

CONCLUSIONES

El presente reporte demuestra la presencia de tres especies diferentes de *Cooperia* parasitando en condiciones naturales a bovinos en Uruguay, siendo *C. oncophora* la especie de mayor porcentaje relativo entre las especies identificadas. Esta diversidad de especies, requiere de un mayor estudio para identificar potenciales implicancias epidemiológicas y patológicas entre las especies de *Cooperia* que parasitan los bovinos en Uruguay.

BIBLIOGRAFÍA

- Lapage, G. 1979. Capítulo 8. En: Parasitología Veterinaria (pp. 121-143). México D.F, Compañía Editorial Continental S.A.
- Nari, A, Cardozo, H 1986. Bases epidemiológicas para el control de nematodos intestinales en rumiantes del Uruguay. XIV Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay. pp. B.1-B.3.
- Niec, R. 1968. Cultivo e identificación de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales del bovino y ovino. Manual técnico, 3.
- Stringfellow F. 1970. Comparative Morphology of the Genital Cones of *Cooperia* (Nematoda: Trichostrongylidae) from Cattle and Sheep in the United States with a Key to the Common Species. The Journal of Parasitology, Vol. 56, No. 6, pp 1189-1198.

DESARROLLO DE UN MODELO IN VITRO PARA EL ESTUDIO DE LA PATOGENICIDAD DE *Campylobacter fetus* SOBRE ESPERMATOZOIDES BOVINOS

Claudia Inés Cagnoli^{1,2}, María Laura Chiapparrone¹, Carolina Daglio¹, Claudio Cacciato^{1,3}; Pedro Soto¹, María Catena¹.

¹ Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental. NACT. SAMP. FCV. UNCPBA. ² Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. *Autor de correspondencia: ccagnoli@vet.unicen.edu.ar

³ Comisión de Investigaciones Científicas.

RESUMEN

La campylobacteriosis bovina es una enfermedad causada por *Campylobacter fetus fetus* y *Campylobacter fetus venerealis*. Se caracteriza por producir mortalidad embrionaria y abortos esporádicos. Si bien *Campylobacter fetus* ha sido estudiado desde hace muchos años, no se han realizado estudios suficientes sobre el comportamiento de sus subespecies de acuerdo a los diferentes sitios de colonización en el tracto reproductivo bovino y la patogenia durante la etapa de preñez temprana. Una de las posibles células blanco son los espermatozoides. Estudios previos demostraron que *Campylobacter fetus venerealis* tiene la capacidad de adherirse a espermatozoides bovinos, pero aún se desconoce el efecto sobre los mismos. Debido a

lo expuesto, en el presente trabajo se describe el desarrollo de un modelo experimental que tiene como objetivo evaluar la adhesión y patogenicidad *in vitro* de *Campylobacter fetus fetus* y *Campylobacter fetus venerealis* sobre los espermatozoides bovinos.

SUMMARY

Bovine campylobacteriosis is a disease caused by *Campylobacter fetus fetus* and *Campylobacter fetus venerealis*. It is characterized by early embryonic death and sporadic abortion. Although, *Campylobacter fetus* has been studied for many years, little it's known about both subspecies behavior colonization sites on reproductive tract and early pregnancy pathogenesis. One of the possible target cells are spermatozoa. Previous studies showed

that *Campylobacter fetus venerealis* can adhere to the bovine sperm, but its effect on them is still unknown. Therefore, in this study, we describe an experimental study model and our aim is to study the adhesion and *in vitro* pathogenicity of both, *Campylobacter fetus fetus* and *Campylobacter fetus venerealis* on bovine sperm.

INTRODUCCIÓN

La patogenicidad de la campylobacteriosis bovina ha sido estudiada en forma generalizada. Se comprobó que *Campylobacter fetus fetus* y *venerealis* pueden colonizar el prepucio, y transmitirse a la hembra durante el coito. En la hembra se localizan en el fondo de vagina y luego migran hacia el útero durante la faz progestacional, se adhieren a la mucosa y causan endometritis, salpingitis y la muerte del embrión (Campero *et al.*, 2005).

Los estudios realizados para comprender la patogenicidad de la campylobacteriosis genital se basaron en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*. Los modelos *in vivo* se realizaron en su huésped natural, el bovino (Catena, 2002) y en especies alternativas, como ratones y cobayos. Los modelos *in vitro* se basaron en la fertilización de ovocitos bovinos (Bielanski *et al.*, 1999), el cultivo de embriones murinos (Catena *et al.*, 2008) y los cultivos primarios de células vaginales y uterinas (Catena *et al.*, 2006; Catena *et al.*, 2007; Chiapparrone *et al.*, 2011). Con respecto al macho, se realizaron estudios sobre el efecto de *Campylobacter fetus fetus* sobre espermatozoides en ovinos (Zan Bar *et al.*, 2008), mientras que en bovinos sólo se demostró que *Campylobacter fetus venerealis* tiene la capacidad de adherirse (Chiapparrone *et al.*, 2016) pero aún no se determinó su patogenicidad. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un modelo *in vitro* que permita evaluar la patogenicidad de ambas subespecies de *Campylobacter* sobre los espermatozoides bovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo del modelo se utilizaron pajuelas de semen bovino criopreservado de 0,5 mL, previamente analizadas en el Servicio Especializado de Semen bovino y calificadas como aptas para los valores de motilidad progresiva, vigor, número de

espermatozoides, morfología y calidad microbiológica (Barth, 1995). Estas fueron inoculadas con una cepa de *Campylobacter fetus fetus* (CFF) y una de *Campylobacter fetus venerealis* (CFV).

Preparación de los espermatozoides: las pajuelas fueron descongeladas en baño María a 38°C, y volcadas en microtubos estériles. Posteriormente, se centrifugaron a 200g para lograr que los espermatozoides desciendan. El sobrenadante fue descartado y los espermatozoides fueron lavados y resuspendidos en medio SOF (Synthetic Oviductal Fluid) con heparina. Una alícuota fue tomada para realizar las mediciones iniciales (Hora 0) y el resto dividido de la siguiente manera: grupo control, grupo inoculado con CFF y grupo inoculado con CFV. **Preparación de las cepas:** las cepas utilizadas fueron descongeladas y cultivadas durante 48 h en placas con medio Skirrow, a 37 °C y una atmósfera de 10% de CO₂, 5% de O₂ y saturación con N₂. A partir de las colonias obtenidas se prepararon suspensiones, con un valor de DO_{660nm} 0,14 medidas por espectrofotometría (1,1x10⁸ UFC/mL) y los inóculos se realizaron mediante diluciones (relación bacteria: espermatozoides de 2:1). Dichos inóculos se colocaron en los pocillos correspondientes a cada grupo de espermatozoides como se mencionó anteriormente, y se incubaron durante 24 h en estufa con 5% de CO₂ a 38 °C.

Parámetros espermáticos evaluados: las mediciones iniciales (Hora 0) se realizaron sobre los parámetros de vitalidad espermática, integridad y funcionalidad de la membrana plasmática e integridad del ADN. Luego de la incubación se midió, además de los anteriores, la reacción acrosómica y el porcentaje de espermatozoides con *Campylobacter* adherido. Cada una de estas mediciones fue realizada sobre 100 espermatozoides de cada grupo indicado. La vitalidad espermática y la integridad de la membrana se midieron mediante coloración vital eosina nigrosina. Para realizar esta técnica se colocó una alícuota de semen en un portaobjeto sobre platina térmica a 37 °C. Se agregó la eosina, se homogeneizó y posteriormente se añadió nigrosina y realizó el extendido. La observación se realizó en microscopio óptico (40X).

La funcionalidad de la membrana se midió mediante el test hiposmótico (HOST). En esta prueba se incubó una alícuota de

semen en un medio hiposmótico (solución de fructosa y citrato de sodio, 150 mOsm) en baño María a 38 °C durante 60 min. La observación se realizó en microscopio de campo oscuro (40X).

Para evaluar la integridad del ADN se utilizó el test de la dispersión de la cromatina (SCD). Los espermatozoides fueron incluidos en portaobjetos con una matriz de agarosa y tratados con una solución ácida de HCl para desnaturalizar el ADN. Posteriormente, se utilizaron dos soluciones de lisis para remover las membranas y proteínas. El efecto fue visualizado por la tinción 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) en microscopio con luz azul.

La reacción acrosómica fue observada mediante la tinción Trypan-blue / Giemsa. Para esto se mezcló una alícuota de semen con igual volumen del colorante Trypan-blue en una concentración del 0.30%, y luego se realizaron extendidos que fueron secados y colocados en solución de fijación. Finalmente se sumergieron en Giemsa 7% (37 °C, 2h). La observación se realizó en microscopio óptico 100X (inmersión).

La adhesión de *Campylobacter* se determinó mediante la realización de extendidos de los espermatozoides inoculados, y coloreados con Giemsa 10%. Previamente las alícuotas fueron centrifugadas y lavadas con PBSs pH 7,2. Para su visualización se utilizó microscopio óptico a 100X, objetivo de inmersión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El modelo detallado se encuentra en su etapa de validación con el estudio de cepas indígenas y semen bovino criopreservado de diferentes toros. Los resultados preliminares de la etapa de validación indican que CFV y CFF tienen alto grado de adhesión a espermatozoides (40 - 50%) con efecto sobre los parámetros de vitalidad espermática, integridad y funcionalidad de la membrana plasmática y reacción acrosómica, no así en la integridad del ADN. Ambas subespecies tendrían un comportamiento similar.

CONCLUSIONES

El presente modelo demuestra ser apto para la observación de la patogenicidad *in vitro* de ambas subespecies de *Campylobacter fetus* y podría ser utilizado para evaluar el efecto de otros patógenos de la reproducción.

BIBLIOGRAFÍA

- Barth, A.D (1995). Evaluation of Frozen Semen by the Veterinary Practitioner. Proc. Of Bovine. Short Course. Society for Theriogenology 1995: 105-110
- Campero, C.M; Anderson, M.L; Walker, R.L, Blanchard, P.C; Barbano, L.; Chui, P..(2005). Immunohistochemical Identification of *Campylobacter fetus* in Natural Cases of Bovine and Ovine Abortions. J. Vet. Med. B 52, 138-141
- Catena, M. (2002). *Campylobacteriosis* genital bovina: inmunopatogenia de la mortalidad embrionaria. Tesis doctoral para obtener el grado de Doctor en Ciencia Animal de la FCV. UNCPBA. 1-134
- Catena, M.; Chiapparrone, L.; Morán, P.; Pasucci, J.; Echevarría, H.; Monteavaro, C.; Soto, P. (2007). Adhesión de *Campylobacter fetus venerealis* a células vaginales y endometriales de bovinos. XI Congreso Argentino de Microbiología. Poster: 606-20726.
- Catena, M.; Morán, P.; Monteavaro, C.; Echevarría, H.; Cacciato, C.; Soto, P. (2006). Cultivos primarios de células vaginales y endometriales bovinas: su potencial aplicación. Rev Biocell. 30(3). 516.
- Catena, M.; Teruel, M.; Morán, P.; Chiapparrone, M.; Echevarría, H.; Monteavaro, C.; Soto, P. (2008). Evaluación del desarrollo preimplantacional de embriones murinos *in vitro* en presencia de *Campylobacter fetus venerealis*. Revista Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Nordeste. Corrientes. Argentina. Vol. 19. Nº 2. 109-113.
- Bielanski, A.; Sampath, M.; Gradil, C.; Eaglesome, M.; García, M. (1999). *In vitro* fertilization of bovine ova in the presence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*. Repr Dom Anim Vol. 29. 488-493.
- Chiapparrone, M.L; Morán, P.; Pasucci, J.A.; Echevarría, H.M; Monteavaro, C.; Soto, P.; Rodriguez, E.; Catena, M. (2011). Quantitative analysis of *Campylobacter fetus venerealis* adhesion to bovine reproductive tract cell cultures. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 48 (1): 73-78
- Chiapparrone, M. L.; Soto, P.; Catena, M. (2016). Characterization of the *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* adhesion to bovine sperm cells. Int. J. Morphol., 34(4):1419-1423.
- Zan Bar, T.; Yehuda, R.; Hacham, T.; Krupnik, S.; Bartoov, B. (2008). Influence of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* on ram sperm cell

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION PARENTERAL DE SELENIO SOBRE LA ESTABILIDAD DEL COLOR Y CONCENTRACIÓN DE SELENIO EN LA CARNE DE CORDERO

Franco, J.¹, Realini, C.², Cabrera, C.³, De los Santos, C.⁴, Huss, C.⁴, Delpiazso, R.⁵, Bentancur, O.⁶.

¹ Facultad de Veterinaria. EEMAC. Departamento de Salud en los Sistemas Pecuarios. *jufra@fagro.edu.uy

² CENUR Noroeste. Polo Producción y Reproducción de Rumiantes. ³ Facultad de Agronomía.

Departamento de Producción Animal y Pasturas. ⁴ Estudiantes de grado en Tesis de Facultad de Veterinaria.

⁵ Facultad de Veterinaria. EEMAC. Departamento de Salud en los Sistemas Pecuarios. ⁶ Facultad de Agronomía. Departamento de Bioestadística y Cómputos.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la administración parenteral de selenio sobre la estabilidad del color y los niveles de selenio en la carne. Se utilizaron 30 corderos cruza (madres Milchaf con padres Corriedale) de 4 meses de edad. Los corderos fueron estratificados en 2 grupos según sexo, peso vivo y condición corporal, de 15 corderos cada uno. Los tratamientos fueron T1: control y T2: administración parenteral de 0,1mg/kg de selenito de sodio vía subcutánea 60 días y 20 días prefaena. La administración de selenio inorgánico no tuvo efecto en performance, características de la canal y en la evolución del color. La concentración de Selenio en el músculo fue de 60µg/100g, lo que es considerada aceptable para cubrir las necesidades diarias de este micro elemento.

SUMMARY

The objective of the present study was to study the effect of parenteral administration of selenium on color stability and the selenium muscle levels. The lambs were stratified in 2 groups according to sex, live weight and initial body condition, of 15 lambs each. The treatments were: T1: control and T2: Parenteral administration of 0.1mg/kg of sodium selenite via subcutaneous 60 days and 20 days

preslaughter. Inorganic selenium administration had no effect on performance, carcass characteristics and color evolution. The concentration of 60 µg / 100 g of selenium is considered satisfactory to cover the daily requirements of this microelement.

INTRODUCCIÓN

Los factores que determinan la vida útil de la carne de cordero son el grado de deterioro del color, la proliferación microbiológica y la oxidación lipídica, siendo el color de la carne el factor que más influye en la decisión de su compra por parte de los consumidores. La oxidación lipídica que se produce durante el almacenamiento de la carne y los derivados cárnicos conlleva la formación de productos con un efecto negativo sobre el sabor y el color, pudiendo ser perjudiciales para la salud (Zhao et al., 1994).

El Selenio es uno de los componentes importantes del sistema de defensa antioxidante de los tejidos vivos en el tejido muscular. Las funciones antioxidantes del Se persisten después de la faena y retrasan el inicio de las reacciones de oxidación en los productos de la carne y de los alimentos (DeVore et al., 1983; Faustman et al., 1989). Por su parte una deficiencia de selenio en la dieta trae aparejado una mayor incidencia de cáncer, enfermedades cardiovasculares así como diabetes tipo 2 (Kumar y Priyadarsini, 2014). Los valores de