabajos, dado que se conocen resultados satisfactorios en grandes ganaderías que han adoptado este tipo de prácticas alimenticias. Pretende en cambio, hacer una contribución importante en la caracterización nutricional de recursos potencialmente utilizables en el trópico alto; puesto que usualmente la generación de conocimiento en este campo se ha desarrollado evaluando recursos alimenticios en

trópico medio y bajo, donde existe una mayor diversidad de especies frecuentemente utilizadas. Sin embargo, en el trópico alto no es muy común la introducción de forrajeras en la suplementación ganadera, aunque se cuenta con una variedad importante de especies que pueden ser potencialmente utilizables.

Los contenidos de nutrientes de los forrajes evaluados en este estudio superan en contenido de MS, menores en FDN y FDA al pasto Kikuyo que es la base de la alimentación en este tipo de sistemas de producción; estas características sugieren que pueden incluirse en planes de suplementación ya que mejoran la densidad energética de la dieta y podrían incrementar el consumo de materia seca.

Los parámetros estimados de la cinética ruminal de los forrajes evaluados permitirá que éstos puedan ser incluidos en planes de alimentación que requieran incorporar los valores energéticos de los alimentos y la energía disponible para el animal de este tipo de recursos alimenticios.

Agradecimientos

Los autores expresan los respectivos agradecimientos al Grupo de Investigación en Biotecnología Ruminal y Silvopastoreo (BIORUM) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín por la financiación y apoyo logístico; al Laboratorio de Suelos de la misma Universidad por cofinanciar una parte del estudio, a la Finca “Cien Años de Soledad” por el aporte de los forrajes evaluados, al Centro de Producción “Paysandú” de la Universidad Nacional por la disponibilidad de su infraestructura para la realización del trabajo de campo y al Profesor Héctor Jairo Correa por su especial colaboración en la interpretación de los resultados.

Referencias

1. AFRC. 1992. Nutritive requirements of ruminant animals. Protein Nutrition Abstracts and Reviews Serie B; 62:787-835.
2. Anbarasu C, Dutta N, Sharma K, Rawat M. 2004. Response of goats to partial replacement of dietary protein by a leaf meal mixture containing *Leucaena leucocephala*, *Morus alba* and *Tectona grandis*. Small Ruminant Research; 5:147-156.
3. Barahona R, Sánchez S. 2005. Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. Revista Corpoica; 6 (1):69-82.
4. BIORUM. 2003. Manual de procedimientos. Parte II. Dinámica Digestiva. Laboratorio de Biotecnología Ruminal. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 83p.
5. Buxton DR, Redfearn DD. 1997. Plant Limitations to Fiber Digestion and Utilization. J Nutr; 127 (Suppl): 814-818.
6. Chenost M, Sansoucy R. 1989. Nutritional characteristics of tropical feed resources: natural and improved grasslands, crop residues and agro-industrial by-products. In: Speedy A, Sansoucy R (eds.). Feeding Dairy cows in the Tropics. FAO Animal Health and Production Paper No. 86; p. 66-81.
7. CNCPS. 2003. The net carbohydrate and protein system for evaluating herd nutrition and nutrient excretion, version 5,0. Model documentation. Fox DG, Tylutki TP, Tedeschi LO, Van Amburgh MA, Chase LA, Pell AN, Overton TR, Russell BE. The Cornell University Nutrient Management Planning System. Department of Animal Science, Cornell University. Animal Science Mimeo 213.
8. Correa HJ. 2004. RUMENAL: procedimiento para estimar los parámetros de cinética ruminal mediante la función Solver de Microsoft Excel®. Rev Col Cienc Pec; 17 (3):250-254.
9. Correa HJ. 2002. Limitaciones metabólicas para la producción bovina en el trópico bajo. En: Estrategias de alimentación en la ganadería y su impacto en la productividad. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Producción Animal. Sección de Nutrición Animal. p. 34.

10. Correa HJ, Cerón JM, Henao Y, Arroyabe H. 2004. Maralfalfa: mitos y realidades. *En: Memorias IV seminario internacional Competitividad en carne y leche.* COLANTA.
11. CSIRO. 2007. Nutrient Requirements of Domesticated Ruminants. CSIRO Publishing. 296 p.
12. Ellis WC, Wylie MJ, Matis JH. 1988. Dietary-digestive interactions determining the feeding value of forages and roughages. *In: Ørskov ER (ed.) Feed Science World Animal Science, B4.* Elsevier Science Publishers Amsterdam p. 177-229.
13. Faithfull NT. 2002. Methods in Agricultural Chemical Analysis: A Practical Handbook. Institute of Rural Studies, University of Wales, Aberystwyth, UK. 304 p.
14. Flores OI, Bolívar D, Botero JA, Ibrahim MA. 1998. Parámetros nutricionales de algunas arbóreas leguminosas y no leguminosas con potencial forrajero para la suplementación de rumiantes en el trópico. *Livestock Research for Rural Development; (10) 1.*
15. Forbes JM. 2005. Voluntary Feed Intake and Diet Selection. *In: Dijkstra J, Forbes JM, France J. 2nd ed. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism.* CABI Publishing. p. 607-627.
16. France J, Theodorou MK, Lowman RS, Beever DE. 2000. Feed Evaluation for Animal Production. *In: Theodorou MK, France J (eds). Feeding Systems and Feed Evaluation Models.* CAB International. p. 1-9.
17. Holdridge LR. 1967. Life Zone Ecology. Tropical Science Center. San José, Costa Rica. Traducción del inglés por Humberto Jiménez Saa: Ecología Basada en Zonas de Vida, 1a. ed. San José, Costa Rica: IICA, 1982.
18. Juárez FI, Pell AN. 1999. Evaluation of tropical grasses for milk production by dual-purpose cows in tropical México. *Journal of Dairy Science; 82:2136-2145.*
19. Kiviste A, Álvarez JG, Rojo A, Ruíz AD. 2002. Funciones de crecimiento de aplicación en el ámbito forestal. INIA. Madrid, España.
20. Lara A, Lara P. 1998. Utilización de hojas de morera (*Morus alba*) en la producción de carne de conejo. *Memorias del IX Congreso Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico Agropecuario, ITA N°2, Conkal, Yucatán.* 257 p.
21. Leng RA. 1990. Factors affecting the utilization of 'poor-quality' forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutr Res Rev; 3:277-303.*
22. López S. 2005. *In Vitro* and *In Situ* Techniques for Estimating Digestibility. *In: Dijkstra J, Forbes JM, France J (eds.) Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism, 2nd edition.* CABI Publishing. p. 87-123.
23. Mertens DR. 1993. Rate and extent of digestion. *In: Dijkstra J, Forbes JM, France J (eds.) Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism, 2nd edition.* CABI Publishing. p. 13-47.
24. Mertens DR. 1994. Regulation of forage intake. *In: Fahey GC et al. (ed.) Forage Quality, Evaluation, and Utilization.* American Society of Agronomy, p. 450-493.
25. Naranjo JF, Cuartas CA, Correa HJ. 2005. Comparación de cuatro modelos matemáticos para la caracterización de la cinética de degradación ruminal de algunos recursos forrajeros. *Livestock Research for Rural Development; 17 (98) [mayo 4 de 2011]* <http://www.lrrd.org/lrrd17/9/nara17098.htm>
26. Nocek JE, Grant AL. 1987. Characterization of *in situ* nitrogen and fiber digestion and bacterial nitrogen contamination of hay crop forages preserved at different dry matter percentages. *J Anim Sci; 64:552-564.*
27. Nolan JV, Dobos RC. 2005. Nitrogen Transactions in Ruminants. *In: Dijkstra J, Forbes JM, France J (eds.) Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism, 2nd edition.* CABI Publishing. p. 177-207.
28. Norton BW, Poppi DP. 1995. Composition and nutritional attributes of pasture legumes. *In: D'Mello JPF & Devendra C (eds). Tropical legumes in animal nutrition.* CAB International. p. 23-45.

29. NRC. 2001. National Research Council. The nutrient requirement of dairy cattle. Seventh edition. National Academy Press, Washington. 381 p.
30. Orduña R, Ramírez RG, López F. 2002. Factores estructurales de la pared celular del forraje que afectan su digestibilidad. CIENCIA UANL 5 (2):180-189.
31. Ørskov ER. 2000. The *in situ* technique for the estimation of forage degradability in ruminants. *In*: Givens DI, Owen E, Axford RFE, Omed HA (eds.) Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. CAB International. p. 175-198.
32. Parker DS. 1984. Limitantes metabólicos para la producción de leche en los trópicos. *Prod Anim Trop*; 9:263-269.
33. Paterson RT, Karanja GM, Roothaert RL, Nyaata OZ, Kariuki IW. 1998. A review of tree fodder production and utilization within smallholder agroforestry systems in Kenya. *Agroforestry Systems*; 41:181-199.
34. Poppi DP, France J, Mc Lennan SR. 2000. Intake, passage and digestibility. *In*: Theodorou MK, France J (eds.) Feeding systems and feed evaluation models. CAB International. p. 35-53.
35. Preston TR. 1995. Feed resources for ruminants. *In*: Tropical animal feeding: a manual for research workers. FAO Animal Health and Production Paper No. 126. p. 109-133.
36. Preston TR, Leng R. 1986. Supplementation of diets based in fibrous residues and by products. Elsevier Press. Amsterdam. p. 373-413.
37. Shayo CM, Udén P. 1999. Nutritional uniformity of crude protein fractions in some tropical browse plants estimated by two *in vitro* methods. *Anim Feed Science and Technology*; 78:141-151.
38. Smith LH, Goering HK, Gordon CH. 1971. Relationship of forage compositions with rates of cell wall digestion and indigestibility of cell walls. *J Dairy Sci*; 55:1140-1147.
39. Solano C, Vargas L. 1997. El crecimiento de novillas de reemplazo en fincas lecheras de Costa Rica. 1. Tipificación del crecimiento de novillas Holstein y Jersey. *Arch Latinoam Prod Anim*; 5 (1):21-36.
40. Tamminga S, Ketelaar R, Van Ubre AM. 1991. Degradation of nitrogenous compounds in conserved forages in the rumen of dairy cows. *Grass and Forage Science*; 46:427-435.
41. Tarawali SA, Tarawali G, Larbi A, Hanson J. 1995. Methods for the Evaluation of Legumes, Grasses and Fodder Trees for Use as Livestock Feed. ILRI Manual 1. ILRI (International Livestock Research Institute), Nairobi, Kenya. 51 p.
42. Van Soest PJ. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press. 476 p.
43. Van Soest PJ, Mertens DR and Deinum B. 1978. Preharvest factors influencing quality of conserved forage. *J Anim Sci*; 47:712-720.
44. Van Soest PJ, Robertson JB. 1985. Analysis of forages and fibrous foods. A laboratory manual for animal science 613. Cornell University, USA.
45. Varga GA, Kolver ES. 1997. Microbial and Animal Limitations to Fiber Digestion and Utilization. *J Nutr(Suppl.)*; 127:819-823.
46. Weakley DC, Stern MD, Satter LD. 1983. Factors affecting disappearance of feedstuffs from bags suspended in the rumen. *J Anim Sci*; 56: 493-507.

Somos especialistas

En el CENTRO
DE VETERINARIA
Y ZOOTECNIA
CES, contamos
con un equipo
interdisciplinario
de profesionales
especialistas

- Consulta general
y especializada
- Cirugía general
y por laparoscopia
- Ayudas diagnósticas
- Hospitalización
- Laboratorio clínico
Veterinario ICMT-CES
- Almacén agropecuario



UNIVERSIDAD CES

Un Compromiso con la Excelencia

Reconocimiento al Mérito de la Universidad CES por el 17º aniversario de 2017

Centro de Veterinaria y Zootecnia



Centro de Veterinaria y Zootecnia CES
Calle 36 D sur km 4 / Loma del Escobero - Envigado
Phx. 336 02 60 // Cel. 312 287 6897 // www.ces.edu.co
Facebook: Centro de Veterinaria y Zootecnia CES

Evaluation of canine semen that has gone through a freezing and thawing process with different glycerol concentrations as a crioprotector*

Evaluación del semen canino, sometido a congelación con diferentes concentraciones de glicerol como crioprotector

Avaliação do sêmen canino, sujeito a congelamento com diferentes concentrações de glicerol como crioprotetor

Rubén Uribe Valderrama^{1*}, MV, MSc; María Elena Arango Rodríguez², MV;
Laura Rendón Álvarez², MV; Carlos Mauricio Acevedo Naranjo³, MV.

* Autor para correspondencia: Rubén Darío Valderrama. Universidad CES. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad CES Carrera 51 # 118 sur-57 Caldas. Antioquia. Colombia. Correo electrónico: rubendario10@hotmail.com

^{1, 2} Grupo de investigación INCA - CES, Universidad CES. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES, Calle 10A No 22-04, Medellín, Colombia.

³ Grupo de investigación INCA - CES, Universidad CES. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES. Práctica privada

(Recibido: 5 de mayo, 2010; aceptado: 6 de mayo, 2011)

Abstract

The study of biotechnology used in canines for reproductive purposes, is one of the principal research study points to the area of Veterinary Medicine in last years²⁸. In the objective to evaluate the effect of three different concentrations of glycerol on canine semen, to subjected cryo-preservation process, were obtained using manual manipulation, 12 semen samples of male Labrador clinically healthy and subject to the same driving conditions. Each sample was divided in four treatments (T1: control, T2: 4%, T3: T4 6% and 8% glycerol), to which they evaluated the volume, pH, motility, concentration, morphology and vitality, respectively. Then in the analysis were determined after thawing seminal differences and its relationship to the concentration of cryoprotectant. From the results obtained in this project are significant differences between the variables morphology, mortality and concentration, also established that T2 (4% glycerol) and T3 (6% glycerol) provide better results for freezing semen canines.

Key words

Canine semen, cryopreservation, glycerol, seminal viability.

*Para citar este artículo: Valderrama RD, Arango ME, Rendón L, Acevedo Naranjo CM. 2011. Evaluación del semen canino, sometido a congelación con diferentes concentraciones de glicerol como crioprotector. Rev CES Med Vet Zootec. Vol 6 (1): 21-30

Resumen

El estudio de las biotecnologías usadas con fines reproductivos en caninos, constituye uno de los principales puntos de estudio investigativo para el campo de la Medicina Veterinaria y la Zootecnia en los últimos años²⁸. Con el objetivo de evaluar el efecto de tres diferentes concentraciones de glicerol sobre el semen canino sometido a procesos de criopreservación, se obtuvieron por medio de manipulación manual, 12 muestras seminales de machos de la raza labrador, clínicamente sanos y sometidos a las mismas condiciones de manejo. Cada muestra se dividió en cuatro tratamientos (T1: control, T2: 4%, T3: 6% y T4: 8% de glicerol); a los cuales se les evaluó el volumen, pH, movilidad, concentración, morfología y vitalidad, respectivamente. Luego en el análisis pos descongelación se determinaron las diferencias seminales y se estableció su relación con la concentración del crioprotector. De los resultados obtenidos en este proyecto se encontraron diferencias significativas entre las variables morfología, mortalidad y concentración, igualmente se estableció que los tratamientos T2 (4% de glicerol) y T3 (6% de glicerol) presentaron mejores resultados para la congelación de semen en caninos.

Palabras clave

Criopreservación, glicerol, semen canino, viabilidad seminal.

Resumo

O estudo da biotecnologia utilizada em cães para fins reprodutivos constitui um dos principais pontos de pesquisa para o campo da medicina veterinária e zootecnia nos últimos anos²⁸. Com o objetivo de se avaliar o efeito de três diferentes concentrações de glicerol sobre sêmen canino submetidos a processos de criopreservação, foram obtidas por meio de manipulação manual 12 amostras de sêmen de Labrador macho, clinicamente saudáveis e submetidas às mesmas condições de manejo. Cada amostra foi dividida em quatro tratamentos (T1: controle, T2: 4%, T3: 6% e T4: 8% de glicerol), os quais foram avaliados quanto ao volume, pH, mobilidade, concentração, morfologia e vitalidade, respectivamente. Nas análises pós descongelamento foram determinadas as diferenças entre os semens e se estabeleceu uma relação com a concentração do crioprotetor. A partir dos resultados obtidos neste trabalho foram encontradas diferenças significativas entre a variável morfologia, mortalidade e concentração e também ficou estabelecido que T2 (4% de glicerol) e T3 (6% de glicerol) apresentaram os melhores resultados para o congelamento de sêmen em caninos.

Palavras-chave

Criopreservação, glicerol, sêmen canino, viabilidade seminal.

Introducción

La conservación de gametos de caninos genéticamente valiosos es uno de los puntos importantes en biotecnología animal¹⁶. Por esto el desarrollo de técnicas de criopreservación espermática exitosas se convierten en un aspecto crucial para investigaciones en reproducción de pequeñas especies. Durante los procesos de congelación y descongelación del semen, las células se exponen a un medio hiperosmótico lo que genera cambios morfológicos en éstas. Al exponerse las células a este medio hiperosmótico se genera una contracción celular inicial; la cual puede revertirse al añadir crioprotectores que ingresan o recubren las células favoreciendo la protección de las mismas²⁷.

Los crioprotectores son solutos que favorecen la protección celular contra el enfriamiento extremo, algunos penetran y otros no penetran a la célula y su citotoxicidad depende directamente de la temperatura y el tiempo de exposición de las células a ellos²⁴.

En el grupo de los crioprotectores penetrantes, se encuentra el glicerol, el cual es un alcohol con tres grupos hidroxilos ($C_3H_8O_3$) de alta permeabilidad^{24,25} este es el más utilizado en la congelación de semen canino, ya que posee la capacidad de reemplazar osmóticamente el agua intracelular antes y durante el congelamiento, disminuyendo el punto de congelación del agua lo cual combinado con una lenta tasa de enfriamiento, disminuye la formación de cristales de hielo^{1,18,25}.

Los parámetros seminales de movilidad del 70%, morfología del 70% de espermatozoides normales, y espermatozoides vivos 80%³⁰, deben tratar de conservarse lo mejor posible en el semen congelado, por tal motivo varios estudios muestran que concentraciones entre el 2% y el 10% han sido usadas con el fin de preservar las características fecundantes de muestras seminales sometidas a procesos de congelación y descongelación. Se ha reportado que las muestras sometidas a procesos de congelación con glicerol al 4% y 6% han mostrado mejores resultados. Se debe señalar

que la primera preñez exitosa por inseminación artificial con semen criopreservado utilizando glicerol, se obtuvo al utilizar una concentración del 8%^{23,24}.

La determinación de la concentración ideal de glicerol como criopreservante ha sido un punto crítico en el establecimiento de protocolos de criopreservación seminal en caninos^{6,24}. Este trabajo presenta los resultados obtenidos al comparar tres diferentes concentraciones de glicerol (4%, 6% y 8%) en procesos de congelación y descongelación de semen canino utilizando un extendido a base de tris y yema de huevo.

Materiales y métodos

Animales

Se tomaron muestras seminales de 12 machos de la raza labrador sometidos a iguales condiciones de manejo y alimentación, los cuales se tenían un rango de edad entre los 1.5 - 7 años. Se les realizó un examen físico completo teniendo en cuenta su historia reproductiva. De cada eyaculado se tomó una fracción que fue destinada a cada uno de los tratamientos (T1: 4%, T2: 6%, T3: 8% y T4: Control) dando un total de 48 muestras, de las cuales se congelaron 36, correspondientes a las tres diferentes concentraciones de glicerol (4%, 6%, 8%) y las 12 restantes (control) se refrigeraron sin criopreservante durante 24 horas.

Recolección seminal, dilución, evaluación y congelación

Todas las muestras fueron obtenidas mediante manipulación digital y sólo se colectó la segunda fracción seminal^{1,2,16}. Las muestras fueron evaluadas al momento de tomar la muestra y las que presentaron espermatozoides vivos móviles, se diluyeron utilizando un diluyente a base de TRIS y yema de huevo (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de los diluyentes utilizados para el proceso de congelación ^{18, 20}.

<i>Ingrediente</i>	<i>Diluyente 1 4%</i>	<i>Diluyente 2 6%</i>	<i>Diluyente 3 8%</i>
<i>TRIS (trizma base)</i>	<i>3.028g</i>	<i>3.028g</i>	<i>3.028g</i>
<i>Ácido cítrico</i>	<i>1.25g</i>	<i>1.25g</i>	<i>1.25g</i>
<i>Glucosa</i>	<i>0.8 g</i>	<i>0.8g</i>	<i>0.8g</i>
<i>Penicilina benzatínica</i>	<i>100mg</i>	<i>100mg</i>	<i>100mg</i>
<i>Sulfato de estreptomicina</i>	<i>0.1g</i>	<i>0.1g</i>	<i>0.1g</i>
<i>Yema de huevo</i>	<i>20%</i>	<i>20%</i>	<i>20%</i>
<i>Glicerol</i>	<i>4 ml</i>	<i>6 ml</i>	<i>8 ml</i>
<i>Agua destilada</i>	<i>Hasta completar 100mL</i>	<i>Hasta completar 100mL</i>	<i>Hasta completar 100mL</i>

Al semen se le adicionó la primera mitad del diluyente preparado cuando se encontraba a una temperatura entre 37 – 25 °C (posterior a la recolección) ^{11, 18, 25}. Luego fue equilibrado durante 40 minutos hasta alcanzar una temperatura de 15 °C ^{11, 18, 25}, con una velocidad de congelación de 0.30 °C/min ^{23, 24}. Posteriormente se refrigeró durante 30 minutos llevándolo a una temperatura cercana a los 4 °C ^{1, 11, 25} con una tasa de disminución de temperatura de 0.37 °C/min ²³. Antes de realizar la congelación del semen se añadió la segunda mitad del diluyente la cual contenía el glicerol al 4% ¹⁸, 6% ¹⁸ y 8% ^{24, 25}. Una vez terminada la segunda dilución, el semen se empacó en pajillas de 0.5 mL ^{1, 18}.

Luego de la obtención de la muestra, se continuo con la evaluación macroscópica del semen de la siguiente manera: 1) el volumen colectado al momento de colecta,

2) el color por observación, 3) el pH utilizando tiras reactivas de orina. Posteriormente, se realizó la evaluación microscópica, utilizando un microscopio binocular Olympus CX21 de contraste de fases; en esta evaluación se tuvieron en cuenta parámetros como la motilidad masal e individual, la concentración espermática por eyaculado, y finalmente se realizaron tinciones de eosina tinta china para evaluar la mortalidad (% de espermatozoides muertos en el citología seminal, estos se tiñen con la eosina) y la morfología espermática. Las 48 muestras de semen fueron evaluadas, según los parámetros de viabilidad consignados en la tabla 2 y todas las muestras que cumplieron con dichas condiciones, se utilizaron para la congelación.

La congelación del semen se realizó utilizando nitrógeno líquido, para ello, la muestra fue colocada a 5 centímetros

sobre el nivel del nitrógeno líquido durante 5 minutos, hasta alcanzar una temperatura promedio de -70 °C; y trascurrido este tiempo se sumergió en el mismo ^{18, 24, 25}.

Descongelación y evaluación post descongelación

Las muestras fueron descongeladas introduciendo las pajillas en un termo con agua a 37 °C durante un minuto ^{9, 10, 21}. Se realizó la evaluación del semen post descongelación y se valoró el pH, la movilidad, la vitalidad y la morfología utilizando métodos similares a los usados durante la evaluación pre congelación.

Análisis estadístico

Se utilizó para la evaluación y análisis de las variables movilidad, pH, mortalidad y morfología la prueba de Análisis de Varianza Simple (ANOVA) ($p < 0,05$). La prueba-F en la tabla ANOVA determinó si hubo diferencias significativas entre los tratamientos para las variables mencionadas. La Prueba de Rangos Múltiples y de (LSD) Fisher se utilizaron para determinar cuáles medias fueron significativamente diferentes de otras, con una confiabilidad del 95%, y el registro de los datos y su desarrollo se realizó en el Software estadístico Statgraphics centurión versión XV.

Tabla 2. Parámetros para establecer la viabilidad del semen para procesos de congelación ⁵.

<i>Parámetro</i>	<i>Valor de referencia</i>
<i>Concentración espermática</i>	<i>> 200 millones de espermatozoides/ml</i>
<i>Movilidad</i>	<i>> 70% con avance progresivo</i>
<i>Morfología</i>	<i>> 70% de formas normales</i>
<i>Anomalías primarias:</i>	<i>< 10% de los espermatozoides</i>
<i>Cabeza: cabezas dobles, en pera, ahusada, microcefalismo, sin cabeza o con cabeza amorfa.</i>	
<i>Pieza intermedia: cola doblada a nivel de la pieza intermedia, pieza intermedia doble e inclusiones citoplasmáticas</i>	
<i>Duplicación de pieza intermedia, cabeza o cola.</i>	
<i>Delgadez a nivel de cabeza, cola o pieza intermedia</i>	
<i>Gotas citoplasmáticas proximales</i>	
<i>Cola: calas enrolladas</i>	
<i>Anomalías secundarias</i>	<i>< 20% de los espermatozoides</i>
<i>Cabezas o colas normales separadas; acrosoma separado; curvatura de la pieza media; curvatura de la cola; gota citoplasmática distal</i>	
<i>Mortalidad</i>	<i>< 20% de los espermatozoides</i>
<i>Volumen</i>	<i>Variable</i>
<i>Color</i>	<i>Blanco a opalescente y opaco</i>
<i>Ph</i>	<i>6.3 a 6.7</i>

Resultados

En la tabla 3 se presentan las variables vitalidad, movilidad como las de mayor importancia debido a su resultado estadístico, sin embargo aunque no es estadísticamente significativa la variable formas primarias es de importancia en los resultados de criopreservación de semen observados en este estudio.

Tabla 3. Variables evaluadas en las muestras seminales luego de la descongelación, con sus valores absolutos y su respectivo valor p.

Variable	Valores absolutos	Efecto tratamiento (p-valor)
Ph	6,8 ± 0,5	0,6058
Mortalidad	17% ± 2%	0,0000 a
Movilidad	90% ± 5%	0,0000 b
Formas normales	90 ± 2%	0,1225
Anomalías primarias	4% ± 2%	0,0644
Anomalías secundarias	7% ± 3%	0,7125

Letras diferentes indica diferencias estadísticamente significativas entre las variables evaluadas $p < 0,05$, con un nivel de confianza de 95%.

Para la variable mortalidad se obtuvo un valor menor de 0,05, enseñando que existen diferencias estadísticamente significativas (Figura 1), sin embargo la prueba de Fisher indica que hay no se encontraron diferencias entre los grupos control, T1 y T2, pero hallándose diferencias con el grupo de pre congelación y el T3. Según los resultados obtenidos se puede decir que para este trabajo el porcentaje de espermatozoides muertos fue mayor en el grupo T3.

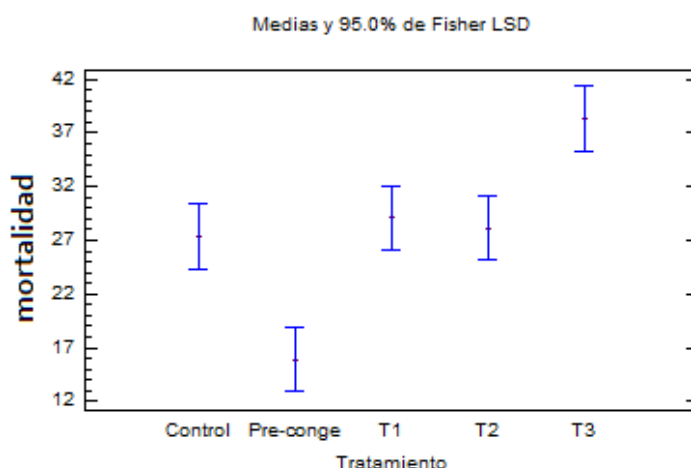


Figura 1. Determinación de la mortalidad con los tratamientos evaluados. Control: semen refrigerado. Pre- congelación: semen evaluado antes de congelar sin glicerol. T1: 4% de glicerol. T2: 6% de glicerol. T3: 8% de glicerol

Para la variable movilidad no existieron diferencias significativas entre T2 y T3, ni entre T2 con T1; pero si se observaron diferencias significativas entre T1, T3, control y pre-congelación. Según los resultados obtenidos se puede decir que la movilidad está directamente relacionada con el nivel de glicerol y que está se ve influenciada por la refrigeración como se observa en el grupo control. Los niveles de movilidad más altos fueron los del grupo control seguidos por el grupo T1. Es razonable que el grupo control haya tenido niveles de movilidad más altos debido a que este no fue sometido al proceso de congelación y no se le adicionó glicerol. Los valores de movilidad más bajos se encontraron en el T3 como se observa en el figura 2.

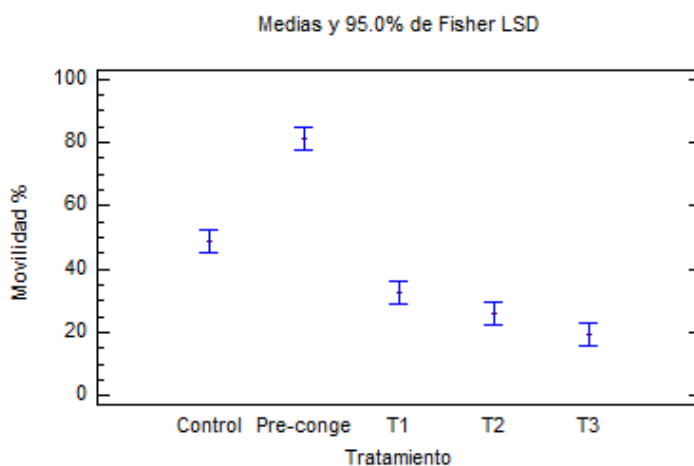


Figura 2. % movilidad en los tratamientos evaluados. Control: semen refrigerado. Pre- congelación: semen evaluado antes de congelar, sin glicerol. T1: 4% de glicerol. T2: 6% de glicerol. T3: 8% de glicerol

Para las variables, pH, morfología, formas normales, anormalidades primarias y secundarias, se obtuvo un valor de $p>0,05$; indicando que no existen diferencias estadísticamente significativas.

Discusión

La concentración óptima de glicerol para realizar procesos de criopreservación seminal en perros depende de muchos factores, entre los que vale la pena resaltar el tipo de diluyente, la velocidad de congelación-descongelación y los métodos utilizados para estos procesos. Por las interacciones existentes entre estos factores no se ha logrado establecer un índice claro de concentración adecuada de glicerol para realizar procesos de congelación de semen canino con buenos resultados en la criopreservación^{1,3}.

Los resultados obtenidos durante el presente estudio muestran que no hay estadísticamente significativas $p>0.05$ entre los grupos evaluados y la variable PH. En la literatura se reporta poca información de pH post-descongelación, aunque teóricamente el pH del diluyente puede disminuir debido a la actividad metabólica de los espermatozoides¹³. Adicionalmente, es sabido que altas variaciones del pH durante procesos de criopreservación conllevan a un aumento en la mortalidad¹³.

La tasa de congelación debe ser suficientemente lenta para evitar la formación de cristales de hielo, pero lo suficientemente rápida para evitar variaciones del pH debidas a acumulación de solutos, que pueden debilitar la membrana celular generando disturbios en el mismo¹³. De acuerdo a esto, se puede inferir que la tasa de congelación seminal, utilizada en el presente estudio es adecuada desde el punto de vista del pH.

Estudios similares han mostrado que disminuciones del pH son observadas luego de 3-4 días de la refrigeración del semen canino diluido en Tris-yema de huevo¹⁹ lo cual puede explicar por qué en el presente estudio no se observaron variaciones de pH en el grupo control debido a que el semen fue refrigerado sólo durante 24 horas, adicionalmente algunos autores han reportado que este diluyente ofrece una alta estabilidad en el pH

de la muestra¹⁹.

Al observar los resultados de mortalidad; los mejores resultados obtenidos para esta variable se le atribuyen a los menores valores (4% y 6%)^{18, 25}. En el presente estudio se encontró que el menor porcentaje de mortalidad, excluyendo el control, se obtuvo en aquellas muestras que fueron sometidas a concentraciones del 6% de glicerol (28,16%) aunque estadísticamente no se encontró diferencias significativas entre el control y las muestras sometidas a 6% y 4% glicerol. Según lo anterior se puede decir que concentraciones de glicerol entre el 4% y el 6% no presentan variaciones estadísticamente significativas con respecto al control, para este estudio; mientras que con una concentración de 8% de glicerol se observó un aumento en el número de espermatozoides muertos. Además, es importante mencionar que aunque hubo un alto deterioro en la vitalidad del semen sometido a procesos de criopreservación, en relación con el control y la precongelación, los valores obtenidos fueron similares a valores previamente reportados para procesos de congelación de semen canino, además los resultados son compatibles con fertilizaciones exitosas realizadas con semen criopreservado⁸.

La movilidad es el parámetro más importante durante la evaluación seminal, la mayoría de los investigadores utilizan este parámetro como el determinante al evaluar técnicas de congelación, diluyentes y crioprotectores^{12, 25, 27}. En el presente estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones del 4% y 6% de glicerol. Este resultado concuerda con el de otros autores¹⁷ quienes también encontraron que no existen diferencias estadísticamente significativas en la movilidad para semen congelado y posteriormente descongelado con glicerol al 4% y al 6% como criopreservante.

La presente investigación manifestó que los mejores resultados se obtuvieron con concentraciones de 4% y 6%, similar a lo encontrado por otros investigadores quienes sugieren que la mejor concentración de glicerol es 6%^{3, 18}, y 4 %^{18, 27}. Por otra parte los resultados difieren de los obtenidos por Peña¹⁷, quien encontró que los mejores resultados de movilidad se obtuvieron para concentraciones del 8%.

Es importante resaltar que en la literatura existen estudios que reportan que los mejores resultados se obtienen con concentraciones del 2% ¹⁵, además, se han encontrado mayores discordancias en los resultados utilizando mínimas concentraciones de glicerol 1,6%-3% ^{7, 14, 15} o altas concentraciones del mismo, 8-12% ²⁶. Al observar el rango de valores de movilidad obtenidos en este estudio se encuentra que los valores son relativamente bajos ya que las medias fueron de entre 19% y 33%. Al compararlo con los resultados de otras fuentes en la literatura se ve que los resultados caben entre los rangos encontrados, ya que ha habido estudios con medias de movilidad del 14% ¹⁷ hasta 70% ²⁹.

Vale la pena resaltar que para procesos de inseminación artificial se sugiere tener una movilidad espermática entre 40% y 50 % ^{18, 27}, aunque, se ha logrado obtener preñeces con valores de movilidad entre el 20% y el 30% ²⁷; por lo tanto los valores obtenidos durante este estudio se podría inferir que serían suficientes para lograr preñeces exitosas. Probablemente en este estudio la reducción de la movilidad del semen sometido a procesos de congelación- descongelación pudo verse influenciada por largos periodos de transporte desde el sitio de recolección hasta el laboratorio, lo cual puede reducir las reservas metabólicas de los espermatozoides ¹⁸ haciéndolos más susceptibles a sufrir cambios durante la refrigeración, congelación y descongelación, es posible que comenzando el proceso de criopreservación inmediatamente después de la recolección del semen se obtengan mejores cualidades espermáticas en el semen pos-descongelación.

Con relación al porcentaje de anomalías primarias (4%) y secundarias (7%), los resultados manifestaron que no existe correlación directa entre la concentración de glicerol y un aumento en la incidencia de anomalías morfológicas. Resultados similares fueron encontrados en otros estudios en los cuales se observó un aumento en las anomalías secundarias, pero estas no fueron estadísticamente significativas ²⁵.

De igual forma, se ha reportado que semen con valores porcentuales similares a los obtenidos en este estudio, pueden ser utilizados efectivamente en procesos de

inseminación artificial con semen congelado ²³. Hay que destacar que el porcentaje de anomalías primarias en este estudio fue alto comparativamente con estudios similares ^{22, 23, 25}, sin embargo este porcentaje fue alto incluso en el análisis precongelación. Basando, con lo dicho por Johnston et al (2001), las anomalías primarias se originan durante la producción espermática y la manipulación del semen no tiene influencia en estas.

Con relación a las anomalías secundarias algunos estudios, reportan aumento en estas siendo la anomalía más común colas dobladas ⁴. Aunque en este estudio no se realizó diferenciación porcentual de las anomalías secundarias los investigadores observaron una gran incidencia de colas dobladas. Adicionalmente, la literatura reporta que las anomalías secundarias son generalmente originadas por los cambios de temperatura a los que es sometido el semen durante este tipo de procesos ⁴.

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la concentración espermática entre los tratamientos. Hay que aclarar que las diferencias encontradas entre los diferentes tratamientos y la precongelación fue debida a la distribución seminal ya que se usaron pajillas de 0,5 ml con concentraciones espermáticas de 200 millones de espermatozoides/ml. Los resultados obtenidos al relacionar los tratamientos y la precongelación son coherentes ya que no tiene porque existir una relación entre la concentración de glicerol y la concentración espermática, sin embargo la medición de este parámetro ayuda a evaluar el proceso y método empleado para la criopreservación seminal.

Se puede concluir que los procesos de refrigeración y congelación utilizados en esta investigación generaron un alto deterioro de la vitalidad. Sin embargo los valores obtenidos fueron similares a valores previamente reportados en la literatura ⁸. Los autores recomiendan la realización de nuevos estudios para establecer procesos de refrigeración que permitan obtener mejores resultados de vitalidad, ya que los resultados obtenidos en el presente estudio muestran un marcado aumento en la mortalidad cuando el semen es sometido a procesos de refrigeración.

Las concentraciones de glicerol del 4% y 6%, no mostraron diferencias con el control, con esto se puede concluir que estas concentración del crioprotector para procesos de congelación seminal son las ideales, evitando en gran medida el daño de las células espermáticas. Concentraciones del 8% de glicerol, generaron un marcado deterioro de las características seminales.

Finalmente se concluye que es importante tener en cuenta que factores como el transporte, la maquinaria y la mano de obra tienen una importante influencia en los resultados obtenidos en el trabajo, por lo tanto sería pertinente continuar la realización de otros estudios similares, minimizando la influencia de los factores previamente mencionados.

Agradecimientos

Los investigadores y asesores de este proyecto agradecemos a las siguientes personas quienes hicieron posible la realización del mismo: Al Dr. Carlos Giraldo, por el acompañamiento inicial; Dr. Oscar Sáenz, por realizar el estudio estadístico al laboratorio Clínico Veterinario del Instituto de Medicina Tropical, a la empresa Miro Seguridad y Dr. Julián A. Orozco, por facilitar los ejemplares para la toma de muestras seminales. A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad CES, por el apoyo económico brindado, para la consecución de equipos y materiales que hicieron posible, finalmente la ejecución del trabajo.

Referencias

1. Bohórquez CR, De Ondiz A, Palomares R, Gallardo Fanny. 2005. Determinación del protocolo de criopreservación de semen canino. Rev. cient. (Maracaibo) 15(5):458-463.
2. Cunningham, JG. 2003. Fisiología veterinaria. 3ª ed. Editorial: Mc Graw-Interamericana.
3. Eilts BE. 2005. Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. Theriogenology; 64:692-697.
4. Fastard W. 1996. Semen cryopreservation in dogs and foxes. Animal Reproduction Science; 42:251-260.
5. Felman EC, Nelson RW. 2004. Canine and feline endocrinology and reproduction. 3ª ed. Editorial: Mc Graw Hill Interamericana.
6. Fontbonne A, Badinand F. 1993. Studies on dog freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. J Reprod Fertil; 47 (Suppl):531-532.
7. Fontbonne A, Badinand F. 1993. Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. J Reprod Fertil; 47:531-532.
8. GCW, Ponzio P. 1995. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. Theriogenology; 46:165-171.
9. Gobello C, Corada Y. Actualización en biotecnología reproductiva canina. En: Gobello C. 2004. Temas de reproducción canina y felina. 1ª ed. Argentina: Editorial Intermédica S.A. p. 180-194.
10. Gobello C, Wanke MM. 2005. Reproducción en caninos y felinos domésticos. 1ª ed. Argentina: editorial inter-medica S. A. p. 27-31.
11. Hori Tatsuya, Odaka Sanae, et al. 2006. Effects of liquid nitrogen vapor sensitization conditions on the quality of frozen-thawed dog spermatozoa. J. Vet. Med. Sci; 68 (10):1055-1061.
12. Ivanova-Kicheva MG, Bovadob ND, Somlev B. 1997. Criopreservación Of canine semen in pellets and in 5 ml aluminium tubes using three extenders. Theriogenology; 48:1343-1349.
13. Minter LJ, De Liberto TJ. 2005. Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on post-thaw motility, viability and morphology of coyote (*Canis latrans*) spermatozoa. Theriogenology; 64:1898-1912.
14. Olar TT. 1985. Using frozen canine semen: a guide for practitioners. Veterinary Medicine; 80 (3):22-30.

15. Olar TT, Bowen RA, Pickett BW. 1999. Influence of extender, cryopreservative and seminal precessing procederes on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*; 31:451-461.
16. Olivera M, Gobello C. 2005. El libro latinoamericano de reproducción canina y felina. 2ª ed. Argentina: Editorial Intermédica. p.335.
17. Peña AI, Barrio F, Quintela LA, Herradón PG.1998. Effect of diferent glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. *Theriogenology*; 50:163-174.
18. Rodríguez AS, Soares CR, Machado Da Silva LD.2002. Canine semen cryopreservation with different glycerol concentrations. *Revista Brasileira de Ciencia Veterinaria*; 9 (1): 25- 28.
19. Rota A, Strom B, Linde-Forsberg. 1995. Effect of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*; 44:885-900
20. Sánchez RA, Cartagena PA, Berland OM. 2006. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Rev Inv Vet*; 17 (1):1-7.
21. Savignone CA, Stornelli MC. 2006. Efecto de la concentración de trealosa que no modifique la osmolaridad del diluyente TRIS base sobre la supervivencia espermática pos descongelación del semen canino. Argentina: Décimo congreso argentino de ciencias morfológicas FCV UNICEN. 11-16.
22. Silva AR, De Cássia Soares Cardoso R, Uchoa DC; Macgado De Silva LD.2002. Effect of tris-buffer, Egg yolk and glycerol on canine semen freezing. *The Veterinary Journal*; 164:244-246.
23. Silva AR, *et al.* 2000. Canine semen's freeze with different concentrations of egg yolk and glycerol in tris and coconut water extenders. *Ciencia Rural*; 30:1021-1025.
24. Silva AR, *et al.* 2005. Comparation between different dilution rates on canine semen freezing using Tris-buffer with the addition of egg-yolk and glycerol. *Arq. Bras. Met.Vet. Zootec*; 57 (6):764-771.
25. Silva AR, *et al.* 2003. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*; 59: 821-829.
26. Smith FO. Update on freezing canine semen. En: Kirk R.W. 1986. *Current veterinary therapy, small animal practice*, Vol 9. Philadelphia: WB Saunders, 1243-1248.
27. Soares Cardoso RC, *et al.* 2003. Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogelogy*; 59:743-751.
28. Stornelli MA, De La Sota RL. 2006. Congelación de semen canino. ISSN Facultad de ciencias veterinarias Universidad Nacional de la Plata; 1:10-13.
29. Strom B, Rota A, Linder-Forsberg C.1997. In vitro characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*; 48:247-56.
30. Rott M. 2010. *Clinical canine and feline reproduction: evidence-based answers*. USA: Editorial Blackwell. P. 314.

20
años

Instituto Colombiano
de Medicina Tropical

Excelencia en
investigación



20 años

INSTITUTO COLOMBIANO
DE MEDICINA TROPICAL
"ANTONIO NÚÑEZ RIVERA"



DIRECCIÓN NACIONAL DE SALUD DE ANTÍGENOS
COORDINACIÓN DE ANTICUEROS



UNIVERSIDAD CES

De Compromiso con la Excelencia

Effect of rotary plows on some physical properties of a clay loam soil*

Efecto de los arados rotativos sobre algunas propiedades físicas de un suelo franco arcilloso

Efeito do arado rotativo em algumas propriedades físicas de um solo argiloso

Samir Safar^{1*}, I. Agrónomo; Hugo González², I.A, cPhD; Nelson Luis Cappelli³, I.A, PhD.

* Autor para correspondencia: Samir Safar. Carrera 14 A No 127 B 61, Apartamento 602, Edificio Norcarolina, Bogotá, DC.

¹ Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín. safarabis001@hotmail.com

² Profesor Asistente - Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Grupo de Ingeniería Agrícola. A.A. 568. hagonzal@unal.edu.co.

³ Universidade Estadual de Campinas – SP- Brasil. cappelli@agr.unicamp.br.

(Recibido: 29 de julio, 2010; aceptado: 5 de abril, 2011)

Abstract

The effect of rotating plows (rotavator, power harrows and motorhoes) on some of the main physical properties in a clay loam soil Vertic Haplustalf, with alluvial parent material and slope less than 3%, was studied. Twelve experimental parcels were established and three different treatments and a control were applied to the soil. Values of soil bulk density, total porosity, gravimetric moisture content, penetration resistance, distribution and structural stability of aggregates were determined for treated parcels. Only significant difference was found ($p < 0.05$) in the penetration resistance between control soil and treated with rotavator and power harrows. The remaining soil physical properties evaluated showed some variation, but were not statistically significant, so we conclude that these (rotary plows) did not alter or affect the properties in question representatively.

Keywords

Mechanization of the soil, motorhoes, physical properties of the soil, power harrows, rotavator.

*Para citar este artículo: Safar S, González H, Capelli NL. 2011. Efecto de los arados rotativos sobre algunas propiedades físicas de un suelo franco arcilloso. Rev CES Med Vet Zootec. Vol 6 (1): 32-44

Resumen

Se estudió el efecto de diferentes arados rotativos (rotavator, grada rotativa y motoazada) sobre algunas de las principales propiedades físicas de un suelo *Vertic Haplustalf*, franco arcilloso, con material parental aluvión y pendiente <3%. Se establecieron 12 parcelas experimentales, en tres diferentes tratamientos y un tratamiento control. Se determinaron valores de densidad aparente, porosidad total, contenido de humedad gravimétrica, resistencia a la penetración, distribución y estabilidad estructural de agregados por parcelas tratadas. Sólo se encontró diferencia significativa ($p < 0,05$) en la resistencia a la penetración entre el suelo testigo y los tratados con rotavator y grada rotativa. Las restantes propiedades físicas del suelo evaluadas presentaron algunas variaciones, pero no fueron estadísticamente significativas, por lo que se concluye los arados rotativos no alteraron, ni afectaron representativamente las propiedades en cuestión.

Palabras Clave

Grada rotativa, mecanización del suelo, motoazada, propiedades físicas del suelo, rotavator.

Resumo

Estudou-se o efeito de diferentes arados giratórios (rotador, grade rotativa e cultivador) sobre algumas das principais propriedades físicas de um solo *Vertic Haplustalf*, franco argiloso, com material de origem aluvial e declividade <3%. Foram estabelecidas 12 parcelas experimentais em três tratamentos diferentes e um tratamento controle. Foi determinada valores da densidade aparente, a porosidade total, o teor de umidade por gravimetria, a resistência à penetração, distribuição e estabilidade estrutural dos agregados nas parcelas tratadas. Apenas uma diferença significativa ($p < 0,05$) foi encontrada na resistência à penetração entre o solo controle e os tratados com rotador e grade rotativa. As propriedades físicas restantes do solo avaliadas apresentaram alguma variação, mas não foram estatisticamente significativas, ao que se conclui que os arados rotativos não alteraram nem afetaram representativamente as propriedades em questão.

Palavras-chave

Cultivador, grade rotativa, mecanização do solo, propriedades físicas do solo, rotador.

Introducción

Dentro de los problemas más comunes generados por una inadecuada labranza se encuentran el aumento de la densidad aparente, la pérdida de macroporosidad, la compactación; la reducción en la infiltración, la conductividad hidráulica, el almacenamiento de agua y la estabilidad estructural, así como el aumento de la escorrentía y la erosión¹⁴.

Los suelos del Centro Agropecuario Cotové, de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, donde por muchos años se ha implementado el

modelo de labranza convencional, posiblemente no han quedado exentos de los efectos nocivos de estas prácticas inapropiadas.

Los arados rotativos como el rotavator, la grada rotativa y la motoazada, entre otros, son herramientas rotacionales que roturan, cortan y mezclan el perfil del suelo. Constan de un rotor provisto de cuchillas accionado por la toma de potencia del tractor (excepto la motoazada que es accionada por su propio motor), de manera que en una sola pasada realizan

el rompimiento y mezcla del suelo ²³. Estos equipos pueden ser considerados implementos críticos en regiones con clima tropical, por su fuerte impacto sobre la estructura del suelo y el alto riesgo de erosión relacionado con ellos ⁹.

En ocasiones se considera la labranza rotativa como labranza reducida por el número limitado de operaciones en la preparación del suelo. Esta práctica contribuye a disminuir la compactación, gracias al menor número de pasadas y a la reducción del peso del tractor por la tracción negativa dada por el empuje hacia delante que ejercen las herramientas rotativas sobre el tractor ⁶.

Una de las críticas a estas herramientas se relaciona con la fragmentación del suelo que daña la estructura. Se ha encontrado que el grado de pulverización está influenciado por la cantidad de avance por corte⁶. Para Lozano (2002) ¹⁵ en las zonas mecanizables de los altiplanos andinos donde se cultiva papa tradicionalmente la labranza se basa en el uso de arados de discos y rotativos (rotavator) que han generado capas compactadas de suelo entre 200 mm y 300 mm de profundidad y la pérdida de la estructura en las capas superiores.

Bonilla y Murillo (1998) ⁵ evaluaron el efecto de la labranza profunda utilizando arado de cincel vibratorio y grada rotativa comparada con la convencional con arado de discos, rastra pesada y pulidor, estudiando las propiedades físicas del suelo y el desarrollo y producción del cultivo de algodón, y concluyeron que el arado de cincel vibratorio combinado con la grada rotativa mejora en forma significativa las propiedades físicas de los suelos tratados.

Las motoazadas son equipos versátiles y están equipados con motores de combustión interna. Se utilizan en todo tipo de suelo con topografía desde plana hasta pendiente. En particular sirven para roturar y desterronar el suelo antes de la siembra, para incorporar material triturado como turba o abono, así como para eliminar hierbas indeseables.

El manejo de esta clase de implementos de labranza requiere el conocimiento técnico de los mismos y la evaluación de los efectos que su empleo intensivo causa a la estructura del suelo. En el presente estudio se evaluó la interacción arados rotativos/suelo con el fin de determinar el grado de deterioro que los primeros ocasionan en el segundo y así establecer la opción (rotavator, grada rotativa o motoazada) que presenta menor riesgo para el deterioro de la estructura del suelo.

Materiales y métodos

Área de estudio

El Centro Agropecuario Cotové, de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, está localizado en la vereda el Espinal del municipio de Santa Fé de Antioquia, al occidente del departamento de Antioquia (Colombia) a 6° 33' 32" norte y 77° 04' 51" oeste, en la zona de vida bosque seco tropical (bs-T) con una temperatura anual, promedio, de 27 °C; precipitación, promedio anual, de 1031 mm, y a 540 m.s.n.m ¹⁸. El área experimental se encuentra en una terraza aluvial plana (pendiente <3%), con suelos dominantes arcillosos, moderadamente profundos, de buena fertilidad, clasificados como *Vertic Haplustalfs* franco fino, mezclado, isohípertermico, superficial ²².

Diseño experimental y procedimientos

Se utilizó un diseño completamente al azar con tres tratamientos, más un tratamiento control, con tres repeticiones para cada tratamiento. Antes de aplicar los tratamientos se determinaron las propiedades del suelo (Tabla 1). Los tratamientos consistieron en un pase previo con cortamalezas y desbrozadora en el área de estudio con la finalidad de erradicar la vegetación presente. Las parcelas experimentales medían 21 m x 30 m cada una. Los tratamientos consistieron en:

1. Rotavator (TRV), dos pases de rotavator de cuchilla con ángulo de 135° (HR 2.7) a 150 mm de profundidad

conectado al tractor (5500 JD) con tiempo real de trabajo de 18 min por parcela.

2. Grada rotativa (TGR), dos pases de grada rotativa (HRB-182) a 170 mm de profundidad conectada al tractor (5500 JD) con tiempo real de trabajo de 16 minutos aproximadamente por parcela.

3. Motoazada (TMO), dos pases de motoazada (3001-G) a 120 mm de profundidad conducida por un operador y con tiempo real de trabajo de 90 min por parcela.

4. Parcelas sin intervenir o testigo (TGO), consistente en cobertura vegetal natural en crecimiento.

Tabla 1. Propiedades iniciales del suelo antes de los ensayos.

<i>Propiedad</i>	<i>Valor</i>
<i>Densidad aparente (g/cm³)</i>	1,27
<i>Densidad real (g/cm³)</i>	2,53
<i>Porosidad total (%)</i>	49,73
<i>Textura</i>	Franco arcillosa
<i>Resistencia a la penetración (a 10 cm, kPa)</i>	170,10
<i>Tamaño de agregados (mm)</i>	
>6,3	24,12
6,3 – 4,0	17,49
4,0 – 2,0	16,55
2,0 – 1,0	13,11
1,0 – 0,5	8,65
< 0,5	20,08
<i>Índice de estabilidad</i>	1,26
<i>Estado de agregación (%)</i>	79,92
<i>Diámetro ponderado medio (mm)</i>	3,43
<i>Diámetro geométrico medio (mm)</i>	1,99

Tabla 2. Características de los equipos y calibraciones realizadas antes de los ensayos de campo.

<i>Parámetros</i>	<i>Rotavator</i>	<i>Grada rotativa</i>	<i>Motoazada</i>
	Howard HR 27		
<i>Marca, modelo y lugar de fabricación</i>	Barcelona, España	Kunh HRB 182 Passo Fundo, Brasil	Agria 3001-G Alemania
<i>Fuente de potencia</i>	Tractor, 5500 Jhon DeereD	Tractor, 5500 Jhon eere	Autopropulsada
<i>Potencia requerida</i>	30 kW	40 kW	5 kW
<i>Velocidad de avance (km/h)</i>	2,22	,2	0,7
<i>Velocidad tangencial de cuchillas (m/s)</i>	3,93	,6	2,8
<i>Velocidad del rotor (r.p.m.)</i>	141	253	164
<i>Profundidad de trabajo promedio (cm)</i>	15	17	12
<i>Ancho teórico de trabajo (m)</i>	1,61	,8	1, 0
<i>Número de cuchillas</i>	36	12	32
<i>Tipo de cuchillas</i>	C- ángulo de 135	Recta	C- ángulo de 135
<i>Posición de la tapa</i>	Tapa abajo	--	

Previamente los equipos fueron calibrados y estandarizados teniendo en cuenta varios parámetros técnicos, como: velocidad de avance, velocidad del rotor, profundidad de trabajo, número de cuchillas, tipo de cuchillas y posición de la tapa (Tabla 2).

Después de 30 días de realizadas las labores en cada parcela se tomaron muestras de suelo en cada parcela experimental a una profundidad entre 0 y 10 cm, con el fin de determinar los cambios en las propiedades físicas del suelo.

La resistencia a la penetración se midió en campo con un penetrómetro de cono Royal Gauge con cono de 20 mm de diámetro, medidor de reloj y resolución de 4 psi.

Siguiendo la metodología propuesta por Gómez y Jaramillo (1986) ¹³ se tomaron en campo las muestras al azar en varios sitios de cada parcela, así: para densidad aparente cinco muestras por parcela experimental; para humedad gravimétrica cinco muestras por parcela; distribución de agregados y estabilidad estructural una muestra compuesta por parcela; densidad real cinco muestras al azar en el lote; y textura una muestra compuesta en el lote.

Los métodos empleados en la determinación de las propiedades físicas fueron: cilindro biselado (densidad aparente), picnómetro (densidad real), gravimétrico (humedad), Yoder (estabilidad estructural de agregados), Bouyoucus (textura). Para el análisis de distribución de tamaños de agregados se realizó un tamizado a la muestra de suelo que permitió separar los agregados que la conformaban en varios grupos por tamaño estableciendo así el porcentaje correspondiente a cada grupo. En el cálculo de la porosidad total se empleó la ecuación siguiente:

$$P = \left(1 - \frac{D_a}{D_r}\right) * 100 \quad (1)$$

donde,

P : porosidad total (%), D_a densidad aparente (g/cm³) y D_r : densidad real (g/cm³).

Análisis de resultados

Para cada variable se hizo un análisis de varianza y se usó el estadístico 'F' para probar la hipótesis nula que no existe diferencia entre tratamientos. También se hizo la prueba de amplitud múltiple de Duncan ($p < 0,05$) para la comparación de medias entre tratamientos. Los datos se analizaron utilizando el software S.A.S (Statistical Analysis System) (Tablas 7 y 8).

Resultados

En la Tabla 3 se observan los resultados obtenidos en el lote de estudio de la densidad aparente, porosidad total, humedad gravimétrica y resistencia a la penetración (profundidad de 0-10 cm).

Tabla 3. Promedios de densidad aparente, porosidad total, humedad gravimétrica y resistencia a la penetración después de los tratamientos (profundidad 0-10 cm).

<i>Propiedades</i>	<i>Tratamientos</i>							
	<i>TRV</i>		<i>TGR</i>		<i>TMO</i>		<i>TGO</i>	
	<i>valor</i>	<i>DE</i>	<i>valor</i>	<i>DE</i>	<i>valor</i>	<i>DE</i>	<i>valor</i>	<i>DE</i>
<i>Densidad aparente (g/cm³)</i>	1,57 ^a	0,07	1,64 ^a	0,08	1,54 ^a	0,26	1,34 ^a	0,02
<i>Porosidad total (%)</i>	37,94 ^a	3,08	35,18 ^a	3,42	39,26 ^a	10,43	48,88 ^a	1,20
<i>Humedad gravimétrica (%)</i>	18,93 ^a	6,75	19,99 ^a	3,35	13,25 ^a	4,34	20,65 ^a	2,42
<i>*Resistencia a la penetración (kPa)</i>	402,21 ^a	71,76	484,95 ^a	62,56	625,15 ^{ab}	219,05	767,64 ^a	79,61

TRV: rotavator, TGR: grada rotativa, TMO: motoazada, TGO: testigo, DE: desviación estándar

*Valores con letras distintas son significativamente diferentes ($p < 0,05$), según prueba de Duncan.

En la Figura 1 se muestra el efecto de cada tratamiento (TRV, TGR y TMO) y el testigo (TGO) sobre los agregados de diferente tamaño del suelo. En la Tabla 4 se presenta el porcentaje (%) de agregados menores de 0,5 mm por tratamiento y en la Tabla 5 se observa el índice de estabilidad estructural por tratamiento.

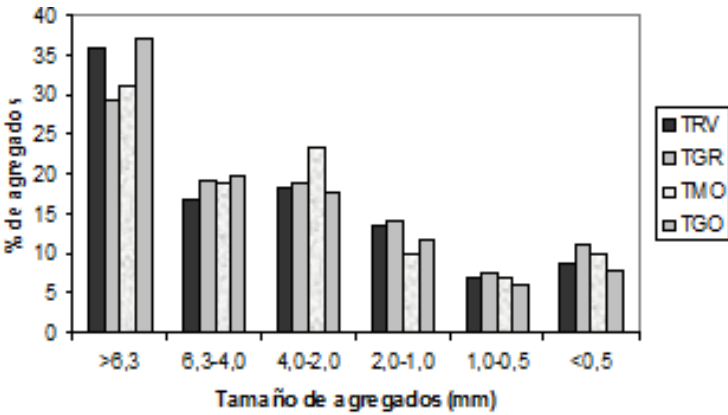


Figura 1. Efecto de los tratamientos sobre los agregados de diferente tamaño del suelo. Profundidad entre 0 y 10 cm.

Tabla 4. Valores promedios de porcentajes de agregados con tamaño inferior a 0,5 mm en cada tratamiento.

Tratamientos	Agregados < 0,5 mm (%)	DE
TRV	8,64 ^a	6,05
TGR	10,98 ^a	5,15
TMO	9,88 ^a	0,34
TGO	7,88 ^a	6,59

TRV: rotavator, TGR: grada rotativa, TMO: motoazada, TGO: testigo; DE: desviación estándar. Valores con igual letra no presentan diferencia significativa (p>0,05).

Tabla 5. Promedios de valores de índices de estabilidad estructural por tratamiento.

Propiedades	Tratamientos							
	TRV		TGR		TMO		TGO	
	valor	DE	valor	DE	valor	DE	valor	DE
Índice de estabilidad	1,37 ^a	0,67	1,78 ^a	1,04	1,47 ^a	0,25	1,68 ^a	1,24
Estado de agregación (%)	91,35 ^a	6,03	89,02 ^a	5,15	90,12 ^a	0,34	92,12 ^a	6,59
Diámetro ponderado medio (mm)	4,25 ^a	0,97	3,96 ^a	1,19	4,12 ^a	0,29	4,44 ^a	0,90
Diámetro geométrico medio (mm)	3,1 ^a	1,03	2,86 ^a	1,22	2,9 ^a	0,29	3,27 ^a	0,80

TRV: rotavator, TGR: grada rotativa, TMO: motoazada, TGO: testigo, DE: desviación estándar
Valores con igual letra no presentan diferencia significativa (p>0,05).

Discusión

La resistencia a la penetración fue la única propiedad que presentó diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las medias de los tratamientos (Tabla 7) y concretamente entre el testigo y los tratamientos TGR y TRV (Tabla 3). Entre los tratamientos de las propiedades densidad aparente, porosidad total, humedad gravimétrica, contenido de agregados finos $< 0,05$ mm, índice de estabilidad, estado de agregación, diámetro ponderado medio y diámetro geométrico medio, no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) (Tablas 3 y 7).

Es probable que la falta de significancia en la mayoría de los resultados se debió a que la aplicación de los tratamientos no fue lo suficientemente intensivo y continuo en el tiempo (por la metodología del ensayo) como para marcar diferencias estadísticas. Adicionalmente se debe tener presente la capacidad natural de resiliencia que tiene el suelo, es decir la habilidad de recuperarse y revertir a su estado original después de que las fuerzas perturbantes o presiones externas se han producido. En este sentido Fernández y González (1998) ¹⁰ afirman que la resiliencia permite al suelo recobrar su organización o estructura primitiva por procesos de agregación natural una vez se reducen las fuerzas causantes de la degradación.

A continuación se discuten los hallazgos por propiedad, donde se incluye también análisis de las tendencias (tratamientos estadísticamente no significativos) encontradas, y se considera que las explicaciones e hipótesis planteadas serán de interés para tenerse presentes en futuras investigaciones sobre el tema.

Resistencia a la penetración

Debido al corte, levante y aflojamiento del perfil con las cuchillas de las máquinas, los suelos arados presentan menores valores de resistencia (Tabla 3). Se detectó diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el suelo testigo y los tratados con rotavator y grada rotativa; entre el TGO y el suelo labrado TMO no se encontraron diferencias, como tampoco entre los suelos TRV, TGR y TMO ($p > 0,05$) (Tabla 8). Se observa que el menor valor de resistencia lo presentó el suelo TRV seguido por una resistencia ligeramente más alta el TGR, lo

que se debió al efecto de labrado de cada máquina (corte, penetración y fragmentación que las cuchillas causan en el suelo), ya que los contenidos de humedad fueron similares en los tratamientos. En la misma Tabla 3 se observa que entre los suelos arados, el TMO tiene la mayor resistencia, lo que es debido al menor contenido de humedad y al bajo efecto disturbador que causa la motoazada sobre el suelo. Todos los valores de resistencia de los suelos tratados se encontraron en el nivel medio, entre 0,1 MPa y 2,0 MPa de acuerdo a la clasificación del SSDS²¹.

Densidad aparente

Para el cálculo de la D_a se tomó la D_r (2,53 g/cm³) inicial. En la Tabla 3 se observa que el suelo en el tratamiento TGR presentó una tendencia de densidad más alta, en contraste con el tratamiento testigo (TGO). En general, hasta 10 cm de profundidad en el suelo los tratamientos con arados rotativos aumentaron el valor de D_a , pero sin diferencia estadística significativa. Cortés y Malagón (1984) ⁷ consideran que en un suelo de textura media, como el del presente estudio, valores $> 1,4$ g/cm³ se consideran altos.

El aumento estadísticamente no significativo de la D_a de los suelos después de los tratamientos se debió, posiblemente, a la desintegración de los agregados (Tabla 4) ya que se observó un mayor contenido de agregados finos ($< 0,5$ mm) en los suelos tratados con arados, evidenciando la desagregación ocasionada por la rotación de las cuchillas sobre el suelo. Lo anterior originó una disminución del volumen de poros entre agregados (macroporosidad) y consecuentemente un incremento no significativo de la densidad aparente en los suelos arados. Para Bernal *et al.* (2008) ⁴ el efecto de los arados rotativos es desagregar el suelo, causando el predominio de agregados pequeños e incremento de la microporosidad, al mismo tiempo que disminuye la macroporosidad. Lo que se comprueba al observar los valores de porosidad total obtenidos (Tabla 3) en las parcelas tratadas. Jaramillo (2002) ¹⁴ considera que la densidad aparente es válida como parámetro para estimar el grado de deterioro del suelo, teniendo en cuenta que a medida que su valor aumenta se produce una degradación de la estructura.

Porosidad total

No se evidencia diferencia estadísticamente significativa a un nivel de confianza del 95% en el resultado de la porosidad para los tratamientos. Sin embargo, en la Tabla 3 se observa que el mayor valor de porosidad correspondió al suelo TGO y el menor al suelo tratado con grada rotativa (TGR). En todos los tratamientos mecanizados la porosidad del suelo fue <40%, valor muy bajo según la clasificación de Kaurichev (1984)⁸. La tendencia en la disminución de porosidad total registrada en las parcelas tratadas en relación con el testigo, también se explica por la desagregación del suelo causada por el accionar de las cuchillas de las máquinas, que ocasionan una disminución en la macroporosidad y como consecuencia, la reducción del porcentaje de porosidad total. Pagliai *et al.* (2004)¹⁷ encontraron que en la capa superficial del suelo (0-10 cm), con labranza convencional, la macroporosidad es significativamente menor que en un suelo con mínima labranza. En este sentido Almanza *et al.* (2006)² consideran que la cuantificación de la porosidad y sus componentes (macro, meso y micro) permite observar en detalle el efecto de una determinada práctica de manejo de suelos.

Humedad gravimétrica

No se presentó diferencia estadísticamente significativa entre los tres tratamientos (TRV, TGR y TMO) y el TGO. Aunque, la mayor acumulación de humedad en el suelo ocurrió en el testigo TGO (Tabla 3), lo cual es debido al efecto de la cobertura vegetal no alterada que reduce la evaporación. La acumulación de residuos vegetales sobre la superficie del suelo reduce la evaporación y conserva la humedad a mediano plazo que, a su vez, incrementa el contenido de materia orgánica, la capacidad para almacenar y retener agua aprovechable y mejora la estructura²⁰. El menor porcentaje de humedad ocurrió con el uso de motoazada (TMO) y los tratamientos TRV y TGR conservaron un contenido de humedad menor que TGO, aunque muy similar a éste.

Distribución de agregados y contenido de agregados finos (Figura 1 y Tabla 4)

La separación de agregados por tamizado en húmedo en varias clases de tamaño (distribución de agregados) y la expresión de los resultados como porcentaje del peso total de la muestra, permiten presentar hipótesis acerca de la estructura de los suelos o correlacionar tratamientos¹. Para Gómez (1995)¹² los agregados <0,5 mm son los más susceptibles a la pérdida por erosión siendo indicadores de la estabilidad estructural del suelo. En la Tabla 4 se incluyen los promedios de porcentajes de agregados <0,5 mm por tratamiento.

El contenido de agregados finos (<0,5mm) fue más bajo en el TGO, aunque no fue diferente con los demás tratamientos ($p>0,05$) (Tabla 4). Esto indica una mejor estructura y menor susceptibilidad a la erosión en los suelos sin disturbar y sugiere la importancia de mínima labranza en la preparación de suelos cultivados.

Por otro lado, el aumento en el contenido de agregados <0,5 mm en los tratamientos TGR, TRV y TMO influyó en el incremento de la Da y la consecuente disminución de la porosidad total en los suelos que recibieron estos tratamientos.

Índice de estabilidad estructural

Para el cálculo de los índices estructurales del suelo (Tabla 5) se emplearon muestras tamizadas en húmedo. No se encontraron diferencias ($p>0,05$) entre tratamientos, aunque el suelo con TGR presentó un mayor valor. En todos los tratamientos predominaron los agregados de tamaño medio (Tabla 6a). Barthes *et al.* (2002)³ señalan que la susceptibilidad del suelo a la escorrentía y la erosión está estrechamente relacionada con la estabilidad de los agregados de la superficie (0-10 cm). De acuerdo con los porcentajes de agregados finos (Tabla 4) y los valores en la Tabla 6b, el valor de TGR (10,98%) se encuentra entre 10,1 - 20,0, rango clasificado por Montenegro y Malagón (1990)¹⁶ como estabilidad estructural alta clase 2, a diferencia de los suelos testigo y tratados que presentaron estabilidad estructural muy alta, clase 1.

El mayor estado de agregación correspondió al suelo TGO y el menor al TGR (Tabla 5), lo cual indica un mayor porcentaje de agregados >0,5 mm en el primer caso y como era de esperar una mejor agregación de las

partículas del suelo testigo no disturbado por el cultivo. Se observa que el suelo con tratamiento TGR presentó el menor estado de agregación pero a la vez el mayor índice de estabilidad estructural, lo cual aparentemente es contradictorio, sin embargo, esto se explica porque muchos de los macroagregados del suelo ($>6,3$ mm) fueron convertidos a tamaños intermedios (entre $<6,3$ mm y $>0,5$ mm) lo que fundamenta el mayor índice de estabilidad de acuerdo a Pla (1977)¹⁹. En este mismo sentido algunos agregados intermedios y pequeños existentes en el suelo antes de la aplicación de los tratamientos fueron convertidos en microagregados ($<0,5$ mm), aumentando su contenido y reduciendo el contenido total de agregados $>0,5$ mm, lo que explica el menor estado de agregación para suelos tratados con TGR según Montenegro y Malagón (1990)¹⁶.

Diámetro ponderado medio (DPM)

A nivel estadístico no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos y el TGO. Al analizar la tendencia general (Tabla 5), se plantea que el valor más elevado lo tiene el tratamiento TGO y el más bajo el tratamiento TGR. Según Pla (1977)¹⁹ cuando se comparan diferentes situaciones y/o tratamientos dentro de un mismo suelo, obviamente valores más bajos de DPM o del porcentaje en los diámetros mayores señalan un deterioro en la estabilidad estructural y desde el punto de la susceptibilidad a la pérdida de suelo, esta será menor para $DPM > 2,0$ mm.

En la Tabla 5 se observa que el suelo TGR tiene el valor más bajo de DPM, lo que se correlaciona con el estado de agregación para este suelo TGR que también mostró el nivel más bajo, lo que indica la pérdida de agregados de tamaño $>0,5$ mm debido a la reducción del diámetro de sus agregados. Por otro lado, en el suelo testigo se evidenció lo contrario, el mayor índice tanto en el estado de agregación como en el DPM, lo que se manifiesta en el mayor contenido de agregados $> 0,5$ mm en relación con los otros tratamientos.

La estabilidad de los agregados del suelo testigo y los sometidos a los distintos tratamientos, se considera en relación al diámetro ponderado medio como estable (Tabla 6c) según la clasificación de Montenegro y Malagón¹⁶.

Diámetro geométrico medio (DGM)

No se observó diferencia estadísticamente significativa ($p>0,05$), esta característica no varió entre tratamientos. No obstante el mayor valor se presentó en el TGO y el menor en el suelo arado con grada (Tabla 5). Según Gardner (1956)¹¹ el diámetro geométrico promedio caracteriza mejor el diámetro dominante en los agregados del suelo que el diámetro ponderado promedio. En la Tabla 5 se observa que el diámetro geométrico promedio de los agregados del suelo TGR es bajo, lo que se asocia con el menor estado de agregación en los suelos de este tratamiento.

Tabla 6. Índices estructurales del suelo y su interpretación de acuerdo a sus resultados para cada tratamiento.

<i>Tratamiento</i>	<i>Índice estabilidad^a</i>	<i>Tamaño de agregados*</i>	<i>Estabilidad estructural^b</i>	<i>Clase</i>	<i>Estabilidad estructural^c</i>
TRV	>1	Intermedios	(<10) muy alta	1	(3 - 5 mm) estable
TGR	>1	Intermedios	(10,1 - 20) alta	2	(3 - 5 mm) estable
TMO	>1	Intermedios	(<10) muy alta	1	(3 - 5 mm) estable
TGO	>1	Intermedios	(<10) muy alta	1	(3 - 5 mm) estable

a. índice de estabilidad estructural 19, b. Estabilidad estructural según porcentaje de contenido de agregados finos $<0,5$ mm 16, c. Estabilidad estructural según diámetro medio ponderado 16.

* Agregados retenidos en tamices con abertura 4 mm, 2 mm, 1 mm, y 0,5 mm.

Tabla 7. Análisis de varianza aplicados a los resultados de propiedades físicas de los suelos.

<i>Fuente de variación</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>
<i>Densidad aparente</i>				
<i>Tratamiento</i>	3	0,14	0,05	2,5 ns
<i>Error</i>	8	0,16	0,02	
<i>Total</i>	11	0,30		
<i>Porosidad total</i>				
<i>Tratamiento</i>	3	319,67	106,56	3,24 ns
<i>Error</i>	8	263,23	32,90	
<i>Total</i>	11	582,90		
<i>Humedad gravimétrica</i>				
<i>Tratamiento</i>	3	102,71	34,24	1,68 ns
<i>Error</i>	8	163,26	20,41	
<i>Total</i>	11	265,97		
<i>Resistencia a la penetración</i>				
<i>Tratamiento</i>	3	221065	73688,33	4,65*
<i>Error</i>	8	126775,75	15846,97	
<i>Total</i>	11	347840,75		
<i>Agregados finos <0,5 mm</i>				
<i>Tratamiento</i>	3	16,79	5,60	0,21 ns
<i>Error</i>	8	213,45	26,68	
<i>Total</i>	11	230,24		
<i>Índice de estabilidad</i>				
<i>Tratamiento</i>	3	0,32	0,11	0,14 ns
<i>Error</i>	8	6,34	0,79	
<i>Total</i>	11	6,66		
<i>Estado de agregación</i>				
<i>Tratamiento</i>	3	16,78	5,59	0,21 ns
<i>Error</i>	8	213,35	26,67	
<i>Total</i>	11	230,13		
<i>Diámetro ponderado medio</i>				
<i>Tratamiento</i>	3	0,37	0,12	0,15 ns
<i>Error</i>	8	6,53	0,82	
<i>Total</i>	11	6,9		
<i>Diámetro geométrico medio</i>				
<i>Tratamiento</i>	3	0,33	0,11	0,13 ns
<i>Error</i>	8	6,58	0,82	
<i>Total</i>	11	6,91		

* F 0,05, 3,8 =4,07; F 0,01, 3,8 =7,59; hay diferencia significativa al 5% de probabilidad, ver prueba de Duncan (tabla 8). ns: no significativo.

Tabla 8. Prueba de amplitud múltiple de Duncan para diferencias entre tratamientos (para la resistencia a la penetración a 10 cm de profundidad).

<i>Conjuntos de rangos significativos. 8 grados de libertad y $\alpha=0,05$.</i>	<i>Rangos de significación mínima.</i>	<i>Resultados de comparaciones.</i>
$r_{0,05} (2,8) = 3,26.$	$R_2 = r_{0,05} (2,8) S_{y_i} = (3,26) (72,68) = 236,93.$	TG0 vs TRV = $767,64 - 402,21 = 365,43 > 252,20 (R_4).$ * TGO vs TGR = $767,64 - 484,95 = 282,69 > 246,38 (R_3).$ *
$r_{0,05} (3,8) = 3,39.$	$R_3 = r_{0,05} (3,8) S_{y_i} = (3,39) (72,68) = 246,38.$	TGO vs TMO = $767,64 - 625,15 = 142,49 < 236,93 (R_2).$ TMO vs TRV = $625,15 - 402,21 = 222,94 < 246,38 (R_3).$
$r_{0,05} (4,8) = 3,47.$	$R_4 = r_{0,05} (4,8) S_{y_i} = (3,47) (72,68) = 252,20.$	TMO vs TGR = $625,15 - 484,95 = 140,20 < 236,93 (R_2).$ TGR vs TRV = $484,95 - 402,21 = 82,74 < 236,93 (R_2)$
TRV 402,21 TGR 484,95 TMO 625,15 TGO 767,64		

Cuadrado medio error: $Mse=15846,97$; $n=3$; grados de libertad=8. Error estándar: $S_{y_i} = \sqrt{(Mse/n)} = \sqrt{(15846,97/3)} = 72,68$. *Diferencia significativa $p < 0,05$

Teniendo presente el análisis de los resultados de cada propiedad podemos concluir que: la motoazada fue el equipo que causó menor efecto de corte, levante y debilitamiento en los agregados del suelo; la diferencia ($p < 0,05$) en la resistencia a la penetración entre el suelo testigo y los suelos tratados con TGR y TRV fue el resultado del corte, penetración y fragmentación que las cuchillas de estas máquinas causaron en el suelo y sus agregados, lo que produjo una menor resistencia a la penetración en estos suelos que en el TGO; así mismo, la resistencia a la penetración no fue diferente ($p > 0,05$) entre el suelo TMO y el TGO, lo cual se debió no sólo al menor efecto de remoción del suelo que causó la motoazada si no también al nivel más bajo de humedad con que se realizaron las mediciones en el suelo TMO, lo que incrementó su resistencia a valores muy similares del TGO; y finalmente los suelos tratados con arados presentaron un índice de estabilidad estructural > 1 con predominio de agregados intermedios, de igual forma observaron una estabilidad estructural calificada como estable según el diámetro medio ponderado.

Agradecimientos

Al DIME (Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín), por financiar los proyectos con códigos 20201007760 y 20201008056. A los integrantes del grupo de Investigación en Arados de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

Referencias

1. Alegre JC, Cassel DK. 1986. Effect of land- clearing methods and post clearing management on aggregate stability and organic carbon content of soil in the humid tropics. Soil Science; 142 (5):289-295.
2. Almanza E, Bernal J, Arguello O. 2006. Indicadores físicos de sostenibilidad edáfica. Plegable divulgativo No.48. Villavicencio: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).

3. Barthes B, Roose E. 2002. Aggregate stability as an indicator of soil susceptibility to runoff and erosion; validation at several levels. *Catena*; 47:133-149.
4. Bernal N, Chaparro O, Ipaz S, Montealegre G, Ramirez L. 2008. Efecto de cuatro métodos de labranza sobre las propiedades físicas y la pérdida de suelo en la rotación papa-pastos en áreas de ladera en una región alto andina de Colombia. *Acta Agronómica*; 57 (1):35-42.
5. Bonilla R, Murillo J. 1998. Desarrollo de sistemas de manejo para la recuperación de suelos compactados de los departamentos de la Guajira, Cesar y Magdalena. Encuentro Nacional de Labranza de Conservación. Memorias, Santafé de Bogotá.
6. Botero J. 1994. Preparación de suelos. 1ra ed. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.
7. Cortés A, Malagón D. 1984. Los levantamientos agrológicos y sus aplicaciones múltiples. Bogotá: Universidad Jorge Tadeo Lozano.
8. Kaurichev IS. 1984. Prácticas de edafología. 1ra ed. Moscú: Mir.
9. FAO. 2000. Manual de prácticas integradas de manejo y conservación de suelos. Boletín de Tierras y Aguas No. 8. Roma.
10. Fernández R, González P. 1998. Influencia del contenido en materia orgánica sobre las propiedades físicas del suelo. *Cadernos Lab Xeolóxico de Laxe*; 23:101-119.
11. Gardner WR. 1956. Representation of soil aggregate-size distribution by a logarithmic-normal distribution. *Soil Sci Soc Amer Proc*; 20:151-153.
12. Gómez E. 1995. Conservación de suelos, manual de prácticas de laboratorio y de campo. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.
13. Gómez E, Jaramillo D. 1986. Manual de prácticas de suelos I. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.
14. Jaramillo D. 2002. Introducción a la ciencia del suelo. 1ra ed. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.
15. Lozano F. 2002. Proyecto piloto en labranza cero y otras tecnologías utilizadas en ladera. Programa nacional de maquinaria agrícola y postcosecha Corpoica. [acceso: 8 de mayo de 2006]. [http:// www.redepapa.org/lozano.pdf](http://www.redepapa.org/lozano.pdf).
16. Montenegro H, Malagón D. 1990. Propiedades físicas de los suelos. Bogotá: Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC).
17. Pagliai M, Vignozzi N, Pellegrini S. 2004. Soil structure and the effect of management practices. *Soil Tillage Res*; 79:131-143.
18. Pérez E, Barreiro H. 1986. Análisis de régimen de lluvias de la estación experimental El Espinal, Centro Cotové. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.
19. Pla I. 1977. Metodología para la caracterización física con fines de diagnóstico de problemas de manejo y conservación de suelos en condiciones tropicales. Maracay: Universidad Central de Venezuela.
20. Rodríguez L, Rizo H. 1999. Subsolador Sp-280 en la preparación de suelos. *Revista Cañaveral*; 5 (3): 50-51.
21. Soil Survey Division Staff (SSDS). 1993. Soil survey manual. Handbook No.18. Washington D. C: USDA.
22. Vallejo G, Camargo D. 1998. Respuesta del pasto ángleton (*Dichantium aristatum* (Pair) C.E Hubbard) a la fertilización química y biológica de un Alfisol de Santafé de Antioquia. Tesis de pregrado, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 62 p.
23. Villa R. 1998. Labranza del suelo. 4ta ed. Chile: Universidad de Chile Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.

Adopta un animal de compañía

342 02 75 / 342 04 13
cbalaperla@medellin.gov.co

Programa de Protección y Atención Integral a la Fauna Doméstica Callejera
-Perros y gatos- del Municipio de Medellín



Alcaldía de Medellín
Secretaría del Medio Ambiente

Quantification techniques of the protein microbial synthesis in rumen: a review*

Técnicas de quantificação da síntese microbiana no rúmen: uma revisão

Técnicas de cuantificación de síntesis microbiana en rumen: una revisión

Román David Castañeda Serrano^{1*}, MVZ; Lina María Peñuela Sierra¹, MVZ.

**Autor para correspondência: Román David Castañeda. Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, Maringá – Paraná – Brasil. Correo electrónico: romancaser@gmail.com*

¹ Médico Veterinário e Zootecnista da Universidad Del Tolima - Colômbia, Estudante de Doutorado do programa de pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, Maringá – Paraná – Brasil

(Recibido: 7 de julio, 2010; aceptado: 5 de mayo, 2011)

Abstract

The quantification of the microbial protein synthesis in the ruminants is of great importance to assess the nutritional quality of the diets. The determination of microbial synthesis is achieved through the use of microbial markers, which are classified: internal (by-products of rumen microorganisms) and external (substances administered to animals that are incorporated by rumen microorganisms). Although some advances has occurred lately an ideal marker still need to be developed. So the objective of this review is to detail each of the techniques for estimating microbial protein synthesis in the rumen, and discuss the results obtained using each technique.

Key words

External markers, internal markers, nucleic acids, purines.

*Para citar este artículo: Castañeda RD, Peñuela LM . 2011. Técnicas de quantificação da síntese microbiana no rúmen: uma revisão. Rev CES Med Vet Zootec. Vol 6 (1): 46-53

Resumo

Quantificar a síntese de proteína microbiana em animais ruminantes é de grande importância para avaliar a qualidade nutritiva das dietas. A determinação dessa síntese se obtém por meio da utilização de marcadores microbianos, os quais são classificados em internos (subprodutos dos microrganismos ruminais) e externos (produtos administrados aos animais que são incorporados pelos microrganismos) e técnicas indiretas. Embora tenham ocorrido avanços ainda não se tem o marcador ideal. O objetivo desta revisão é detalhar a cada uma das vantagens e desvantagens das técnicas para estimar a síntese de proteína microbiana no rúmen e discutir os resultados obtidos utilizando cada técnica.

Palavras-chave

Ácidos nucléicos, marcadores externos, marcadores internos, purinas.

Resumen

La cuantificación de la síntesis de proteína microbiana en los rumiantes es de gran importancia para evaluar la calidad nutricional de las dietas. La determinación de la síntesis microbiana se logra a través del uso de marcadores microbianos que se clasifican como: Internos (subproductos de los organismos de la panza) y externos (sustancias administradas a los animales que son incorporadas por los organismos de la panza). Aunque últimamente ha habido algunos avances, aún es necesario desarrollar un marcador ideal. Así que el objetivo de esta revisión es detallar cada una de las técnicas usadas para estimar la síntesis de proteína microbiana en la panza y discutir los resultados obtenidos al usar cada técnica.

Palabras Clave

Marcadores externos, marcadores internos, ácidos nucleicos, purinas

Introdução

O aumento na produção de ruminantes pode ser obtido através da maximização da eficiência microbiana ruminal. Trabalhos de pesquisa indica que a proteína microbiana ruminal (PMR) responde, em média, por 59% da proteína que chega ao intestino delgado⁸. Essa proteína pode ser estimada por meio do conhecimento da síntese microbiana ²⁹.

A importância da proteína microbiana na nutrição de ruminantes está relacionada ao fato desta ser uma fonte de alta qualidade de aminoácidos (AAs) disponíveis para a absorção, possuir uma digestibilidade aparente intestinal de aproximadamente 85% e um perfil de AAs essenciais semelhantes àqueles do leite e dos tecidos.

A determinação ou a estimativa do suprimento de proteína microbiana é uma importante área de estudo

na nutrição protéica dos ruminantes. A quantificação da proteína microbiana no rúmen como resultado da fermentação microbiana é de interesse porque há evidências que esta pode ser influenciada pela dieta ⁹. Os estudos para determinar a contribuição das proteínas microbianas como fonte de proteína para o hospedeiro utiliza marcadores microbianos, que podem ser internos ou externos. O objetivo desta revisão é detalhar e descrever cada técnica, analisar as vantagens e desvantagens de cada uma para uatificar a síntese de proteína microbianano rúmen e discutir os resultados obtidos utilizando cada técnica.

Microrganismos ruminais

Os ruminantes não podem sintetizar celulose, mas podem digerí-la da parede celular de plantas não lignificadas, por meio da fermentação ruminal. Além disso, têm desenvolvido uma endossimbiose com os

microrganismos, o que lhes permite viver de uma dieta cuja principal fonte de carboidratos é a celulose ²⁵.

O ecossistema ruminal não pode ser definido em termos de energia metabolizável ou energia bruta, somente pode ser descrito pela quantidade de bactérias próprias e pelos produtos finais da digestão ²¹; assim, a taxa de degradação da proteína no rúmen está influenciada pela ação proteolítica dos microrganismos ruminais e pelo fluxo do conteúdo ruminal ³.

As populações de microrganismos variam dentro do mesmo animal segundo o tempo percorrido depois da última ingestão do alimento, nos dias após, e entre animais com igual alimentação em diferentes países ²⁰. As bactérias criam uma associação juntando-se com microrganismos afins, onde um microrganismo usa os produtos finais do outro para seu crescimento.

Existem marcadas interações entre os protozoários e as bactérias, assim muitos protozoários ingerem e digerem as bactérias produzindo uma diminuição da biomassa bacteriana, podendo reduzir a taxa de colonização das partículas do alimento pelas bactérias. Por outro lado, os protozoários competem eficientemente pelos açúcares solúveis e pelo amido com as bactérias, armazenando carboidratos dentro de suas células ³⁴. Para calcular a contribuição da proteína verdadeira microbiana digestível (PVMD) no intestino delgado, há necessidade do conhecimento da produção de proteína microbiana.

Marcadores microbianos

Os marcadores microbianos podem-se classificar em dois grandes grupos: marcadores internos e externos. Os marcadores internos são constituintes das células microbianas e por isso não precisam ser administrados aos animais experimentais. Por outro lado, os marcadores externos devem ser administrados aos animais experimentais para que sejam incorporados pelos microrganismos ruminais.

Marcadores microbianos internos

Os principais marcadores internos são: Derivados de Purinas, ácidos nucléicos (ácido ribonucleico (ARN) e ácido desoxirribonucleico (ADN)),

ácidodiaminopimélico (DAPA), ácido aminoetilfosfónico (AEPA), perfis de aminoácidos e o ATP. Nesta revisão faremos ênfase nas primeiras duas técnicas, por serem as mais utilizadas e aceitas na atualidade.

Derivados de purinas. A obtenção de dados da produção de proteína microbiana no rúmen tem sido difíceis, principalmente pelo fato que os métodos estabelecidos são trabalhosos, demorados e requererem animais implantados cirurgicamente com cânulas ²⁸. As pesquisas, ao longo dos últimos anos, confirmaram a relação entre produção de proteína microbiana e excreção urinária de derivados de purinas, porém assumiu-se que a absorção de purinas estaria condicionada à quantidade de proteína microbiana, estimada a partir da excreção urinária dos derivados de purinas (alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina) ¹².

Por outro lado foi observada correlação positiva entre o fluxo de N microbiano e a excreção urinária de derivados de purinas, comparando os métodos dos ácidos nucléicos microbianos e a excreção de derivados de purinas na urina, observando uma alta correlação ²². Também foi relatado que a excreção urinária de derivados de purinas apresentou correlação positiva na estimativa do fluxo de N microbiano no duodeno ^{14, 28}.

A excreção de derivados de purinas está diretamente relacionada com a absorção de purinas e, com o conhecimento da relação N purina: N total, na massa microbiana, a absorção de N microbiano pode ser calculada a partir da quantidade de purina absorvida, que é estimada por intermédio da excreção urinária de derivados de purinas ⁶.

A excreção urinária de derivados de purinas, pelos ruminantes, pode ser usada para estimar o fluxo intestinal de proteína microbiana, uma vez que a excreção endógena de derivados de purinas e a relação quantitativa entre a excreção de derivados de purinas e a absorção de purina tenham sido previamente determinadas ⁷. Segundo os mesmos autores, há diferenças no metabolismo das purinas, sendo já estabelecido que ovinos e *Bos taurus* diferem quanto ao nível de excreção endógena de purinas e à habilidade de utilização de purinas de origem exógena.

As purinas são prontamente absorvidas como nucleosídeos e bases livres no lúmen do intestino

delgado e estão sujeitas à degradação extensiva por enzimas específicas, como guanina deaminase, adenosina deaminase e xantina oxidase, em sua passagem pela da mucosa intestinal. É importante salientar que a extensão desta degradação determina a disponibilidade metabólica das purinas a serem utilizadas pelos animais ²⁴.

Tem-se, por intermédio da ação da enzima-chave na degradação das purinas, a xantina oxidase, a conversão de hipoxantina em xantina e ácido úrico; este, então, é degradado em alantoína, pela ação da urease ¹⁵.

Na urina de bovinos, ambas as purinas endógenas e exógenas têm composição semelhante de, aproximadamente, 85% de alantoína e 15% de ácido úrico; xantina e hipoxantina não estão presentes em quantidades significativas na urina de bovinos ^{7, 32}.

A excreção urinária de derivados de purinas pode ser considerada método simples e não-invasivo para estimar a produção microbiana, entretanto, de acordo com Pérez et al. (1996) ¹⁹, seu uso necessita de validação pela comparação de estimativas com outras técnicas.

A técnica de determinação de derivados de purinas (DP) para estimar a síntese microbiana assume que todos os ácidos nucleicos de origem dietética são degradados no rúmen e que, portanto, todos os ácidos nucleicos que deixam o rúmen são essencialmente de origem microbiana. A Figura 1 abaixo mostra de modo esquemático o princípio deste método. As purinas dos ácidos nucleicos microbianos então são absorvidas, degradadas e excretadas na urina como seus derivados (produtos de degradação), hipoxantina, xantina, ácido úrico e alantoína, conforme pode ser observado na Figura 2. A excreção de DP é diretamente proporcional a absorção de purinas ⁶.

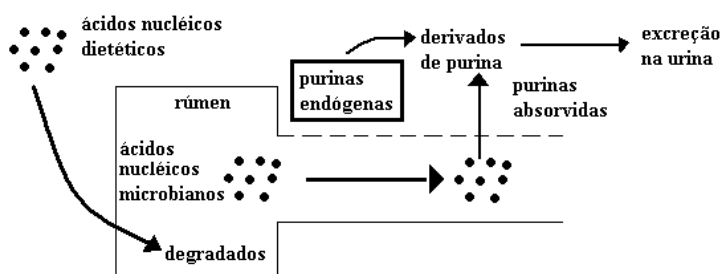


Figura 1. Representação esquemática do princípio do método de determinação da excreção urinária de DP para estimativa da síntese microbiana em ruminantes⁶.

Os DP urinários compreendem, portanto, hipoxantina, xantina, ácido úrico e alantoína (Figura 2). Estes quatro estão presentes na urina de ovinos, caprinos, cervídeos e lhamas, mas apenas ácido úrico e alantoína são excretados por bovinos e bubalinos. Isto porque bovinos e bubalinos tem uma alta atividade de xantina oxidase na mucosa intestinal, degradando, portanto, as bases púricas a seus derivados mais distantes: ácido úrico e alantoína. Nos ovinos, a concentração de xantina oxidase no tecido intestinal é mínima ⁶.

Diferenças específicas no metabolismo das purinas tem sido observadas (26). É importante notar que diferentes equações são necessárias para cada espécie animal. As equações desenvolvidas e validadas até o momento são para ovinos e bovinos ³². Cabe salientar que foram desenvolvidas para animais europeus. Os resultados recentes demonstram que a excreção de DP por animais zebuínos é relativamente menor ²⁶.

As principais limitações desta técnica residem no fato de estar baseada em duas suposições. A primeira é que todo ácido nucleico que chega ao intestino delgado é de origem microbiana. Assumir tal fato não compromete a maioria dos estudos, pois realmente os ácidos nucleicos dietéticos são rapidamente e extensivamente degradados no rúmen. Porém há exceções que não podem ser desprezadas. Para certos alimentos de origem animal, principalmente farinha de peixe, tal fato não se aplica. O segundo ponto de limitação refere-se à relação entre purinas e proteína nos microrganismos ruminais ser constante. Até o momento, não há informação suficiente para tal afirmação.

Para as coletas de urina, com duração de 24 horas, podem-se utilizar funis coletores, adaptados aos animais, conforme metodologia descrita por Valadares et al. ³⁰. Da urina total coletada em recipiente contendo 200 mL de H₂SO₄, a 10%, no período de 24 e 12 horas, após pesagem e homogeneização, se obtêm alíquotas de 100 mL. Estas amostras devem ter o pH ajustado abaixo de 3 e foram diluídas 3 a 4 vezes, para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas urinários e precipitação do ácido úrico.

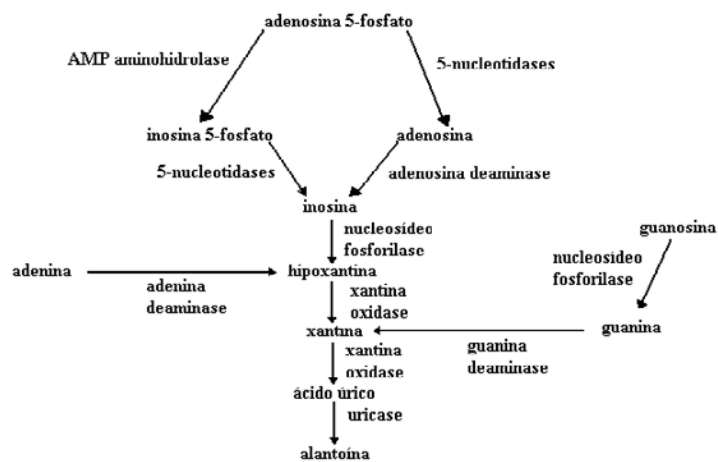


Figura 2. Formação dos DP a partir da degradação dos nucleotídeos púricos⁶.

As análises de derivados de purinas (alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina) podem ser feitas pelo método colorimétrico, conforme técnica ¹¹, descrita por Chen y Gomes (1992) ⁶. A determinação de alantoína foi descrita por Young e Conway (1942) ³⁵, e baseia-se na hidrólise alcalina a 100 °C da alantoína a ácido alantóico, que, posteriormente, é convertido em uréia e ácido glioxílico em solução ácida. O ácido glioxílico reage, então, com hidrócloro de fenilhidrazina, para produzir fenilhidrazona do ácido. O produto forma um cromógeno instável, com ferricianeto de potássio, que pode ser dosado, colorimetricamente, a 522 nm.

O método descrito por Fujijara et al. (1987) ¹¹, para determinação de ácido úrico, baseia-se no tratamento da amostra de urina com, urease resultando em alantoína, que não absorve ultra-violeta (UV) a 293 nm. Então, a redução na leitura de absorbância a 293 nm foi correlacionada com a concentração de ácido úrico. Para determinação de xantina e hipoxantina, pode-se converter em ácido úrico pela xantina oxidase e medidas como ácido úrico a 293 nm ⁶.

A técnica de determinação da produção de proteína microbiana pelas bases purinas, usando coletas de digestas de abomaso, pode ser adotada em experimentos simultâneos de digestibilidade. Aproximadamente, dois litros de digesta de rúmen de cada animal devem ser coletados via fístula ruminal, e as bactérias isoladas ⁵. Ao final dos experimentos, devem ser feitas amostras compostas para cada ração e, para medir a produção de biomassa microbiana, deve-se utilizar as bases purinas, determinadas ²⁷.

O método da excreção urinária de derivados de purinas pode ser utilizado para estimar a produção de proteína microbiana com segurança. A produção de proteína microbiana pode ser estimada em função do consumo de matéria seca, consumo de NDT e da porcentagem de fibra em detergente neutro da ração ²³.

Ácidos nucleicos (ADN e ARN). A utilização do ADN e especialmente do ARN são baseadas nas altas concentrações destas substâncias que apresentam os microrganismos ruminais ⁴. Sua utilização como marcadores microbianos remonta-se aos anos sessenta, quando diversos autores observaram que a síntese de proteína microbiana no rúmen estava relacionada com o fluxo total de polinucleótidos ¹⁰. Posteriormente tem-se utilizado como marcadores microbianos o total de ácidos nucleicos ^{27, 36} o ADN ¹ e o ARN ^{16, 18}.

Os dados sobre o conteúdo em ARN das bactérias mostram variação bastante acentuada, de 3,5 e 5,0 g/100 g MS para bactérias aderentes e livres, respectivamente ¹⁸ até 12 g/100 g MS ¹³. Esta variação em parte é atribuída aos diferentes métodos de análise utilizados, mas, por outro lado, reflete também o nível de atividades metabólicas das bactérias ².

Para a estimativa da eficiência de síntese de compostos nitrogenados microbianos, pode-se utilizar as bases purinas como indicador microbiano, determinando-se a concentração do N-purínico ou ARN equivalente em isolado de células bacterianas ruminais de amostras de digesta de rúmen e abomaso ²⁷. Segundo estes últimos autores, o procedimento combina métodos por hidrólise de nucleotídeos com ácido perclórico seguido por precipitação de purinas livres com nitrato de prata, para a separação das purinas de outros compostos. O procedimento é rápido, simples, preciso e econômico.

A passagem duodenal de N microbiano é estimada por este procedimento seguindo alimentação com dietas purificadas e semipurificadas. A degradação rápida de ácidos nucleicos dietéticos no rumen ¹⁷ conduziu ao uso amplo de ácidos nucleicos ou de suas bases constituintes, as purinas ou as pirimidinas como marcadores para a determinação da síntese microbiana da proteína no rúmen. A quantidade de compostos nitrogenados (N) no abomaso pode ser calculada dividindo-se o fluxo abomasal de N-ARN pela relação N-ARN/N-total das

bactérias isoladas no rúmen. Determinando o fluxo de MS bacteriana no abomaso pela relação entre o N microbiano no abomaso e a porcentagem de N na MS microbiana.

Marcadores microbianos externos

Os marcadores microbianos externos precisam ser administrados aos animais, para que estes sejam incorporados pelos microrganismos ruminais. O procedimento consiste em colocar uma infusão contínua do marcador no rúmen dos animais, durante uma período experimental até alcançar condições de equilíbrio. Os principais marcadores externos são ^{15}N , ^{32}P e ^{35}S

^{32}P

A utilização de radiofósforo (^{32}P) para a determinação da síntese microbiana tem mostrado ser bastante eficiente. Por meio da coleta de amostra do líquido do rúmen pode-se medir a taxa de incorporação do radiofósforo in vitro, avaliando dessa maneira a atividade microbiana.

O método baseia-se na relação entre a incorporação do fósforo na matéria microbiana e a síntese de proteína, utilização de amônia e produção de ácidos graxos láteis, em curtos períodos de incubações usando ^{32}P como marcador ^{31, 33}.

A técnica in vitro de incorporação de ^{32}P para estimar síntese microbiana baseia-se na incubação de uma pequena quantidade de amostra com líquido ruminal em meio tamponado e uma diminuta quantidade de radiofósforo como marcador de proteína microbiana. Com base na atividade específica do fósforo solúveis (AE) e na incorporação do radiomarcador pelos microrganismos, é possível calcular a quantidade total de massa microbiana gerada.

^{15}N

A síntese microbiana é determinada in vivo, com a utilização do isótopo pesado do nitrogênio (^{15}N). Uma fonte enriquecida em ^{15}N (sulfato de amônio marcado, por exemplo) é fornecida aos animais, ou,

ainda, colocada diretamente no rúmen. Esta fonte é metabolizada pelos microrganismos do rúmen e proteínas microbianas são sintetizadas com o nitrogênio marcado. Nas amostras da digesta coletadas no duodeno, determina-se então, a quantidade de proteína microbiana que passa para o restante do sistema digestório ¹⁷. O ^{15}N inorgânico tem sido usado amplamente como um indicador para quantificar a produção de proteína bruta microbiana em vivo, o mesmo autor relata as diversas vantagens que resultam em utilizar o ^{15}N como um marcador externo. 1) porque o ^{15}N é um isótopo estável e não é um perigo ambiental. 2) geralmente, ^{15}N não é encontrado na dieta acima do enriquecimento natural; de aí que, dosagem intraruminal com sais do amônio ^{15}N em estudos a curto prazo marcaram somente N. 3) ^{15}N inorgânico é relativamente barato ⁴.

^{35}S

O isótopo ^{35}S inorgânico pode ser infundido no rúmen e ser incorporado na proteína bruta microbiana. Os métodos típicos envolvem dosagem de $\text{Na}_2^{35}\text{S}_4$ no rúmen, onde é reduzido a sulfeto ^{35}S e logo é incorporado na proteína bacteriana através da síntese de novo de cistina e de metionina. O ^{35}S será incorporado também em outros compostos de enxofre, tais como a co-enzima A. Indiretamente, o ^{35}S marcará proteínas de protozoários. Uma amostra “típica” de micróbios ruminais deve ser isolada para fornecer a relação padrão do indicador. Todavia, a radioatividade acumulada nos tecidos e no leite impossibilita seu uso no alimento. Assim, o uso rotineiro de ^{35}S como um indicador microbiano em vacas leiteiras seria inconveniente por causa dos problemas da eliminação ⁴.

Conclusões

A utilização de metodologias para conhecer a síntese microbiana no rúmen, tem trazido informações importantes para o entendimento e análises de novos alimentos, subprodutos e aditivos na nutrição de ruminantes. Os marcadores microbianos mais utilizados são os derivados de purinas, os ácidos nucleicos (ARN) e o ^{15}N , os três têm sido propostos como marcadores de eleição por vários autores. Todavia, são escassas as pesquisas comparando estes marcadores, para avaliar a correlação entre eles. Na atualidade a técnica das purinas

é mais utilizada devido as vantagens que esta fornece. O ^{15}N apresenta principalmente problemas econômicos, pelo alto preço do isótopo e da posterior análise que precisa o método. A recomendação na hora de determinar a síntese microbiana é utilizar mais de um marcador.

Referências

1. Arambel MJ, Bartley EE, Dufva GS, Nagaraja TG, Dayton AD. 1982. Effect of diet on amino and nucleic acids of rumen bacteria and protozoa. *J Dairy Sci*; 65:2095-210.
2. Bates DB, Gillett JA, Barao SA. 1985. The effect of specific growth rate and stage of growth on nucleic acid-protein values of pure cultures and mixed ruminal bacteria. *J Anim Sci*; 61 (3):713-724.
3. Boenker D. 1987. Importancia de la fermentación ruminal y su influencia sobre el comportamiento reproductivo del rumiante. *Carta Ganadera*; 24 (2):33.
4. Broderick GA, Merchen NR. 1992. Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *J Dairy Sci*; 75 (9):2618-2632.
5. Cecava MJ, Merchen NR, Gay LC. et al. 1990. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency and isolation techniques. *J Dairy Sci*; 73 (9): 2480-2488.
6. Chen XB, Gomes MJ. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives- an overview of technical details. INTERNATIONAL FEED RESEARCH UNIT. Aberdeen, UK: Rowett Research Institute, 21p. (Occasional publication).
7. Chen XB, Samaraweera L, Kyle, DL. et al. 1996. Urinary excretion of purine derivatives and tissue xanthine oxidase (EC 1, 2, 3, 2) activity in buffaloes (*Bubalis bubalis*) with special reference to differences between buffaloes and *Bos taurus* cattle. *Br. J Nutr*; 75:317-407.
8. Clark JH, Klusmeyer TH, Cameron MA. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J Dairy Sci*; 75 (8):2304-2323.
9. Dove H, Milne JA. 1994. Digesta flow and rumen microbial protein production in ewes grazing perennial ryegrass. *Aus. J Agri Res*; 45 (6):1229-1224.
10. Ellis WC, Pfander WH. 1965. Rumen microbial polynucleotide synthesis and its possible role in ruminant nitrogen synthesis. *Nature (Lond.)*; 205: 974-975.
11. Fujihara T, Orskov ER, Reeds PJ. et al. 1987. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *J Agric Sci*; 109:7-12.
12. Giesecke D, Ehrentreich L, Stangassinger M. 1994. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. *J Dairy Sci*; 77 (8):2376-2381.
13. John, A. 1984. Effects of feeding frequency and level of feed intake on chemical composition of rumen bacteria. *J Agric Sci*; 102 (1):45-57.
14. Johnson, L.M, Harrison, J.H., Riley, R.E. 1998. Estimation of the flow of microbial nitrogen to the duodenum using urinary uric acid or allantoin. *J Dairy Sci*; 81 (9):2408-2420.
15. Leningher, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. 1995. *Princípios de bioquímica*. 2.ed., São Paulo: Savier. 839p.
16. Ling J.R., Buttery P.J., 1978. The simultaneous use of ribonucleic acid, 35S, 2,6-diaminopimelic acid and 2-aminoethylphosphonic acid as markers of microbial nitrogen entering the duodenum of sheep. *Br. J Nutr*; 39:165-179.
17. McAllan AB, Sutton JP, Beever DE. 1994. Rumen fermentation characteristics and duodenal nutrient flow in lactating cows receiving two types of grass silage with two levels of concentration. *Ani Feed Sci and Tech*; 46:277-291.
18. Merry RJ, McAllan AB. 1983. Comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digest. *Br. J Nutr*; 50 (3):701-709.

19. Pérez JF, Balcells J, Guada JA. et al. 1996. Determination of rumen microbial-nitrogen production in sheep: a comparison of urinary purine excretion with methods using ^{15}N and purine bases as markers of microbial-nitrogen entering the duodenal. *Br. J Nutr*; 75:699-709.
20. Posgate JR, Ware DA. 1965. Manipulating rumen fermentation. *J Anim Sci*; 46 (3):585-599.
21. Preston TR. 1986. Propuestas de metodología de producción adecuadas a países tropicales. In: Seminario Universidad Nacional de Colombia, 1, Palmira, 1986. Resumos. Universidad Nacional de Colombia. Sede Palmira: Facultad de Ciencias Agropecuarias; 56-70.
22. Puchala R, Kulasek GW. 1992. Estimation of microbial protein flow from the rumen of sheep using microbial nucleic acid and excretion of purine derivatives. *Can. J Anim Sci*; 72:821-830.
23. Rennó LN, Valadares RFD, Leão MI. et al. 2000. Estimativa da produção de proteína microbiana em novilhos. *Rev Bras Zoot*; 29 (4):1223-1234.
24. Stangassinger M, Chen XB, Lindberg JE. et al. 1995. Metabolism of purines in relation to microbial production. In: Engelhardt, W.V., Leonhard-Marek S, Breves G, Giesecke D. (Eds.) *Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. Proceedings of the Eighth International Symposium on Ruminant Physiology*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag: 387-406.
25. Stanier R. 1984. El mundo de la microbiología. Asociaciones simbióticas entre los miembros no fotosintéticos. 1 ed: 752.
26. Tamminga S, Chen XB. 2000. Animal-based techniques for the estimation of protein value. In: Givens DI, Owen E, Axford RFE, Omed HM (Ed). *Forage evaluation in ruminant nutrition*. Wallingford: CAB Publinshing.
27. Ushida K, Lassalas B, Jouank JP. 1985. Determination of assay parameters for RNA analysis in bacterial and duodenal samples by spectrophotometry. Influence of sample treatment and preservation. *Reprod Nutr Dev*; 25:1037-1044.
28. Vagnoni DB, Broderick MK, Clayton RD. et al. 1997. Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amounts of purines. *J Dairy Sci*; 80: 1695-1702.
29. Valadares Filho, S.C. 1995. Eficiência de síntese de proteína microbiana, degradação ruminal e digestibilidade intestinal de proteína bruta em bovinos. In: Simpósio Internacional Sobre Exigências Nutricionais em Ruminantes, Viçosa, MG. Anais... Viçosa: Jard, 355-388.
30. Valadares RFD, Gonçalves LC, Sampaio IB. et al. 1997. Níveis de proteína em dietas de bovinos. 3-pH, amônia e eficiência microbiana. *Rev Bras Zootec*; 26 (6):1264-1269.
31. Van Nevel C, Demeyer DI. 1977. Determination of rumen microbial growth *in vitro* form 32-P labeled phosphate incorporation. *Br. J Nutr*; 38:101-114.
32. Verbic J, Chen XB, Macleod NA. et al. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *J Agri Sci*; 114 (3):243-246.
33. Vitti DM, Silva Filho JC, Abdalla AL 1988. Phosphorus availability for rumen microorganisms: effect of different sources. *J Nucl Agri Bio*; 7:186-187.
34. Wolin MJ. 1989. The rumen fermentation: a model form microbial interaction in anaerobic ecosystem. 1 ed: Condrit.
35. Young EG, Conway CF. 1942. On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. *J Biol Chem*; 142:839-53.
36. Zinn RA, Owens FN. 1986. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. *Can. J Anim Sci*; 66 (1):157-166.



ADQUIERA LOS MEDICAMENTOS EN NUESTRO ALMACEN AGROPECUARIO

**Contamos con el apoyo
de profesionales en el área
farmacéutica, para brindarles
la mejor atención**

Horario:

Lunes a viernes:

8:00 a.m. a 8:00 p.m.

Sábados:

8:00 a.m. a 6:00 p.m.

Domingos y festivos:

8:00 a.m. a 4:00 p.m.



UNIVERSIDAD CES

Un Compromiso con la Excelencia
Centro de Veterinaria y Zootecnia

Important considerations about *in vitro* production of equine embryos*

Consideraciones importantes acerca de la producción in vitro de embriones equinos

Considerações importantes sobre a produção in vitro de embriões eqüinos

Giovanni Restrepo Betancur^{1*}, MV, Zoot, MSc; Sara Restrepo Escobar², Ing. Agrop.

* Autor para correspondencia: Giovanni Restrepo Betancur. Carrera 48 N° 7-151
Medellín - Colombia. Correo electrónico: grestrepo@elpoli.edu.co

¹ Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid; Facultad de Ciencias Agrarias; Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA).

² Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA), Ingeniera Agropecuaria.

(Recibido: 6 de junio, 2010; aceptado: 23 de marzo, 2011)

Abstract

The *in vitro* embryo production (PIVE) in horses is a technique that generates increases in reproductive efficiency of high genetic and commercial value animals. Despite all the studies that has been made, PIVE is still a technique with limited access and success, mainly due to difficulties to achieve efficient rates of fertilization through conventional *in vitro* fertilization, as well as by the high needs in technical and economic resources for fertilization using intracytoplasmic sperm injection (ICSI), among other limitations on *in vitro* embryonic development. In the world there have been evaluated multiple alternatives for improving the PIVE in horses: from the use of different means, fluids, cells and molecules, to the use of alternative methods to improve the rates of fertilization through ICSI with the use of substances such as polyvinylalcohol. This review explores the research progress and future expectations for the application of the PIVE technique in horses.

Key words

Equine embryos, ICSI, In vitro fertilization.

*Para citar este artículo: Restrepo G, Restrepo S. 2011. Consideraciones importantes acerca de la producción *in vitro* de embriones equinos. Rev CES Med Vet Zootec. Vol 6 (1): 55-63

Resumen

La producción *in vitro* de embriones (PIVE) en equinos es una técnica que genera incrementos en la eficiencia reproductiva de especímenes de alto valor genético y comercial. A pesar de todos los estudios que se han realizado, la PIVE es una técnica con acceso y un éxito limitado, debido principalmente a las dificultades para alcanzar tasas de fertilización eficientes mediante fertilización *in vitro* convencional, al igual que por las altas necesidades en recursos técnicos y económicos para la fertilización mediante inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), entre otras limitaciones existentes para el desarrollo embrionario *in vitro*. En el mundo, se han evaluado múltiples alternativas para el mejoramiento de la PIVE en equinos, desde el uso de diferentes medios, fluidos, células, y moléculas, hasta la utilización de métodos alternativos para mejorar las tasas de fertilización como la ICSI en asociación de sustancias como el polivinilalcohol. Esta revisión explora los avances investigativos y las expectativas futuras de aplicación de la técnica de PIVE en equinos.

Palabras clave

Embriones equinos, fertilización in vitro, ICSI.

Resumo

A produção de embriões eqüinos *in vitro* (PIVE) é uma técnica que aumenta eficiência reprodutiva em espécies de alto valor genético e comercial. Apesar de todos os estudos realizados, a PIVE é uma técnica de acesso e êxito limitados, principalmente devido à dificuldade de se alcançar taxas de fertilização eficientes diante da fertilização *in vitro* convencional, grande necessidade de recursos financeiros e técnicos para a fertilização por injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), entre outras limitações para o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Em todo mundo foram avaliadas várias alternativas para a melhoria da PIVE em eqüinos, desde a utilização de diferentes meios, fluidos, células e moléculas até a utilização de métodos alternativos para melhorar as taxas de fertilização como a ICSI em associação com outras substâncias como o álcool polivinílico. Essa revisão aborda o progresso da pesquisa e as perspectivas futuras de aplicação da técnica PIVE em eqüinos.

Palavras-chave

Embriões eqüinos, fertilização in vitro, ICSI.

Introducción

La biotecnología reproductiva permite aumentar la eficiencia reproductiva de los animales mediante el aprovechamiento de sus rasgos genéticos de valor, en la búsqueda de un mayor beneficio productivo y rentable para el hombre. Hay evidencias que

demuestran que la biotecnología reproductiva no es una herramienta nueva en la relación del hombre con los animales, dado que algunos pueblos de Asia Menor alrededor del 2.500 A.C, la utilizaban de forma empírica, castrando los machos que no reunían las condiciones requeridas como reproductores ³².

Para la especie equina se han implementado

biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial, la transferencia de embriones, la producción *in vitro* de embriones (PIVE) y la clonación, sin embargo las tasas de éxito para algunas de ellas, se han visto limitadas ya sea por restricciones de tipo técnico, o por barreras de tipo fisiológico propias de dicha especie. La inseminación artificial y la transferencia de embriones han logrado un posicionamiento significativo en las prácticas reproductivas equinas en países desarrollados donde esta explotación es altamente relevante, sin embargo la difusión de estas biotecnologías en los denominados países en desarrollo es aún muy escasa para el gremio de los productores.

Para el caso de la clonación son varios los reportes de éxito desde los primeros nacimientos de equinos clonados en 2003, a pesar de esto, la técnica sigue siendo altamente ineficiente con menos de un 3% de casos exitosos ⁴⁴. Para la PIVE en equinos, aunque el éxito ha sido menor comparado con la PIVE en otras especies ⁸, se han logrado valiosos avances en países como Estado Unidos, Italia, Holanda y Francia, donde diversos estudios se han realizado para tratar de mejorar la eficiencia de la técnica, evaluando los diferentes factores que pueden interferir en los resultados de la misma ^{17, 22, 29}. Dentro de las principales limitantes planteadas para este procedimiento, están la baja disponibilidad de oocitos, la baja competencia para el desarrollo de los oocitos usados ⁸, las dificultades para alcanzar altas tasas de fertilización *in vitro*, y sobre todo en el ámbito comercial, los altos costos técnicos que involucra.

En el desarrollo *in vitro* de embriones equinos han sido evaluadas diferentes alternativas como los cocultivos celulares⁴⁰ y la suplementación de los medios con moléculas como gonadotropinas, factor de crecimiento insulinoide I (IGF-I)⁷, factor de crecimiento epidermal (EGF)³¹, hormonas esferoidales, suero fetal bovino ^{7, 14}, glucosa ⁹, BSA y aminoácidos ²¹. A pesar de esto, la eficiencia de la técnica aún es limitada respecto a la obtención de embriones viables para los procedimientos de reproducción asistida en esta especie. El objetivo de esta revisión es estudiar algunas consideraciones importantes acerca de la producción

in vitro de embriones equinos y las perspectivas futuras de investigación y aplicación en el campo de la biotecnología.

La biotecnología y producción de embriones equinos *in vitro*

Una variedad de técnicas de reproducción asistida han sido implementadas en la reproducción equina. La fertilización *in vitro* (FIV), la transferencia de oocitos y embriones, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), y la transferencia nuclear han sido desarrolladas con gametos equinos. Sin embargo la baja eficiencia de estos procedimientos ha impedido su aplicación comercial ⁴². El primer reporte de fertilización *in vitro* en equinos se dio en 1989 ⁴, y la mayoría de las investigaciones reportan tasas de fertilización *in vitro* de oocitos equinos entre 4 y 33% ^{5, 47}.

Las técnicas de maduración *in vitro* (MIV) de oocitos, de FIV convencional, y de cultivo de cigotos hasta el estado de blastocistos han sido inadecuadas para la especie equina ⁴¹. Se ha reportado escasos nacimientos de potros por FIV convencional, mientras con la implementación de ICSI ^{21, 30}, múltiples nacimientos han sido logrados principalmente por transferencia de cigotos post-clivaje, y en menor medida por la transferencia de blastocistos producidos *in vitro* ^{15, 35, 41}.

Un estimado adecuado de la competencia de los oocitos esta dado por su habilidad para desarrollarse en blastocistos, y luego por la capacidad de estos embriones para establecer una gestación que conduzca al nacimiento de una cría viable ²⁰. La producción *in vitro* de embriones equinos ha tenido un éxito limitado, posiblemente relacionado con la baja competencia para el desarrollo de los oocitos usados ⁸, la cual es influenciada no sólo por el ambiente de cultivo, sino también por las condiciones de maduración de los mismos ²⁰.

Una de las dificultades en el desarrollo de estudios de PIVE para la especie equina es la limitada disponibilidad de oocitos, dado que una de las principales fuentes para su obtención son las plantas de faenado equino, las

cuales son poco comunes en muchos países respecto a aquellas dedicadas al sacrificio bovino y de otras especies. Adicionalmente la fisiología ovárica de esta especie limita el número de folículos presentes en el ovario, por lo cual se hace necesario recurrir a técnicas como aspiración folicular, la disección de folículos y el raspado de la pared folicular de los ovarios ^{22, 24} con el fin de maximizar el número de estructuras recuperadas.

La maduración *in vitro* y la suplementación de los medios

Las tasas de MIV de oocitos equinos son del 50% al 75%, las cuales son menores a las obtenidas en otras especies ⁴⁰. Para ganar en el entendimiento de las razones por las cuales las tasas de maduración de oocitos equinos son bajas, y para seleccionar poblaciones de oocitos capaces de madurar *in vitro*, se ha planteado el uso de la aspiración transvaginal guiada por ultrasonido. Sin embargo la colección de oocitos por este método sólo produce 0.7 oocitos por ciclo ²².

Goudet *et al.* (1998) ²³ realizaron aspiración folicular a un grupo de yeguas que se encontraban en diferentes etapas del ciclo estral, y evaluaron la competencia de los oocitos para la maduración; encontrando que los oocitos obtenidos de yeguas finalizando la fase folicular, tienen una tasa de maduración mayor (51%), a diferencia de las encontradas en yeguas en fase lútea (34%), y durante la fase folicular (15%).

Son múltiples los factores relacionados con las condiciones de cultivo *in vitro*, que afectan la maduración, la fertilización y el desarrollo embrionario. La duración ideal de la MIV para lograr tasas óptimas de FIV es aún un parámetro en discusión ²⁷, Hinrichs *et al.* (1993) ²⁸, determinaron que no existe un efecto significativo de la duración de la MIV (24 o 42h) sobre la tasa de FIV. El estado de compactación de la granulosa en oocitos inmaduros también es un aspecto importante, dado que los oocitos con un cúmulo compacto toman más tiempo en madurar que los oocitos con un cúmulo expandido ^{26, 28, 45}, adicionalmente,

las tasas de maduración nuclear son superiores en oocitos expandidos respecto a los oocitos con cúmulo compacto ⁹, y las tasas de FIV para los primeros han sido igualmente reportadas como superiores (30% vs. 14%) ².

La composición de los medios para la MIV de oocitos equinos es en la actualidad uno de los aspectos más relevantes a analizar. Se han evaluado alternativas como la suplementación del medio de MIV con células de la granulosa, dado que existen antecedentes en el mejoramiento de las tasas de maduración para oocitos bovinos y porcinos. Sin embargo, resultados de investigaciones realizadas por Sepúlveda *et al.* (2003) ⁴⁰, no arrojaron diferencias respecto a la utilización de medios de maduración libres de células de la granulosa.

Cuando los oocitos son madurados con un 20% de fluido folicular han sido incrementadas las tasas de FIV después de ICSI, mas no para el caso de la FIV tradicional ¹⁸. Se reportan tasas de producción *in vivo* de blastocistos a partir de oocitos MIV del 17% ⁴⁶, y tasas de preñez del 10% ³⁹, por lo que se han asociado las bajas tasas de FIV con la MIV, por lo cual es necesario mejorar la competencia de los oocitos en la maduración.

Aguilar *et al.* (2007) ¹ evaluaron la maduración nuclear en oocitos madurados *in vitro* en medios suplementados con TCM-199 o fluido folicular (FF), y la habilidad de desarrollo de los embriones después de ser transferidos a las yeguas. Encontrando que el porcentaje de oocitos que avanzaron en la meiosis hasta metafase II, fue significativamente superior para el medio con FF (77.3%), respecto al medio con TCM-199 (46.8%). Después de realizar la transferencia, fueron pocos los oocitos madurados en FF y fertilizados *in vivo* que desarrollaron embriones *in vivo* (4.4%, 3/68), mientras en el caso de los oocitos madurados en TCM-199, no se desarrollaron embriones (0/58). En estudios realizados por Hinrichs *et al.* (1993) ²⁸, encontraron que para la MIV de oocitos equinos en 100% fluido folicular (FF) se alcanzan mayores tasas de FIV 13-24%, respecto al uso de medio de maduración con 20% de FF (0-12%).

Lydia *et al.* ³³ sugieren que la adición de suero de yegua en estro y de FF en el medio TCM-199 mejora los resultados en términos de la proporción de oocitos que alcanzan la madurez.

Otras moléculas han sido identificadas como relevantes en la composición de los medios y por ende en los resultados de la PIVE en equinos. El IGF-I ha sido demostrado como un suplemento que mejora la maduración nuclear y citoplasmática de oocitos equinos según la suplementación hormonal realizada ⁷. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) ha demostrado promover la maduración de oocitos. Al cultivar oocitos en medio TCM199 durante 36 horas y posteriormente someterlos al cultivo con EGF y dos inhibidores específicos de tirosina quinasa, se obtiene que los oocitos cultivados presentan un aumento significativo en la incidencia de la etapa de metafase II (70.4%), comparados con el tratamiento libre de EGF (22.5%) ³¹. Por otro lado se ha demostrado que la interleucina 1 (IL-1) induce la maduración de oocitos, pero reduce la tasa de preñez 14 días después de la ovulación, mientras en evaluaciones *in vitro* se encontró que la IL-1 β no tiene un efecto positivo en la maduración y que por el contrario puede interferir con la fecundación y desarrollo embrionario temprano ⁶.

Para el caso de la hormona del crecimiento (GH), se encontró que su adición al medio de MIV, aumenta la expansión de las células del cúmulo, dado que en una investigación con oocitos recolectados por aspiración folicular guiada por ultrasonido, se observaron porcentajes de expansión del cúmulo del 29% (14/48) cuando se adicionó la GH, y del 13% (6/47) cuando se realizó el proceso en ausencia de ésta ³⁴.

Factores que afectan la fertilización *in vitro* de oocitos equinos

Desde la primera fertilización *in vitro* exitosa de oocitos equinos madurados *in vitro*, reportada por Del Campo *et al.* (1990) ¹⁶, se han explorado diversas alternativas con el fin de incrementar la producción de embriones por esta vía. Hasta el desarrollo de la fertilización por ICSI, las tasas de desarrollo *in vitro*

de embriones equinos fue muy reducida, por lo cual se hizo necesaria la combinación de procesos *in vitro* e *in vivo* durante para mejorar las tasas de producción de embriones y la obtención de gestaciones a término ^{1, 38}.

Con el fin de incrementar la habilidad de FIV en los oocitos equinos, se ha planteado que la maduración citoplasmática debe darse de una manera paralela a la maduración nuclear ²², para lo cual ha sido descrito como fundamental, el estímulo de la hormona luteinizante (LH), dado que en condiciones naturales, el desarrollo de los oocitos no puede continuar hasta que los folículos maduros en el estado preovulatorio son estimulados por dicha hormona, la cual induce la maduración del oocito y la ovulación ⁴³.

Al observar reacción acrosómica en espermatozoides equinos, después de tratamientos de capacitación de semen, y tras reportes de la observación de la unión espermatozoide-zona, la principal barrera para la FIV en equinos parece ser la penetración de la zona pelúcida en oocitos madurados *in vitro*, por el endurecimiento espontáneo de la misma, por una liberación prematura de los gránulos corticales demostrada para los oocitos equinos ¹⁷, por lo cual se ha experimentado con la remoción parcial o completa de la zona pelúcida ¹². Algunas alternativas como la maduración de oocitos *in vivo*, y la fertilización por ICSI han sido instauradas en la búsqueda de mejorar las tasas de FIV ^{18, 19, 24}. Choi *et al.* (2002) ¹¹ encontraron que la competencia de desarrollo *in vivo* e *in vitro* de oocitos fertilizados mediante ICSI con espermatozoides frescos, congelados-descongelados, y sin tratamiento de activación, no presenta diferencias significativas. Bedford *et al.* (2004) ³ encontraron que la implementación de ICSI resulta en la inducción de oscilaciones en la liberación de calcio requerido para la activación del oocito durante la fertilización y su posterior desarrollo embrionario.

Al igual que para la optimización de la MIV, para la FIV en equinos se ha evaluado la influencia de diversas moléculas sobre la tasa de FIV. Choi *et al.* (2003) ¹⁰ evaluaron el efecto del polivinilalcohol (PVA) y la albúmina sérica bovina (BSA) sobre la penetración

de oocitos con zona pelúcida parcialmente desnuda, encontrando que el porcentaje de oocitos fertilizados con espermatozoides tratados con PVA (54%, 23/43) fue mayor que los tratados con BSA (11%, 5/43).

Un estudio reciente demuestra la importancia de la capacitación y la hiperactivación de los espermatozoides para el logro de una FIV convencional exitosa, al realizar la inducción de estos fenómenos mediante el uso de procaína, alcanzando porcentajes de fertilización de oocitos equinos hasta del 60.7% ³⁶.

Condiciones para el cultivo *in vitro* de embriones equinos

El cultivo *in vitro* (CIV) de embriones equinos ha tenido bajo éxito comparado con el logrado con embriones de otros animales domésticos ⁹. Diferentes enfoques han sido explorados para el mejoramiento del CIV. El cocultivo de cigotos con células somáticas, y el cultivo de estos en medios definidos libres de células como fluido oviductal sintético (SOF) y medio Eagle Dulbecco modificado (DMEM) han producido bajos porcentajes de cigotos promedio del 15% ^{9, 21}. Choi *et al.* (2000) ¹³ no observaron diferencias en las tasas de desarrollo de embriones, al comparar un medio condicionado con trofoblásto con un medio químicamente definido para el cultivo de cigotos equinos. Las tasas de desarrollo fueron bajas (<5%).

Pocos trabajos han sido desarrollados sobre el efecto de factores específicos del medio para el desarrollo de embriones equinos *in vitro*. En estudios recientes una variedad de medios han permitido un buen desarrollo de embriones de 4 días (8 a 16 células), y han sido alcanzadas tasas de blastocistos del 25% al 35% usando medios de cultivo como medio DMEM/ F-12 con 10% de suero fetal bovino, en una mezcla de gases de 5% O₂, 5% CO₂ y 90% N₂, a 38.2 °C. De igual forma el desarrollo de embriones equinos en mórulas y blastocistos ha sido mayor en medio SOF modificado y suplementado con 1.5 mM de glucosa, y por el cultivo inicial en SOF modificado con la transferencia aproximadamente al día 5 a medio DMEM/ F-12 ²⁵.

Potros obtenidos mediante las técnicas de producción *in vitro* e ICSI han sido conseguidos de la transferencia de embriones tempranos en los oviductos de receptoras ³⁶. Sin embargo, es deseable el logro de un sistema completo que soporte el desarrollo de embriones equinos por producción *in vitro*, transferibles a nivel uterino antes que para transferencia oviductal. Dado que las tasas máximas de gestación (50%) han sido alcanzadas por transferencia de cigotos derivados de ICSI al oviducto de yeguas tratadas con progesterona ^{21, 42}.

Conclusiones

Para lograr el nacimiento de crías vivas a partir de embriones resultantes de procedimientos de reproducción asistida para la especie equina, ha sido necesario el avance de las técnicas de producción de embriones, desde la combinación de procesos *in vivo* e *in vitro*, y la obtención hace apenas dos décadas de los primeros embriones equinos producidos totalmente *in vitro*, hasta los recientes avances en las técnicas de fertilización y cultivo embrionario.

Con el uso de diversidad de sustancias, condiciones de cultivo e instrumentos tecnológicos se ha pretendido mejorar cada vez las tasas de maduración, fertilización y desarrollo embrionario, con lo cual se ha incrementado sin duda la calidad embrionaria, los resultados de la fertilización, y por ende la eficiencia en la producción de embriones viables.

Entre los métodos para la fertilización, la técnica ICSI ha demostrado ser la alternativa más viable para mejorar las tasas de fertilización, sin embargo sus altos costos y necesidades de especialización técnica, se convierten en una restricción sobretudo para la difusión comercial de este proceso.

Los medios de desarrollo embrionario para equinos requieren aún ser lo suficientemente estudiados, dado que los componentes exitosos en la producción de embriones de otras especies animales no siempre son los óptimos para los embriones equinos, lo que sugiere que deberán ser

maximizados los esfuerzos investigativos futuros para el mejoramiento de la técnica y sus resultados.

La producción *in vitro* de embriones equinos es una biotecnología que podrá ayudar a incrementar la eficiencia reproductiva, sobretodo en los países con sectores pecuarios ávidos de crecimiento, siempre y cuando se logre maximizar la difusión y comercialización de la técnica y sus resultados, para diseminar la genética de alta calidad productiva, y preservar las características genéticas de los animales.

Referencias

1. Aguilar J, Mas C, Reyley M, Ludueña R, Mouguelar H, Lusinno L. 2007. Nuclear maturation and mitochondrial distribution in equine oocytes matured *in vitro*. Anim Reprod; 4 (3/4):88-97.
2. Alm H, Torner H, Blottner S, Nußnberg G, Kanitz W. 2001. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on *in vitro* fertilization of horse oocytes. Theriogenology; 56: 817-829.
3. Bedford SJ, Kurokawa M, Hinrichs K, Fissore RA. 2004. Patterns of intracellular calcium oscillations in horse oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection: possible explanations for the low success of this assisted reproduction technique in the horse. Biol of Reprod; 70:936-944.
4. Bezaud J, Magistrini M, Duchamp G, Palmer E. 1989. Chronology of equine fertilisation and embryonic development *in vivo* and *in vitro*. Equine Vet J; 8 (suppl):105-110.
5. Bezaud J. 1992. *In vitro* fertilization in the mare. Proc Int Sci Conf Biotech Horse Reprod; 12.
6. Caillaud M, Dell'Aquila ME, De Santis T, Nicassio M, Lacalandra GM, et al. 2008. *In vitro* equine oocyte maturation in pure follicular fluid plus interleukin-1 and fertilization following ICSI. Anim Reprod Sci; 106 (3-4):431-9. Abstract.
7. Carneiro G, Lorenzo P, Pimentel C, Pegoraro L, Bertolini M, et al. 2001. Influence of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on *in vitro* maturation and parthenogenic development in equine oocytes. Biol of Reprod; 65:899-905.
8. Choi Y, Love L, Varner D, Hinrichs K. 2004. Factors affecting developmental competence of equine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Reproduction; 127:187-194.
9. Choi Y, Roasa L, Love C, Varner D, Brinsko S, Hinrichs K. 2004b. Blastocyst formation rates *in vivo* and *in vitro* of *in vitro*-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. Biol of Reprod; 70:1231-1238.
10. Choi Y, Landim F, Seidel G, Squires E. 2003. Effect of capacitation of stallion sperm with polyvinylalcohol or bovine serum albumin on penetration of bovine zona-free or partially zona-removed equine oocytes. J Anim Sci; 81:2080-2087.
11. Choi Y, Love C, Love L, Varner D, Brinsko S, Hinrichs K. 2002. Developmental competence *in vivo* and *in vitro* of *in vitro* matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. Reproduction; 123:455-465.
12. Choi Y, Okada Y, Hochi S, Braun J, Sato K, Oguri N. 1994. *In vitro* fertilization rate of horse oocytes with partially removed zonae. Theriogenology; 42:795-802.
13. Choi Y., Chung Y, Seidel G Jr, Squires E. 2000. Culture of equine embryos in trophoblast conditioned medium. Theriogenology; 53: 291, citado por Palma G.A. Biotecnología de la reproducción. 2001. Pág. 588.
14. Choi Y, Chung Y, Walker S, Westhusin M, Hinrichs K. 2003. *In vitro* development of equine nuclear transfer embryos: effects of oocyte maturation media and amino acid composition during embryo culture. Cambridge University Press; 11:77-86.

15. Cochran R, Meintjes M, Reggio B, Hylan D, Carter J, Pinto C, Paccamonti D, Godke RA. 1998. Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. *J Equine Vet Sci*; 18:736-741.
16. Del Campo MR, Donoso MX, Parrish JJ, Ginther OJ. 1990. *In vitro* fertilization of *in vitro*-matured equine oocytes. *J Equine Vet Sci*; 10:18-22.
17. Dell'Aquila M, De Felici M, Massari S, Maritato F, Minoia P. 1999. Effects of fetuin on zona pellucida hardening and fertilizability of equine oocytes matured *in vitro*. *Biol of Reprod*; 61:533-540.
18. Dell'Aquila ME, Cho YS, Minoia P, Traina V, Fusco S, et al. 1997. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and *in vitro*-matured equine oocytes. *Theriogenology*; 47:1139-1156.
19. Dell'Aquila ME, Cho YS, Minoia P, Traina V, Lacalandra GM, et al. 1997. Effects of follicular fluid supplementation of *in-vitro* maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after *in-vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*; 12: 2766-2772.
20. Galli C, Colleoni S, Duchi R, Lagutina I, Lazzari G. 2007. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by *in vitro* procedures ranging from *in vitro* maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci*; 98:39-55.
21. Galli C, Crotti G, Turini P, Duchi R, Mari G, et al. 2002. Frozen-thawed embryos produced by Ovum Pick Up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. *Theriogenology*; 58:705-708.
22. Goudet G, Bezard J, Duchamp G, Gerard N, Palmer E. 1997. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic *in vitro* maturation: effect of follicle size and hormonal environment. *Biol of reprod*; 57:232-245.
23. Goudet G, Bézard J, Belin F, Duchamp G, Palmer E, Gérard N. 1998. Oocyte competence for *in vitro* maturation is associated with histone h1 kinase activity and is influenced by estrous cycle stage in the mare. *Biol of Reprod*; 59:456-462.
24. Grondahl C, Host Hansen T, Hossaini A, Heinze I, Greve T, Hyttel P. 1997. Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro*-matured equine oocytes. *Biol of Reprod*; 57:1495-1501.
25. Hinrichs K. *In Vitro* Production of Equine Embryos: State of the Art. 2010. *Reprod Dom Anim*; 45 (Suppl. 2):3-8.
26. Hinrichs K y Williams K. 1997. Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *Biol Reprod*; 57:377-384.
27. Hinrichs K, Love C, Brinsko S, Choi Y, Varner D. 2002. *In vitro* fertilization of *in vitro*-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization *in vivo* after oviductal transfer. *Biol of reprod*; 67:256-262.
28. Hinrichs K, Schmidt AL, Friedman PP, Selgrath JP, Martin MG. 1993. *In vitro* maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. *Biol Reprod*; 48:363-370.
29. Hinrichs K, Choi Y, Walckenaer B, Varner D, Hartman D. 2007. *In vitro*-produced equine embryos: Production of foals after transfer, assessment by differential staining and effect of medium calcium concentrations during culture. *Theriogenology*; 68:521-529.
30. Li X, Morris LHA, Allen WR. 2002. *In vitro* development of horse oocytes reconstructed with the nuclei of fetal and adult cells. *Biol Reprod*; 66:1288-1292.

31. Lorenzo P, Lui I, Illera J, Picazo R, Illera M, *et al.* 2001. Influence of epidermal growth factor on mammalian oocyte maturation via tyrosine-kinase pathway. *J Physiol Biochem*; 57(1):15-22.
32. Losinno L, Aguilar J. Reproducción y biotecnologías en la producción equina. Sitio Argentino de Producción Animal. [acceso: 15 Nov. 2008]. URL: http://www.produccionbovina.com/produccion_equinos/curso_equinos_I/14-reproduccion_y_biotecnologias.pdf
33. Lydia G, Saura S, Echegaray A, Martínez F, De Blas I, *et al.* 2005. Effect of the *in vitro* maturation medium on equine oocytes: Comparison of follicular fluid and oestrous mare serum. *Acta Veterinaria Hungarica*; 53 (2):241-248.
34. Marchal R, Caillaud M, Martoriati A, Gérard N, Mermillod P, Goudet G. 2003. Effect of growth hormone (GH) on *in vitro* nuclear and cytoplasmic oocyte maturation, cumulus expansion, hyaluronan synthases, and connexins 32 and 43 expression, and GH receptor messenger RNA expression in equine and porcine species. *Biol of Reprod*; 69:1013-1022.
35. McKinnon AO, Lacham-Kaplan O, Trounson AO. 2000. Pregnancies produced from fertile and infertile stallions by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of single frozen-thawed spermatozoa into *in vivo* matured mare oocytes. *J Reprod Fertil Suppl.*; 56:513-517.
36. McPartlin L, Suárez S, Czaya C, Hinrichs K, Bedford-Guaus S. 2009. Hyperactivation of Stallion Sperm Is Required for Successful *in vitro* Fertilization of Equine Oocytes. *Biol of Reprod.*; 81:199-206.
37. Palma G. 2001. Biotecnología de la reproducción. 1a ed. Ediciones Inta Balcarce.
38. Palmer E, Be'zard J, Magistrini M, Duchamp G. 1991. *In vitro* fertilization in the horse: a retrospective study. *J Reprod Fertil Suppl*; 44:375-384.
39. Scott TJ, Carnevale EM, Maclellan LJ, Scoggin CF, Squires E. 2001. Embryo development rates after transfer of oocytes matured *in vivo*, *in vitro*, or within oviducts of mares. *Theriogenology*; 55:705-715.
40. Sepúlveda J, Silva M, y Berland M. 2003. Efecto de la adición de células de granulosa al medio TCM-199 sobre la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos equinos. II Reunión Anual Sociedad de Andrología y Gametología de Chile: IV Jornadas Internacionales de Medicina Reproductiva y Biología de la Reproducción. *J Int Morphol*; 21(2):167-175.
41. Squires E, Wilson J, Kato H, Blaszyk A. 1996. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*; 45:306. Abstract.
42. Tremoleda J, Stout T, Lagutina I, Lazzari G, Bevers M, *et al.* 2003. Effects of *in vitro* production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation. *Biol of Reprod*; 69:1895-1906.
43. Tremoleda J, Tharasanit T, Van Tol H, Stout T, Colenbrander B, *et al.* 2003. Effects of follicular cells and FSH on the resumption of meiosis in horse oocytes matured *in vitro*. Tesis Doctoral.
44. Vamderwall DK, Woods GL, Roser JF, Schlafer DH, Sellon DC *et al.* 2006. Equine cloning: applications and outcomes. *Rep Fert and Dev.*; 18:91-98.
45. Yoshimura Y, Nakamura Y, Koyama N, Iwashita M, Adachi T, Takeda Y. 1993. Effects of growth hormone on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril*; 59:917-923.
46. Zhang JJ, Boyle MS, Allen WR, Galli C. 1989. Recent studies on *in vivo* fertilization of *in vitro* matured horse oocytes. *J Equine Vet*; 8 (suppl):101-104.
47. Zhang JJ, Muzs LZ, Boyle MS. 1990. *In vitro* fertilization of horse follicular oocytes matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev*; 26:361-365.

Somos especialistas



UNIVERSIDAD CES

Un Compromiso con la Excelencia
Centro de Veterinaria y Zootecnia



Nuestros Servicios:

- Urgencias 24 horas para pequeñas y grandes especies
- Guardería para caninos y felinos
- Cirugía por laparoscopia • Ayudas diagnósticas
- Hospitalización • Almacén agropecuario
- Laboratorio Clínico Veterinario ICMT-CES

Centro de Veterinaria y Zootecnia CES

Calle 36D Sur km 4 Loma del Escobero - Envigado

PBX: 336 02 60 // Cel. 312 287 6897

www.ces.edu.co



Centro de Veterinaria y Zootecnia CES



@cvzces

Nueva Sede CVZ CES Tierragro bello a partir del 20 de octubre - Próximamente Itagüí

Toxicity with phenylbutazone in a horse: a case report*

Intoxicación con fenilbutazona en un equino: reporte de un caso

Jorge Mario Cruz Amaya^{1*}, MV, PhD; Luis Mauricio Montoya Flórez MVZ²

**Autor para correspondencia: Jorge Mario Cruz Amaya. Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias calle 65 N 26-10, Manizales. Teléfono 8781516. mario.cruz@ucaldas.edu.co*

¹ Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, calle 65 N 26-10.

² Maestrando, Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias.

(Fecha de recibido: 31 de enero de 2011; fecha de aceptado: 14 de junio de 2011)

Abstract

It is described a clinic case of an equine that developed severe digestive lesions after taking high dosage of phenylbutazone to treat a lameness. At the moment of checking, it had nine days of evolution. Since its arriving to the hospital, it was seen an intense lameness of the four limbs, dehydration and fetid diarrhea. After the physic exam, the interrogatory and the diagnostic aids it was proposed a diagnosis of traumatic laminitis, ulcerative gastritis and colitis by intoxication with Non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs). The condition became worse despite the therapy and when the neurological signs were presented. It was suggested the euthanasia. During the necropsy, it was seen severe lesions in the gastrointestinal tract, hooves and brain. The objective of this article is to describe la symptomatology, therapy and evolution of the intoxicated patient with NSAIDs.

Key words

Colitis, intoxicated, non-steroidal anti-inflammatory drug, phenylbutazone, ulcerative gastritis.

*Para citar este artículo: Cruz Amaya JM, Montoya Flórez LM. 2011. Intoxicación con fenilbutazona en un equino: reporte de un caso. Rev CES Med Vet Zootec. Vol 6 (1): 65-71

Resumen

Se describe el caso de un equino que desarrolló graves lesiones digestivas después de recibir dosis altas de fenilbutazona (FBZ) para tratar una claudicación. Al momento de la consulta tenía 9 días de evolución. Desde su llegada al hospital, se observó cojera grave de las cuatro extremidades, deshidratación y diarrea fétida. Luego del examen físico, la anamnesis y las ayudas diagnósticas se propuso un dictamen de laminitis traumática, gastritis ulcerativa y colitis por intoxicación con antiinflamatorios no esteroides (AINES). La condición empeoró a pesar de la terapia y cuando se presentaron signos neurológicos se sugirió la eutanasia. Durante la necropsia se observaron lesiones graves en el tracto gastrointestinal, cascos y encéfalo. El objetivo de este artículo es describir la sintomatología, terapia y evolución de un paciente intoxicado con aines.

Palabras clave

Antiinflamatorios no esteroides, colitis, fenilbutazona, gastritis ulcerativa, intoxicación.

Resumo

Descreve-se o caso de um cavalo que desenvolveu lesões digestivas graves após receber altas doses de fenilbutazona (FBZ) para tratar uma claudicação. No momento da consulta havia 9 dias de evolução. Desde sua chegada ao hospital, observou-se manqueira grave nas quatro extremidades, desidratação e diarreia fétida. Após o exame físico, a anamnese e os meios diagnósticos concluiu-se se tratar de laminite traumática, gastrite ulcerativa e colite por intoxicação com anti-inflamatórios não esteróides (AINES). A condição piorou apesar do tratamento e, quando apresentou sinais neurológicos, sugeriu-se a eutanásia. Na necrópsia observaram-se lesões graves no trato gastrointestinal, cascos e encefalo. O objetivo deste trabalho é descrever os sintomas, o tratamento e a evolução de um paciente intoxicado com AINES.

Palavras-chave

Anti-inflamatórios não esteróides, colite, fenilbutazona, gastrite ulcerativa, intoxicação

Introducción

En equinos el uso indiscriminado de AINES para tratar afecciones músculo esqueléticas es común. Las lesiones por toxicidad debidas a estos fármacos aparecen con frecuencia a nivel gástrico, pero también, es posible observar colitis grave, insuficiencia renal o una combinación de estas condiciones^{2,9}.

Los AINES causan ulceración de la mucosa gástrica al inhibir la ciclooxigenasa y suprimir la producción de prostaglandinas, las cuales son vitales para mantener la

integridad de la mucosa intestinal y gástrica¹⁰. Los AINES causan disrupción de la barrera epitelial lo que resulta en una permeabilidad incrementada a las toxinas bacterianas^{2,5}.

La colitis del colon dorsal derecho esta asociada al suministro de AINES a dosis altas. La enfermedad ha sido inducida en caballos que reciben FBZ y una ración reducida de agua, lo que sugiere que la administración de este medicamento en un animal deshidratado es un

factor de riesgo². De otra parte, la condición también se observó en animales que reciben una dosis correcta de AINES, al parecer debido a una sensibilidad individual a los efectos tóxicos de estos fármacos².

Otras causas documentadas de colitis aguda en el caballo incluyen bacterias (*Salmonella spp*, *Clostridium spp*), rickettsias (*Neorickettsia risticii*), parásitos (Cyatostomas), y disbiosis bacteriana debido a la terapia con ciertos antibióticos⁹. La etiología más común de brotes de colitis es la salmonelosis, mientras que brotes debido a clostridium o rickettsias son raros¹³.

La colitis equina es una grave condición que pone en peligro la vida del animal, se caracteriza por diarrea profusa originada por una liberación abundante de mediadores de la inflamación e infiltración de neutrófilos en la mucosa y submucosa del órgano. Durante la enfermedad se produce mala absorción de ácidos grasos volátiles y alteraciones metabólicas que llevan a un balance energético negativo y catabolismo de los tejidos corporales⁹. Con frecuencia la severidad de la condición demanda varios días de terapia intensiva, donde deben considerarse el reemplazo de fluidos, electrolitos, proteínas plasmáticas, modificaciones en el estado inflamatorio y antibioterapia⁹.

Los signos clínicos de la colitis equina son el resultado de la respuesta inflamatoria y la endotoxemia. Fiebre o temperatura subnormal, taquicardia y taquipnea son consistentes con una respuesta inflamatoria sistémica⁵. Otros signos clínicos incluyen letargia, íleo o hipermotilidad, membranas mucosas congestionadas, deshidratación e hipovolemia por diarrea acuosa abundante. En forma paradójica algunos caballos presentan íleo adinámico y ausencia de defecación a pesar de la colitis grave, estos pacientes suelen mostrar dolor abdominal severo, lo que dificulta el diagnóstico con una lesión obstructiva o isquémica del intestino⁵.

Los pacientes con colitis pueden sufrir complicaciones como laminitis, tromboflebitis, infarto del colon y diseminación de bacterias a otros órganos⁹.

El objetivo de este reporte es describir la sintomatología, terapia y evolución de un equino que recibió dosis altas de AINES, desarrollando una colitis grave y otras lesiones digestivas.

Caso clínico

Anamnesis

Al Hospital Veterinario “Diego Villegas Toro” de la Universidad de Caldas fue presentado un equino macho, criollo colombiano, de 10 años de edad con historia de 9 días de enfermedad. El animal pesaba 263 kg, y su condición corporal era de 3.5 sobre 9.

El animal fue sometido a una dura cabalgata por caminos pavimentados, al otro día se rehusaba caminar y a partir de este momento no volvió a comer normalmente y prefería estar en decúbito. También se reportó diarrea fétida el día anterior a la consulta.

El propietario lo trató con FBZ 2 gr / cada 12 horas/ vía IV / 8 días y fluidos parenterales, pero su condición no mejoró. Igualmente se inyectó con flunixin meglumina, pero no fue posible precisar la cantidad y la frecuencia de las aplicaciones de este fármaco. Tampoco se pudo esclarecer como fue la terapia de fluidos.

Examen físico

Cuando el animal descendió del camión se hizo evidente una gran torpeza para caminar por dolor intenso en las cuatro extremidades. Las constantes vitales registradas fueron temperatura 38,4 °C, frecuencia respiratoria 24 por minuto, frecuencia cardíaca 88 por minuto, mucosas congestivas, tiempo de llenado capilar 3 segundos, hiperperistaltismo en los cuatro cuadrantes y pulso digital muy evidente al tacto en las cuatro extremidades. La palpación del surco coronario en las extremidades reveló hundimiento en las posteriores. Se calculó una deshidratación del 8%.

Plan diagnóstico

Se recomiendan radiografías laterales de los cascos en las cuatro extremidades, hemograma completo y química sanguínea (creatinina, BUN, ALT, AST, GGT y fosfatasa alcalina). Para la radiografías se procedió a colocar un alambre en el aspecto más dorsal de las pinzas y una tachuela en la punta de la ranilla, ambas marcas actúan como punto de referencia para determinar la posición de la tercera falange dentro del casco. En las radiografías se observó angulación entre el aspecto dorsal de la tercera falange y la pared del casco en las extremidades

posteriores, además se constató que la distancia entre la falange y la pared del casco era de 23 mm, lo que confirmó el diagnóstico de laminitis.

En el hemograma se encontró leucocitosis (23400 células/mm³) con bandas (11%), mientras que en la química sanguínea no se observaron anormalidades.

Sobre los hallazgos físicos, los datos de la anamnesis y los hallazgos radiográficos y de patología clínica se definió un diagnóstico presuntivo de laminitis traumática, gastritis ulcerativa y colitis, posiblemente por intoxicación con AINES.

Plan terapéutico y evolución

Desde su llegada al centro hospitalario la diarrea se tornó severa, fétida y hemorrágica. Se retiraron las herraduras y el animal se puso en una pesebrera con cama alta. El paciente no volvió a ingerir alimentos y sólo bebía cantidades pequeñas de agua. Se instauró terapia de hidratación con Ringer lactato, considerando un 8 % de deshidratación, más el mantenimiento (50 ml/kg/día) y las pérdidas adicionales. Se prescribieron antibióticos, ceftiofur (2.2 mg/kg/ cada 12 horas/IV) y gentamicina (4.4 mg/kg/ cada 24 horas/IV), ranitidina (1.5 mg/kg/ cada 8 horas/IV), dimetil sulfóxido (25 ml en suero fisiológico hasta una concentración del 10%) y acepromacina (10 mg/ animal/ cada 12 horas/IM).

No se observó mejoría clínica con el paso de los días y su estado fue deteriorándose progresivamente. Hacia el cuarto día se apreciaron signos de daño a nivel de sistema nervioso central como ceguera, marcha en círculo, déficit propioceptivo (Figura 1) y apoyo de la cabeza contra las paredes de la pesebrera. Posteriormente apareció edema en las extremidades posteriores y el prepucio (Figura 2).

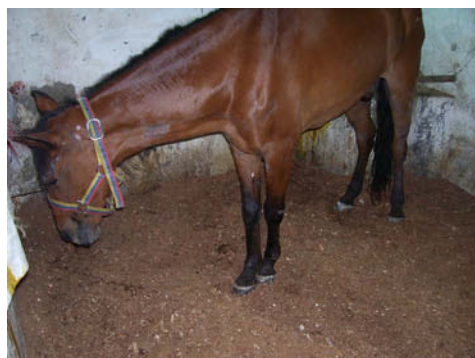


Figura 1. Fallos en la propiocepción que se evidencian por la estancia con las extremidades cruzadas.



Figura 2. Edema del prepucio, abdomen y extremidades, que se produjo como consecuencia de la disminución en la presión oncótica, debido a pérdida intestinal de proteínas.

Hacia el día séptimo se presentó tromboflebitis en la yugular derecha, lo que obligó a canular una de la venas cefálicas para administrar los fluidos y los medicamentos.

La respiración se hizo disnéica y el animal no volvió a beber, se le pasó una sonda nasogástrica para suministrarle fluidos por vía oral. La pérdida de peso fue muy notoria (condición corporal 2) y ante los signos de enfermedad multisistémica se decidió la eutanasia el día nueve de su arribo al centro hospitalario.

Hallazgos de necropsia

Los hallazgos más significativos de la necropsia incluyeron gastritis generalizada, se encontró una úlcera de 5 centímetros de diámetro en la región glandular que casi perforaba la pared gástrica (Figura 3). Severa y generalizada inflamación en mucosa del intestino delgado y ciego, colitis severa muy extensa con áreas hemorrágicas, edematosas y necróticas multifocales (Figura 4). En riñones, se observaron áreas multifocales de infarto en la corteza renal. En pulmones se observó congestión y edema generalizado, áreas nodulares multifocales que al incidirlas contenían un material blanco caseificado. En cerebro se evidenció congestión moderada de las meninges y en la región frontal una zona

con hemorragia severa y malacia compatible con un absceso (Figura 5). Los cascos se cortaron con una sierra oscilante de manera paralela al eje podal, se descubrió rotación de la tercera falange en los cascos posteriores.

Durante la necropsia se recolectó contenido de intestino delgado y colon, al cual se le realizó cultivo bacteriológico, en este cultivo crecieron bacterias del género *Rhodococcus spp.*

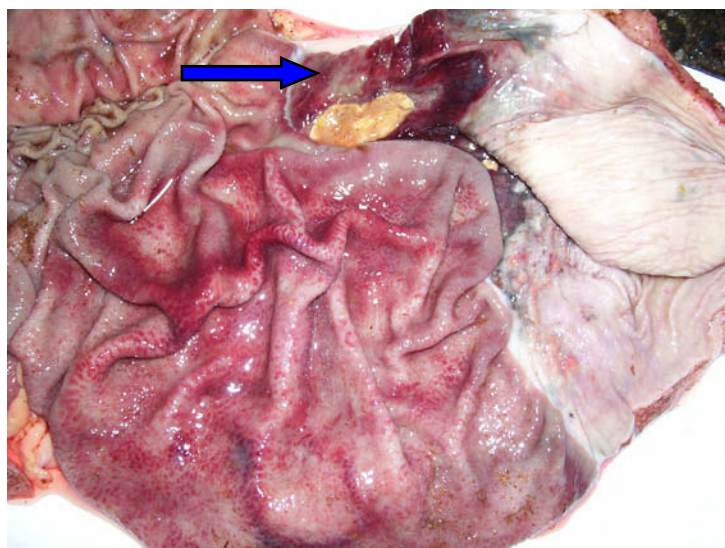


Figura 3. Gastritis severa y generalizada, con ulceración en la porción glandular del estómago (flecha azul).



Figura 4. Mucosa del colon mayor inflamada, ulcerada y severamente edematizada.

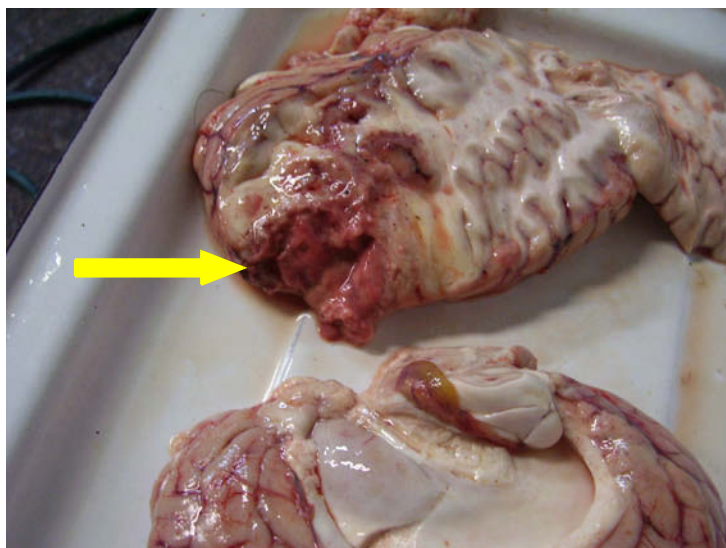


Figura 5. La flecha señala un área de malacia en la corteza cerebral, compatible con un absceso.

Hallazgos histopatológicos

Los hallazgos histopatológicos más importantes incluyeron, a nivel renal una severa y generalizada dilatación de la cápsula de bowman y de los túbulos, presencia intratubular de material compatible con proteína y cristales de urato. En el cerebro se halló una severa y generalizada infiltración de neutrófilos, tejido necrótico en la zona compatible con un absceso. A nivel de pulmón, se observaron granulomas multifocales y hemorragia de forma diseminada y moderada. En el estómago se encontró una área de cicatrización severa y células inflamatorias de forma diseminada; en el colon se observó la mucosa edematosa y una generalizada y severa presencia de células inflamatorias de tipo mononuclear.

Discusión

En este paciente la claudicación producida por la laminitis traumática motivó la aplicación de FBZ y otros AINES de manera inapropiada y produjo toxicosis a nivel gástrico y colónico. Los efectos tóxicos de la FBZ, se observan principalmente a nivel del tracto gastrointestinal en forma de úlceras gástricas y colitis necrotizante con pérdida de proteínas⁸, los hallazgos de lesiones compatibles durante la necropsia confirmaron el diagnóstico. El uso indebido de AINES para el tratamiento de condiciones ortopédicas resulta en toxicidad gastrointestinal y/o renal ^{2,7,9}. Aunque las lesiones en el riñón son más frecuentes si el animal esta deshidratado⁸.

La anorexia y la diarrea generaron deshidratación en este animal, y si bien, los niveles de creatinina y BUN estaban en límites normales durante el primer análisis sanguíneo, los hallazgos histopatológicos descubrieron que se desarrollaron daños renales varios días después, posiblemente como una consecuencia de la colitis grave, la cual se acompaña de septicemia, toxemia y mala perfusión tisular, condiciones que explicarían la aparición de las lesiones a nivel renal en los días que siguieron a la diarrea.

Los AINES causan nefropatías al inhibir la síntesis de prostaglandinas vasopresoras que regulan el flujo sanguíneo renal, la filtración glomerular, el transporte tubular de iones, la liberación de renina y el metabolismo del agua⁸. La aplicación de FBZ de manera inapropiada posiblemente creó en este paciente las condiciones adecuadas para que una vez, el estado inflamatorio del colon se hiciera grave, se desarrollara daño renal varios días después del arribo al hospital.

Las lesiones gástricas e intestinales que induce la FBZ son el resultado de la injuria microvascular y la disminución en la producción de moco por bajas concentraciones de prostaglandinas³. Además, al inhibirse la vía metabólica del ácido araquidónico a través del bloqueo en la ciclooxigenasa, se incrementa la vía de la lipooxigenasa, lo que aumenta los leucotrienos, ácidos hidroxiperoxi-eicosatetranoicos y radicales libres que a su vez también son gastrolesivos¹².

La toxicidad de los AINES depende de su acción selectiva sobre la ciclooxigenasa 1 y 2, como ambas enzimas están presentes en el tracto gastrointestinal y en el riñón, todos los AINES pueden causar en mayor o menor grado lesiones en esos órganos⁶, si bien, es más difícil causar toxicidad si se utilizan AINES COX 2 selectivos, desafortunadamente su uso en grandes animales es prohibitivo por el costo¹¹.

Los equinos están predispuestos a sufrir de úlcera gástrica cuando se medican con AINES, principalmente si el animal está anoréxico, debido a que en el estómago vacío el pH gástrico es muy ácido¹⁰. En este paciente el diagnóstico de gastritis ulcerativa se confirmó durante la necropsia, cuando se tiene acceso al endoscopio, esta ayuda permite confirmar el daño a la mucosa gástrica de manera rápida y no invasiva.

La colitis inducida por AINES casi siempre se limita al

colon dorsal derecho, ocasionalmente también se observa colitis generalizada². Los hallazgos de necropsia en este animal demostraron que todo el colon se afectó (Figura 4) y también fue evidente una gran úlcera a nivel de la porción glandular del estómago (Figura 3). La toxicidad por AINES a nivel gástrico generalmente afecta la porción glandular del estómago¹⁰, mientras las úlceras espontáneas suelen producirse cerca al *margo plicatus* en la porción no glandular^{10,11}.

Como el paciente de este reporte resultó gravemente cojo después de un trabajo excesivo en suelos duros, es posible suponer que el estrés mecánico al que fue sometido originó laminitis traumática. Mediante el examen físico del animal al momento del arribo al hospital se estableció que existía pulso digital más evidente al tacto en las cuatro extremidades y gran dificultad para deambular, el estudio radiográfico permitió confirmar el diagnóstico, debido a que en las extremidades posteriores se observó rotación de la tercera falange, signo típico de la enfermedad.

Una vez se presentó la claudicación, el animal se trató con inyecciones de FBZ, y flunixin meglumina. La susceptibilidad al cuadro de intoxicación por FBZ varía de acuerdo a la raza, duración del tratamiento, vía de administración y la dosis; Incluso, algunos equinos pueden desarrollarla con las dosis terapéuticas^{2,6}.

Posterior al inicio del tratamiento con FBZ la anorexia se hizo pronunciada y aparecieron los signos de diarrea fétida y severa. Datos que concuerdan con los reportes de literatura donde se describe que los signos iniciales de toxicidad gastrointestinal por FBZ incluyen inapetencia, depresión, diarrea, pérdida de peso y a veces cólico¹.

Cuando el paciente ingreso al hospital la diarrea empeoró, lo que impuso aumentar la terapia de fluidos, el propietario fue advertido de la necesidad de transfusiones de plasma o aplicaciones de coloides para prevenir la aparición de hipoproteíнемia, y la subsecuente ocurrencia de edemas, pero las restricciones económicas impidieron implementar este tratamiento. Se observó entonces edema periférico varios días después, más intenso en el prepucio.

La literatura refiere que en la colitis, ocurre una infiltración de células inflamatorias y un aumento de la permeabilidad capilar a nivel de la mucosa y submucosa

que conduce a edema, por pérdida de proteínas a la luz intestinal, con reducción considerablemente de la presión oncótica del plasma¹.

Siete días después del ingreso al hospital, el paciente desarrolló una tromboflebitis que obligó, a utilizar otras venas para medicar el animal. La tromboflebitis es una condición frecuente en los equinos, puede tener diversas etiologías, pero es muy notoria en animales toxémicos, también puede originarse cuando se medican fármacos irritantes por vía intravenosa como la FBZ⁶.

Los hallazgos de necropsia e histopatología dan cuenta de lesiones pulmonares de carácter granulomatoso, este tipo de lesión es típico de procesos crónicos, posiblemente el animal presentaba una lesión compensada en el pulmón de carácter insidioso que se descompensó durante la crisis de septicemia y toxemia propias de la colitis, lo que explicaría la disnea que se observó hacia el día séptimo de hospitalización.

Con respecto a la presencia del *Rhodococcus equi* en el cultivo tomado del contenido intestinal, debe interpretarse con cautela, ya que esta bacteria es un habitante normal del intestino del equino, sin embargo, en condiciones de inmunodepresión puede causar colitis⁴. Los signos neurológicos como: aparente ceguera, marcha en círculo, apoyo de la cabeza contra los muros y fallos en la propiocepción hicieron pensar en un émbolo séptico a nivel del SNC originado posiblemente en el colon inflamado, la necropsia y posterior examen histopatológico confirmaron esta sospecha, en otros reportes la metástasis bacteriana desde el colon a órganos distantes se ha descrito¹⁰.

Por último, es importante que la formulación de AINES se realice de manera juiciosa, sin exceder no sólo la dosis, si no también el número de días que pueden aplicarse estos fármacos sin causar toxicidad. En general la FBZ se recomienda a una dosis de 4.4 mg/kg/IV, cada 12 horas el primer día, para continuar con 2.2 mg/kg/IV, durante cuatro días más como máximo. No se considera razonable medicar dos AINES al mismo tiempo, sin aumentar el riesgo de intoxicación.

Referencias

1. Dowling P. 2002. Adverse Drug Reactions in Horses. Clin Tech Equine Pract, 1. (2): p 58-67.
2. Jones S. Right dorsal colitis. In: Robinson N. 2003. Current Therapy in Equine Medicine. 5 ed. Philadelphia. Saunders; p 141-143.
3. MacAllister C, Morgan J, Borne T, Pollet A.1993. Comparasion of adverse effects of phenylbutazone, flunixin meglumine, and ketoprofen in horse. JAVMA; 202: 71-77.
4. MacGavin M, Zachary J. 2007. Phatologic basis of veterinary diseases. 4ed. London. Mosby Elsevier.
5. Magdesian K. Clostridium difficile infection. In: Robinson N. (2003). Current Therapy in Equine Medicine. 5 ed. Philadelphia. Saunders; p 166-169.
6. Pereira M, Fiório R, Souza A, Ferreira C, Mocaiber S. 2009. Intoxicação por fenilbutazona em equino: relato do caso. Acta Veterinaria Brasilica 2(3): 111-116.
7. Mitten L, Hinchcliff K. Nonsteroidal anti-inflamtory drugs. In: Robinson N. (1997). Current Therapy in Equine Medicine. 4 ed. Philadelphia. Saunders; p 724-726.
8. Monreal D, Sabat D, Segura I, Mayós H. 2004. Lower gastric ulcerogenic effect of suxibuzone compared to phenylbutazone when administered orally to horses. Research in Veterinary Science (76): 145-149.
9. Murray M. Acute colitis. In: Robinson N. (1997). Current Therapy in Equine Medicine. 4 ed. Philadelphia. Saunders; p 197-203.
10. Murray M. Diseases of the stomach. In: Mair T, Divers T, Ducharme N. 2002. Manual of Equine Gastroenterogy. London. Saunders; p 241-248.
11. Nadeau J, Andrews F. Gastric Ulcers Syndrome. Robinson N. 2003. Current Therapy in Equine Medicine. 5 ed. Philadelphia. Saunders; p 94-100.
12. Kumar V, Abbas A, Fausto N: En Robbins y Cotran. 2005. Patología estructural y funcional. 7 ed. Elsevier: p 47-119.
13. Sánchez C. Gastrointestinal and peritoneal infections. In: Sellon D, Maureen T. 2007. Equine Infectious Diseases. St.Louis. Saunders: p 39-46.

