







# **ANALES**

**VOL. 22, DICIEMBRE 2009**

**REAL ACADEMIA DE CIENCIAS VETERINARIAS  
DE ANDALUCIA ORIENTAL**

© Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental

DIRECCIÓN DE LA REVISTA

RACVAO (Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental)

C/ Rector Marín Ocete, 10 • 18014 Granada

[www.insacan.org/racvao.ahtml](http://www.insacan.org/racvao.ahtml)

MAQUETACIÓN:

Gráficas la Paz de Torredonjimeno, S.L.

[www.graficaslapaz.net](http://www.graficaslapaz.net)

DEPÓSITO LEGAL: J-878-2010

I.S.S.N.: 1130-2534

Imprime: Gráficas la Paz de Torredonjimeno, S.L.

VOLUMEN 22, DICIEMBRE DE 2009

# ANALES

DE LA

REAL ACADEMIA DE CIENCIAS VETERINARIAS DE ANDALUCIA ORIENTAL

---

## CONSEJO DE DIRECCIÓN DE LA REVISTA

---

**PRESIDENTE DE HONOR:**

Excmo. Sr. D. Julio Boza López

**PRESIDENTE:**

Excmo. Sr. D. Antonio Marín Garrido

**VICEPRESIDENTE:**

Ilmo. Sr. D. Alberto González Ramón  
Sección de Almería

**VICEPRESIDENTE**

Ilmo. Sr. D. Eduardo Ruíz Villamor  
Sección de Granada

**VICEPRESIDENTE**

Ilmo. Sr. D. José Luis Fernández Navarro  
Sección de Málaga

**SECRETARIO GENERAL:**

Ilmo. Sr. D. Miguel Molina Galindo  
Sección Granada

**DIRECTORA DE PUBLICACIONES:**

Ilmta. Sra. D<sup>a</sup> Catalina Gómez López  
Sección Jaén

## COMITÉ CIENTÍFICO

---

Dr. D. Aguilera Tejero, Escolastico

Dra. D<sup>a</sup>. Arrazola Saniger, Marcelina

Dr. D. Carrasco Otero, Librado

Dr.D. Galvez Del Postigo, Antonio

Dr. D. Hernandez Rodriguez, Santiago

Dr. D. Moreno Fernández-Caparrós,  
Luis A.

Dr. D.Palmquist Barrena, Paul

Dr. D. Sánchez de Lollano Prieto,  
Joaquín

---

La Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, no se responsabiliza de las opiniones expresadas por los diferentes autores.



# ÍNDICE

<b>EDITORIAL</b> _____	11
<b>TRABAJOS Y ARTÍCULOS CIENTÍFICOS</b>	
<b>REIVINDICACIÓN DEL GLOSARIO EPIDEMIOLÓGICO EN MEMORIA DE EVGENY PAVLOVSKY</b> _____ Luis León Vizcaíno	13
<b>CONTESTACIÓN AL DISCURSO DE INGRESO DEL PROF. DR. LUIS LEÓN VIZCAÍNO EN LA RACVAO</b> _____ Fulgencio Garrido Abellán	23
<b>ALIMENTOS ECOLÓGICOS</b> _____ J. Boza López	27
<b>RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN ENTEROCOCOS AISLADOS DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL, PESCADO Y MARISCOS</b> _____ Antonio Sánchez Valenzuela, Nabil Benomar, Rubén Pérez Pulido, Hikmate Abriouel, Antonio Gálvez	51
<b>EN BUSCA DE LOS PRIMEROS EUROPEOS: EL EXCEPCIONAL REGISTRO FÓSIL DE ORCE (CUENCA DE GUADIX-BAZA, GRANADA) COMO VENTANA AL ESTUDIO DE LOS ECOSISTEMAS DE INICIOS DEL PLEISTOCENO EN LA EUROPA MERIDIONAL</b> _____ Paul Palmquist Barrena	63
<b>USO DEL ANÁLISIS ISOTÓPICO DEL CARBONO Y DEL NITRÓGENO EN LA TRAZABILIDAD DE PRODUCTOS DERIVADOS DEL CERDO IBÉRICO</b> _____ R. Nieto y J. F. Aguilera	105

<b>LAS PROTEINAS DE FASE AGUDA COMO BIOMARCADORES DE BIENESTAR Y NIVEL SANITARIO DE LAS EXPLOTACIONES DE PORCINO</b> _____	125
Rodríguez-Gómez IM, Barranco I, Pallarés FJ, Rodríguez-Estévez V, Gómez-Laguna J, Carrasco L	
<b>LA GRIPE PORCINA: UNA ENFERMEDAD CLÁSICA CON CARÁCTER ZONÓTICO Y EMERGENTE</b> _____	135
M <sup>a</sup> Ángeles Martín del Burgo, Blanca Chinchilla Rodríguez y Gustavo del Real Soldevilla	
<b>OLOR SEXUAL EN LA CARNE DE PORCINO CASTRADO INMUNOLÓGICAMENTE. NECESIDAD DE SU EVALUACIÓN SENSORIAL LIGADA A LOS FACTORES GENÉTICOS QUE DETERMINAN SU PERCEPCIÓN</b> _____	185
Gaspar Ros Berruezo	
<b>EL TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A MUCOSAS COMO BLANCO DEL VIRUS DE LA DIARREA VÍRICA BOVINA: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN</b> _____	193
M. Pedrera, P.J. Sánchez Cordón, M.A. Risalde, V. Molina, E. Ruiz-Villamor, F. Romero-Palomo, J.C. Gómez-Villamandos	
<b>LENGUA AZUL: VACUNAS, INMUNOMODULADORES E INMUNIDAD PROTECTORA</b> ____	211
P.J. Sánchez Cordón, M. Pedrera, B. Rodríguez-Sánchez, E. Ruiz-Villamor, M.A. Risalde, V. Molina, L.M. Gayosso, J. M. Sánchez-Vizcaíno, J.C. Gómez-Villamandos	
<b>RIESGO DE LOS SUBPRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL</b> _____	227
José Juan Rodríguez Jerez	
<b>ACTUALIZACION EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LAS MENINGOENCEFALITIS ASÉPTICAS DEL PERRO</b> _____	243
E. Gutiérrez, B. Blanco, M. Novales, R. Lucena, E. Hernández, P.J. Ginel	
<b><u>CIENCIA Y SOCIEDAD</u></b>	
<b>ALMERÍA. ACTOS CONMEMORATIVOS DEL II CENTENARIO DE DARWIN 1809-2009</b> _	257
Alberto González Ramón	



<b>ALMERIA. MEMORIA DE LAS JORNADAS SOBRE INNOVACIÓN Y TECNOLOGÍA EN LOS ALIMENTOS ECOLÓGICOS</b> _____	259
Alberto González Ramón	
<b>JAÉN. MEMORIA DE LAS JORNADAS SOBRE GANADERIA EXTENSIVA Y EL DESARROLLO RURAL EN ANDALUCÍA: “LOS PEQUEÑOS RUMIANTES: NUEVOS RETOS DE EXPLOTACIÓN”</b> _____	263
Antonio Marín Garrido	
<b>JAÉN. MEMORIA DE LOS ACTOS CONMEMORATIVOS DEL BICENTENARIO DEL NACIMIENTO DE CHARLES DARWIN</b> _____	267
Antonio Marín Garrido	
<b>JAÉN. LA GRIPE NUEVA Y LA DE SIEMPRE</b> _____	271
<b>OBITUARIO</b> _____	273
<b>INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES</b> _____	275



# EDITORIAL

**E**n cumplimiento del mandato estatutario se inicia ahora un nuevo periodo de Gobierno que, por decisión mayoritaria del Pleno de la Corporación, será continuidad del cuatrienio que finaliza.

Durante ese período además de consolidar logros anteriores se han iniciado otras actuaciones que confiamos, pese a las dificultades del momento que vivimos, fructifiquen en beneficio de los fines fundacionales de la Academia.

Sin apartarnos de la línea programática trazada, es propósito de esta Rectora incrementar la participación de sus miembros -Numerarios y Correspondientes- en las actividades de la Academia; compartir algunas de nuestras actuaciones con otras Instituciones enmarcadas también en las tareas de investigación y divulgación del conocimiento, beneficiándonos mutuamente de la sinergia que estas colaboraciones suelen producir y mantener, como siempre, el firme propósito de incrementar nuestra proyección y presencia en la Sociedad.

Se incorporan a ANALES un prestigioso grupo de especialistas que, en su condición de Comité Científico contribuirán a la mejora continuada de nuestra publicación. Para todos ellos nuestro agradecimiento por esta desinteresada colaboración, gratitud que hacemos extensiva a la Dirección General de Universidades de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa por la ayuda económica que nos presta y que, entre otras, hace posible esta publicación.



# REIVINDICACIÓN DEL GLOSARIO EPIDEMIOLOGICO EN MEMORIA DE EVGENY PAVLOVSKY

PROF. DR. LUIS LEÓN VIZCAÍNO\*

## Discurso de Ingreso como Académico Correspondiente

Excelentísimo Señor Rector Magnífico de la Universidad de Almería, Excmo. Sr. Presidente del Instituto de Academias de Andalucía, Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, Ilustrísimo Señor Presidente del Colegio Oficial de Veterinarios de la provincia de Almería, Excma. Señora Presidenta de la Academia de Medicina y Cirugía del Distrito de Granada. Señores académicos, Señoras y señores.

En paráfrasis de una introducción que tiene por autor al admirado Don Francisco de Quevedo y Villegas, ...."mereciera yo ser digno de represión pública si....", en mi caso, no mostrase un devoto agradecimiento a la Ilustre Academia que me acoge en su seno, a los académicos que me han propuesto como miembro, y a los que sostuvieron con su aquiescencia la propuesta. En un día tan señero para mí no deja de entristecerme la ausencia de mis padres, tan llorados, tan remotos en el espacio y el tiempo pero tan próximos en el recuerdo. Sería notoriamente injusto si olvidara a mi esposa Ana y a mis hijos, que han comprendido mis prolongadas ausencias del hogar, enajenado por mi afán de conocimiento. Admito que no es habitual, mas mi reconocimiento deseo que trascienda de la dedicatoria a personas, y lo hago extensivo a la Providencia que tanto me ha conducido y que me ha predispuesto al sereno gozo por la belleza en abstracto y por la Naturaleza. Un especial recuerdo me mueve hacia la ciencia Veterinaria que me ha permitido un vivificante diálogo con personas y con

---

\* Catedrático de Enfermedades Infecciosas. Departamento de Sanidad. Universidad de Murcia

el medio natural, frente a los que me siento en deuda; somos los que defendemos, lo que protegemos, y a través de mi profesión en las actividades práctica y docente siempre he procurado restituir, aunque sea en proporción minúscula, lo mucho que he recibido

Con Hermógenes y Crátilo como interlocutores sostiene Platón sendas conversaciones en uno de sus “Diálogos”, que denominó “Crátilo” (383 a C), cuyo hilo conductor versa sobre la exactitud de los nombres. En un principio el discípulo que da nombre al “diálogo” lo centra en el nombre propio de las personas, pero luego se extiende al de los seres en general, las cosas y los conceptos y sentimientos. Frente al criterio convencionalista, que consensúa una denominación con independencia de su justeza lingüística, se erige un criterio natural que aproxima, y si es posible identifica, el nombre a la esencia de aquello que se pretende nominar. No es baladí ni convencional ni acordada la imposición de un nombre, sino estóica; el desajuste de la asociación entre el nombre y lo nominado se deriva el hecho de hablar o nombrar con falsedad. En épocas actuales, en un sentido similar se posesionan los escritos de Don Fernando Lázaro Carreter, director que fue de la Real Academia de la Lengua, recopilados en su obra “El dardo en la palabra”.

En el empleo de un término lingüístico incurren con desigual responsabilidad por una parte el propio lingüista o nominador, cuya función equivalente a la de un legislador, pues marca una norma de comportamiento social, en este caso en el habla; y por otra el dialéctico o usuario. El primero, en su misión creadora, tiende segundo se lemita a usarlo. Claro que en ocasiones a ajustar el nombre al objeto de la nominación; el la eficacia nominativa es tan inexacta que llegan a proponerse nombres con adscripciones previas, que conducirán a un lenguaje impreciso, “falso” desde el punto de vista del significado; o no es inexacto en esencia denominar ratón (nombre de roedor) al pulsador (*mouse*, ratón en inglés) del ordenador.

En otras ocasiones, sin pretenderlo, el usuario se convierte en creador. En un acto de lesa cognoscencia aplica un nombre inexacto; y si la acción logra adeptos entre los dialécticos surgen nominaciones impropias, puede que erróneas, e incluso adversas. Semejante atrevimiento es mayor cuando, en desconocimiento de otro idioma, hacemos uso erróneo de un barbarismo. No me resisto a la exposición del siguiente paradigma. No debe por qué pero “ciencias” y “letras” no siempre van bien conjugadas. Bajo la petulancia de un pretendido conocimiento del latín, no tengo que dudar un preclaro y anónimo estadístico sugirió o simplemente usó en su día el adverbio latino *versus* (*vs* en abreviatura), que en puridad significa ir hacia (de él se deriva el adverbio francés *vers*), para contraponer, enfrentar, dos cifras. La propuesta es incoherente;

debería haber usado el término *adversus* (*avs* en abreviatura). Seguro que nunca pudo imaginar ni el éxito futuro de su falsa propuesta. Estos ejemplos de denominaciones confusas o simplemente erróneas tienden a ser más comunes en aquellas lenguas que como el inglés carecen de un rigor academicista, en oposición a lo que sí es propio del español o del francés, que cuentan con sus respectivas Academias de la Lengua. No recomendable es incurrir en errores lingüísticos, pero a veces la situación se torna subrealista cuando el error sustituye, anula e impide el uso de término correcto. Doy testimonio del rechazo editorial a la aceptación de artículos científicos en los que pretendía que *avs* sustituyera a *vs* en la presentación contrapuesta de cifras. En un sentido inverso cabe la cita de una interpelación periodística al Don Camilo José Cela en relación a su opúsculo “Cristo *versus* California”, achacándosele al título una presunta inadversión entre personaje y territorio, y que resolvió el insigne literato no haciéndose responsable de la ignorancia ajena del conocimiento del latín.

La exactitud consiste en mostrar la esencia última de los nombres comunes de entes y entelequias. La vinculación del nombre (término) con la verdad, o en su defecto falsedad, posibilita o en la situación opuesta nos aleja de la esencia de lo nominado, de llamarlo por cómo es. El lenguaje tiene como objeto particular la esencia, la imitación de la realidad, y por lo tanto debe de ser exacto y veraz; lo opuesto es falsedad, caricatura, y conducirá a una dialéctica imprecisa que dificulta el entendimiento y la comunicación entre las personas. Cuando el nominador es inexacto engaña la realidad. Pero la sana intención del lenguaje justo se ve dificultado por la dificultad inherente a su propia exactitud. Sostiene Platón que el lenguaje es un camino inseguro y engañoso para acceder al conocimiento de la realidad.

El conocimiento científico de la enfermedad, ya sea en su más estricta esencia epistemológica o en sus facetas prácticas de diagnóstico y curación, es susceptible de abordarse en contestación a las escatológicas cuestiones del qué y el cómo, y del cuanto, dónde y cuando.

La respuesta a qué es la enfermedad constituye un acto propio de la Medicina. Tan pretéritas como la cultura son las descripciones médicas. Las cuales hacen referencia histórica no tanto a las enfermedades tal como en la actualidad las concebimos; es decir, como entidades nosológicas bien diferenciadas desde los puntos de vista anatomoclínico y etiológico; sino en referencia a los síndromes clínicos, ambiguos por definición, pero susceptibles de ser diferenciados mediante los precarios criterios médicos de aquellas épocas precientíficas. La personalización del inicio de tales conocimientos nos retrotrae al mito del centauro Quirón, a su discípula la ninfa Hygiae (Higiene), a Hipócrates y a los clásicos precursores veterinarios, los hipiatras y buiatras.

En otro orden, conocer el cómo se produce la enfermedad es misión de la Patología. Ésta exige la disposición de una mente científica, libre de los prejuicios ligados a mitos y a dogmas, y la posesión de procedimientos técnicos que permitan la detección de las alteraciones morfológicas y funcionales. Sin mayores reparos históricos, no consideramos muy desacertado adjudicar a Robert Koch, en las postrimerías del siglo XIX, la paternidad de dicha rama científica.

Frente a la Medicina y la Patología, que centran su atención en el individuo, paciente o yaciente, la Epidemiología trasciende de éste y se fija en el colectivo como objeto de estudio de la enfermedad ¿Hasta dónde penetran las raíces históricas de la Epidemiología, o de la Epizootiología *sensus strictus* en el caso de que únicamente se afecten los animales? Desde la antigüedad no escasean descripciones y relatos sobre pestes en los animales y en el hombre. Pero hubo que esperar hasta bien entrado el siglo XX para que se desarrollara en el árbol de la ciencia la rama que estudia la enfermedad colectiva; estructurada ésta a través de principios propios, desarrollada mediante métodos analíticos *ad hoc*, y definida en conceptos bien diferenciados que se expresan mediante un glosario específico. No resulta baladí enfatizar que, en oposición a la Medicina Humana, tradicionalmente preocupada por el individuo enfermo, la percepción de la enfermedad colectiva es idiosincrática con la Medicina Veterinaria; pues la preocupación del veterinario siempre se eleva desde el animal enfermo hacia el rebaño, y la adopción de medidas colectivas son intrínsecas a la práctica veterinaria.

Propio nombre de la ciencia sanitaria que abarca y ensambla todos los aspectos que incluyen el conocimiento de los aspectos colectivos de la enfermedad en los animales se ha visto sacudido por el afán revisionista de los dogmáticos, hasta el extremo de la posición actual que marca unos términos alejados de la exactitud que debería regir todos nuestros actos, incluidos la nominación inequívoca de los conceptos. Epidemiología fue el nombre, de autor desconocido, acuñado a tal efecto: epi (επι, sobre), demos (δemos población), logia (λογία, conocimiento); saber de aquello que afecta a una población. Ahora bien, el vocablo “demos” se asocia por antonomasia con el de “homo” (hombre), y por ende epidemiología se asocia a la enfermedad de la población humana. Una consecuencia lógica de tal vinculación de género fue la instauración de los nombres específicos de “epizootiología” y “epifitología” en clara referencia a las enfermedades de animales (zoo) y de vegetales (fito) respectivamente.

La Epidemiología se construye en sus principios escolásticos en los años sesenta. Entonces surgieron las corrientes iniciáticas que de las que derivan las posiciones actuales. Enfrentados formalmente en sus obras dos notable veterinarios, ambos



estadounidenses, imparten criterios. Dean Ferris, en su magistral escrito titulado “Epizootiology”, publicado por Academic Press (New York) en *Advances of Veterinary Science and Comparative Medicine* (1969) defiende la exactitud del término “epizootiología” para definir con precisión lingüística, en una palabra, la esencia del conocimiento de la enfermedad colectiva animal. Frente a Ferris, Calvin Schwabe, muy interesado por los aspectos zoonóticos de las enfermedades animales, como muestra en su monumental *Veterinary Medicine and Human Health* (Williams & Wilkins, 1969) mantiene el nombre “epidemiología” para las enfermedades colectivas animales. Pero él mismo se ve sometido a las secuelas de la inexactitud semántica en el título de su libro (CW Schwabe, HP Riemann, CE Franti.1989.*Veterinary Epidemiology*, Lea & Febiger) y ha de emplear el calificativo “veterinario” para expresar la esencial animal del sustantivo “epidemiología”. E igual han de hacer todos los que desde entonces siguen su trayectoria. Pero el convencionalismo ha vuelto a triunfar y la Asociación de Centros de Enseñanza Europea a influido en la legislación de sus países miembros para que oficialmente deba de aparecer nominalmente la asignatura Epidemiología en los planes de estudio de Veterinaria. Estoy en contra, por motivos profesionales y lingüísticos, y reivindico la veracidad dialéctica de la Epizootiología, ahora sólo mantenida por la Oficina Internacional de Epizootias.

En comunión con el desarrollo de las ciencias sociales, algunas de las facetas que estructuran el cuerpo doctrinal epidemiológico son relativamente recientes. Tales son los postulados de Evans sobre la causalidad multifactorial, la modelización prospectiva, o la aplicación de la informática en la estadística epidemiológica. Pero les precede la faceta ecológica, como piedra angular sobre la que pivota el edificio de la historia natural de las enfermedades contagiosas.

Al igual que el hombre, las poblaciones no pueden comprenderse en ausencia de sus circunstancias. Y entre las condiciones dominantes que gravitan sobre nuestra conciencia colectiva, la ecología viene impregnando, con persistente palpito, los ámbitos político, social y científico. En el capítulo de las ciencias de la salud, se desarrolló en los años setenta la Ecopatología, en un intento exitoso de explicar la naturaleza de las enfermedades multifactoriales inherentes a las explotaciones animales intensivas. Al primigenio medio natural, en el que el ambiente silvestre permanece inalterado o muy poco modificado por la intervención humana, se contraponen la moderna zootecnia, configurada por el uso de razas altamente seleccionadas, pero muy sensibles a cualquier causa nociva debido a la pérdida del vigor híbrido, explotadas en estado de hacinamiento hasta situaciones fisiológicas límites, y en ambientes artificiales que disminuyen las ya menguadas defensas orgánicas y que propician la difusión de los agentes patógenos, La Ecopatología natural, del mismo modo que la zootécnica, con-

sidera que la enfermedad es consecuencia de un desequilibrio ecológico, en el que se ven involucrados todos los componentes del ecosistema: agente patógeno específico, hospedadores y medio ambiente.

En el ya algo distante año 1939, el ruso Evgeny Pavlovsky emitió la teoría del “anidamiento natural de las enfermedades contagiosas”; germen de la actual Ecopatología. Y aunque inicialmente la enunció y dio cuerpo doctrinal y científico en orden a las zoonosis, o enfermedades transmitidas desde los animales al hombre, por extensión cabe aplicarse a las enfermedades de la fauna silvestre. Pontifica esta teoría cómo los “patoergotes”, es decir los agentes vivos causales específicos de enfermedades infecciosas y parasitarias, se mantienen en el medio “parantrópico” (alejado a la intervención humana), formando parte natural de la comunidad biótica, a cuyo conjunto vino a denominar “biopatocenosis”, la cual ocupa un “nido” o nicho espacial. La presencia del patoergote bien puede pasar desapercibida si ninguno de los hospedadores silvestres se muestra sensible a él; así sucede en África con los suidos y los équidos salvajes que albergan respectivamente los virus de la peste porcina africana y de la peste equina, o en América con el virus de la mixomatosis y el conejo brasileño (*Sylvilagus brasiliensis*). En otros casos, el patoergote ejerce una actuación microdepredadora, que causa debilidad o muerte mediante la enfermedad en los individuos menos resistentes. Este estado de equilibrio ecológico puede romperse cuando animales domésticos y hombre irrumpen dentro del nido y, sobre todo, si lo hacen desestabilizando el *status quo* natural; derivada de ello resulta la acumulación de enfermos, en ocasiones en cantidad epidémica.

La teoría del anidamiento natural, así formulada, se muestra muy elemental; como elemental resulta, por ejemplo, el planteamiento de la teoría de la relatividad de Einstein. Su desarrollo significó un notable avance para la comprensión de la ecología de las enfermedades en los animales de vida libre; y sigue plenamente vigente. Eugeny Pavlovsky falleció en Leningrado el 27 de mayo de 1965 a la edad de 81 años. Se graduó en la Academia Médica Militar de San Petersburgo. Sus investigaciones sobre leishmaniosis, encefalitis transmitida por garrapatas, tularemia y leptospirosis, entre otras enfermedades, llevadas a cabo desde los impenetrables bosques de taiga hasta los desiertos y los humedales en las actuales Kazajstán, Siberia, Tadjikistán y Turkmenistán le permitieron elaborar su doctrina. Y una tupida red de institutos científicos repartidos por la antigua Unión Soviética y por países de Europa Oriental contribuyó a su desarrollo. Como máximo exponente, y referencia obligada para los investigadores en la ecología de las enfermedades contagiosas, en 1964, la Akademiya Nauk (con sedes en Moscú y Leningrado) publicó el opúsculo titulado *Prirodnaya*

*ochagovost transmissivnykh bolezney v svyazi s landshaftnoy epidemiologiyey zooantroponozov* (evito su nombre en ruso) anidamiento natural de las enfermedades transmisibles, con especial referencia a la panorámica epidemiológica de las zooantroponosis; del que se hizo eco el Centro de Enfermedades Comunicables del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, y que fue dado a conocer en su versión inglesa por el Centro de Investigación de Zoonosis de la Universidad de Illinois.

Tres aspectos atraen nuestra atención en relación con la teoría de Pavlovsky: su vigencia, su especialidad y su léxico.

Cabría suponer que, como otros tantos aspectos relacionados con la historia natural, la ecología de las enfermedades contagiosas es un capítulo suficientemente conocido y muy controlado en nuestra tecnificada sociedad. Pero, la realidad sigue demostrando su vigencia; debido en gran medida a nuestro retorno hacia el medio natural, motivado por razones culturales y lúdicas (ecoturismo), conservacionistas, e incluso silvícolas y zootécnicas (agricultura y ganadería ecológicas).

En segundo término, y en éste caso de carácter ajeno a la propia Epidemiología, conviene referir la intromisión de los que Mario Bunge y otros teóricos de la filosofía de la ciencia catalogan como paracientíficos. Varias circunstancias explican tal intromisión; sobre todo, la escasez de especialistas epidemiólogos. Al respecto es necesario remarcar que, en la formación universitaria, la Epizootiología, como asignatura, fue instaurada en el plan de estudios de la Licenciatura de Veterinaria del año 1972, y que la Sociedad Española de Epidemiología inició su recorrido en 1978. También contribuye la aparente simplicidad metodológica de esta ciencia; que parece estimular el atrevimiento de profesionales relacionados con ella, que aprovechan el carácter multidisciplinar de los equipos dedicados al estudio de las zoonosis, en los que deben integrarse al menos médicos, veterinarios, microbiólogos, parasitólogos, zoólogos, ecólogos, sociólogos. Matemáticos y otros. La aludida multidisciplinaridad ya fue contemplada de manera empírica por Pavlovsky, quien a partir de su formación médica, fue director del Departamento de Parasitología en el Museo Zoológico de la Academia de Ciencias de la URSS, fue miembro de la Academia de Ciencias Médicas, desde donde impulsó el Instituto Soviético de Epidemiología y Microbiología, y que también formó parte de las Sociedades de Geografía, Entomología, Parasitología, e Ictiología.

A la escuela de Pavlovsky se debe la incorporación para el lenguaje científico de un glosario específico cargado de neologismos; que en algunos casos son palabras nuevas y en otros lo novedoso son sus acepciones.

La Medicina y la Patología son poseedoras de una prolija terminología, que es utilizada con meticulosa puntualidad por sus especialistas. En no pocas ocasiones sus informes han sido tildados de “gnósticos” por los sufridores pacientes deseosos en descubrir la naturaleza de su enfermiza situación a través del críptico léxico usado por clínicos y analistas.

A pesar de que la innovación lexical introducida por Pavlovsky contribuyó a designar con gramatical precisión los componentes y los conceptos esenciales del anidamiento natural. Sorprende constatar que tanto científicos como prácticos, poco respetuosos con la Epidemiología, incurren en el desuso de términos específicos, que sustituyen por vulgarismos que con frecuencia resulta imprecisos, o peor aún, que por hacer un uso erróneo de ellos inducen a desconciertos conceptuales.

Lejos de nuestra intención el ejercicio de personalizar tan réprobo empleo del lenguaje científico. Mas, para sustentar la preocupación perceptible en nuestras aseveraciones, deseo exponer, sin ánimo de exhaustividad, y a modo de muestrario, algunos de estos errores relativamente comunes en la literatura involucrada con los asuntos epidemiológicos.

Se constata con asiduidad, por ejemplo, incluso en publicaciones de alto impacto científico, el inapropiado uso de los términos “prevalencia” o “incidencia”. Ambos deben de ser aplicados a la proporción de casos ocurridos en una muestra poblacional numéricamente representativa del conjunto de la población en estudio; y que por lo tanto advierten de una tendencia, de una probabilidad significativa de la enfermedad investigada. En oposición a este riguroso procedimiento de muestreo, no pocos autores incurren en un *lapsus linguae*, si los juzgamos con benevolencia, o lo que es más grave, en un error de *lesa* ciencia, cuando sus conclusiones las extraen del estudio de un número de individuos que en absoluto representan estadísticamente a la población, y que por lo tanto adolecen de valor predictivo. En puridad, los autores, no aludidos, tendrían que haber empleado el término más genérico de “frecuencia relativa”.

En un artículo, en mi opinión de alto interés para el conocimiento de la ecopatología de la brucelosis, el autor se interroga en el título si el rebeco alpino es una víctima o un vector de la brucelosis. *Chamois, victime ou vecteur de la brucellose*. Obviemos el hecho de que la frase está construida con la impronta sensacionalista más propia de un titular de periódico. ¿Víctima? ¡Sí! De la infección antropúrgica, por medio del ganado doméstico de alta montaña; ya que los rebecos demuestra que no son hospedadores naturales de brucelas. ¿Vector? Pavlovsky objetaría radicalmente en contra; ya que el término vector debe reservarse para denominar a los insectos que transmiten patoergotes al hombre y a los animales. Con rigor, el autor debería

haberse cuestionado si el rebeco es víctima del contagio por su cohabitación con el ganado o si es reservorio natural de la brucelosis. En idéntico error recaen quienes afirman que el zorro es el vector de la rabia salvaje; en lugar de catalogarlo como el hospedador natural y reservorio del rhabdovirus de la rabia; que lo transmite a otros animales, pero que no lo vehicula; ya que en la terminología epidemiológica el vehículo es un objeto, por tanto inanimado, y no un ser vivo, que porta y contagia el agente infeccioso.

El listado de transgresiones al glosario de anidamiento natural pesa abrumadoramente. Y viene a denunciar, tanto el atrevimiento de advenedizos a epidemiólogos, como el divorcio que en ocasiones se aprecia entre ciencia y cultura en la literatura especializada. La terminología apropiada a la ecopatología de las enfermedades de la fauna silvestre es algo más que pura retórica; refleja el conocimiento estructurado que tenemos del fenómeno natural, y sirve para categorizar su trascendencia e implementar programas lógicos de lucha contra las enfermedades. De ahí su vigencia.

Es sorprendente lo que nos depara el estudio. Nuestro propio conocimiento desconoce los límites que aún nos quedan por descubrir en el campo de la epidemiología y del anidamiento natural. Y no me refiero a enfermedades de nueva aparición, que es lógico sea ignotas, sino en enfermedades tan clásicas como la tuberculosis. Nuevos métodos de estudio y nuevas realidades trastocan lo conocido. La tuberculosis de los ungulados domésticos está poniendo de manifiesto la vigencia del conocimiento sobre el anidamiento natural de esta infección. En la concepción tradicional, aún dominante en no pocos manuales académicos y, lo que es peor, para desesperación de veterinarios de campo y ganaderos, aún en vías de adaptación en los despachos legislativos y administrativos, los grandes mamíferos sólo padecen tuberculosis por *Mycobacterium bovis*; ignorantes de que la cabra sufre una tuberculosis específica por *Mycobacterium caprae*, la cual debe ser tratada con criterios sanitarios idénticos a los aplicados contra la tuberculosis bovina, pero que la Unión Europea minusvalora. Así mismo mantienen que la tuberculosis es propia del medio sinantrópico (ganadero); que el ganado vacuno es el reservorio principal de las micobacterias, con cuyo contacto se infectan esporádicamente otras especies animales y el hombre. Y, por ende, que la eliminación del vacuno infectado conducirá al control, primero, y erradicación, después, de la tuberculosis.

Pero a tenor de los conocimientos actuales, esta concepción es errónea por parcial. Los planes de erradicación de la tuberculosis del ganado vacuno están destinados al fracaso en los territorios donde vacas y determinada fauna silvestre comparten hábitat: la zarigüeya (*Trichosurus vulpecula*) en Nueva Zelanda, el tejón (*Meles meles*) en

Gran Bretaña, Irlanda...y en España. En España la situación epidemiológica resulta especialmente compleja, y repercute sobre todo en el ganado vacuno de carne que pasta extensivamente en nuestros espacios naturales. En esencia: el medio paratrópico (no humanizado) alberga nidos naturales multihostales de *Mycobacterium bovis*, en los que varias especies silvestres actúan como reservorio: los cérvidos (ciervo, gamo, corzo) son hospedadores principales, el tejón es hospedador suplementario, los jabalíes probablemente hospedadores secundarios, y los carnívoros (zorro, lince) hospedadores accidentales. Cada categoría de hospedador representa un riesgo de contagio y un nivel de interdependencia distintos. El ganado vacuno que se interne en tales nidos se infectará sin remisión.

Los planes de erradicación son tajantes: diagnóstico y sacrificio de los reservorios principales. Y se han mostrado eficaces en el ambiente intensivo de la explotación lechera donde la vaca es el único reservorio principal; su aplicación es costosa pero al postre efectiva. Por el contrario, en los territorios con nidos naturales de *Mycobacterium bovis*, como ocurre en amplias zonas de Andalucía, sierras y marismas, están indefectiblemente condenados al fracaso; ya que ignoran el hecho natural de la existencia de un reservorio silvestre no vacuno. Y una de las limitaciones que más afectan a la lucha que mantenemos frente a la tuberculosis estriba en la condición de especie protegida que, por ejemplo tiene el tejón. Otra el imposible manejo de la fauna silvestre con fines de marcado y sacrificio. Nuevos métodos de inmunización abren perspectivas de prevención en la fauna de vida libre. Modificaciones legales deberán de ser creadas para, a la luz de los conocimientos epidemiológicos e inmunoprolácticos, proteger los intereses ganaderos para impedir que los programas costosos pero ineficaces logren su utilidad. Estas y otras preguntas están llamando a la puerta con vigente insistencia; y son prueba irrefutable de que formamos parte del medio natural, aunque nos parapetemos tras las murallas con limitan el confortable mundo manipulado por el hombre.

Gracias.

# CONTESTACIÓN AL DISCURSO DE INGRESO DEL PROF. DR. LUIS LEÓN VIZCAÍNO EN LA RACVAO

DR. D. FULGENCIO GARRIDO ABELLÁN\*

Por decisión de la Junta de Gobierno de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, me corresponde el deber de contestar en nombre de la misma al Discurso de Ingreso en esta Institución como Académico Correspondiente, tal como dispone el Reglamento, al Prof. Dr. D. Luis León Vizcaíno. Es un deber que me honra y que realizo con agrado y emoción, pues me une con él una estrecha amistad de más de 30 años.

El recipiendario es una gran persona, un buen profesor, y un científico de reconocida valía internacional, tanto en el ámbito de la profesión Veterinaria, como en el mediático y administrativo.

## BIOGRAFÍA

Destaca en su estilo personal:

- El planteamiento abierto, liberado de dogmas y prejuicios.
- El tesón en la ejecución de los trabajos de investigación.
- El rigor intelectual en la obtención de los resultados.
- La creatividad en su análisis
- La autenticidad en sus conclusiones, libres de la mezquindad del servilismo.

---

\* Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental.

## CONTESTACIÓN

“Siempre que el Veterinario se ha enfrentado con las enfermedades animales, ha prevalecido en su juicio el valor del Colectivo sano frente al interés que ofrecen los individuos enfermos.

Por eso ha prevalecido en su juicio el valor del colectivo sano frente al interés que ofrecen los individuos enfermos. Por ello ,ha consagrado gran parte de sus esfuerzos profesionales encontrar medios que resulten eficaces para proteger a una mayoría sana de una minoría enferma, o de los efectos nocivos de un medio ambiente desfavorable”

En su discurso, León Vizcaíno nos recuerda la “Teoría del anidamiento natural de las enfermedades contagiosas” (germen de la actual ecopatología), y exalta a su autor, Pavlovsky, un auténtico pionero que abrió nuevas rutas para el avance científico.

Nos describe con la amenidad que le caracteriza, que a pesar de su vigencia, su aportación lexicológica y su carácter de especialidad científico-técnica, son muchos los problemas que se plantean en su aplicación, debido a la escasez de expertos en la materia, al atrevimiento incompetente de profesionales que no se integran en grupos multidisciplinarios, a los errores lexicales que conducen a ambigüedades conceptuales, etc.

Por último, denuncia el atrevimiento de advenedizos en materia de epidemiología , y el divorcio que originan entre ciencia y cultura, a lo cual yo me adhiero a título personal..

Particularizando en la vigencia del anidamiento natural de la Tuberculosis, nos alerta sobre los efectos devastadores de la praxis de la epidemiología tradicional en la ejecución de las campañas de erradicación.

En esencia, el medio panantrópico (no humanizado) alberga nidos multihostales (que son) reservorios de los diversos agentes etiológicos de la tuberculosis animales, que multiplican el riesgo de contagio, y acaba planteando dos preguntas clave:

- ¿Cuándo se armonizará la norma con la ciencia?
- ¿Con qué justicia se aplican programas costosos pero ineficaces por defectos en su planteamiento o ejecución?

Pues bien, siguiendo a Plutarco, parece a él destinada la frase, “la lectura hace al hombre completo, la conversación lo hace ágil, y la escritura, lo hace exacto”.



Estas preguntas no quedarán solo aquí.

Hoy es un día de gozo para el profesor León Vizcaíno, para su inseparable Ana, para sus hijos y los muchos y entrañables amigos que lo acompañan, y para nuestra Real Academia, que incorpora a su elenco académico un valor seguro, que servirá a esta Corporación con el interés y empuje al que nos tiene acostumbrados.

He dicho



# ALIMENTOS ECOLÓGICOS

J. BOZA LÓPEZ<sup>1</sup>

## INTRODUCCIÓN

Los principios del ecologismo son la conservación y mejora de los recursos naturales, la preservación biodiversidad y disminución de la contaminación, con el fin de elevar del bienestar y satisfacer las necesidades humanas.

Esta problemática ambiental empieza a detectarse en el siglo XIX por las consecuencias nocivas de la industrialización, que trajo el hacinamiento poblacional en las zonas industrializadas, desarraigo cultural, contaminación del medio y en general una degradación de las condiciones de vida para una parte significativa de la humanidad, tal como nos lo señaló en 1903 Palacio Valdés en *“La aldea perdida”*.

Dicha problemática se incrementa en el siglo XX con la aparición de nuevas tecnologías en el mundo industrializado, que traen el aumento progresivo del nivel de vida de la población, y paralelamente un incremento de sus consecuencias nocivas, lo que llevo a decir a Francesco D’Agostino: *“Es imposible separar el problema ecológico de lo que constituye el problema antropológico, al pensar sobre el ambiente, lo que ha sido y sobre lo que será el destino de la humanidad y de su criatura más típica, la tecnología, causa al mismo tiempo de salvación y muerte”*.

Los movimientos ecologistas surgen con el incidente que sufrió el barco atunero japonés *“Daigo Fukuryu Maru”*. La tripulación de dicho barco fue expuesta a la radiación de una bomba de hidrógeno de EEUU durante un ensayo en el atolón Bikini

---

(1) De las Reales Academias de Medicina y de Ciencias Veterinarias

en 1954, afectando gravemente a sus 23 marineros, tragedia que en Japón provocó un fuerte movimiento antinuclear, incidente que fue llevado al cine lo que difundió dicho movimiento.

Inicialmente el ecologismo se centraba en disminuir la contaminación, y proteger los recursos naturales. La expansión del crecimiento demográfico obligaron a luchar para preservar espacios únicos y hábitat de vida silvestre, protegiendo las especies en peligro de extinción. Actualmente las inquietudes ecológicas se han ampliado a la sostenibilidad, agujero de ozono, lluvia ácida y contaminación genética.

La bióloga Rachel Louise Carson del U.S. Fish and Wildlife Service, escribió en 1962 *“La primavera silenciosa”*, best-séller que constituyó las bases del ecologismo moderno, al llamar la atención sobre la muerte del planeta por la contaminación humana. Esta obra se señala que la naturaleza es un todo complejo, cuyas partes están intensamente concatenadas, y las consecuencias indirectas de cualquier acción son difíciles de predecir, incluso para la salud humana, y deben ser severamente vigiladas.

Paralelamente a esta preocupación por la protección del medioambiente surgió la de su componente más significativo, la alimentación, por su destacada incidencia sobre la salud, apareciendo la Agricultura Ecológica como un sistema de producción de alimentos, sin la utilización de compuestos químicos de síntesis, medicamentos o componentes genéticos modificados.

## ANTECEDENTES HISTÓRICOS

La agricultura ecológica tuvo su origen en diversos movimientos alternativos a la agricultura convencional, iniciados a principio del siglo XX. El método más antiguo de agricultura ecológica es el sistema **biodinámico** que el filósofo austriaco Rudolf Steiner desarrolló y practicó en la finca Koberwitz con el apoyo de agricultores y ganaderos, y que hunde sus raíces en su famoso *“Curso de Agronomía”*, inspirado en una nueva tendencia filosófica llamada Antroposofía. La Agricultura Biodinámica, basada en la integración armoniosa del suelo, las plantas y la vida de los animales, señala que *“cada nutriente que abandona la granja en forma de producto se ha de restituir por otros de forma natural”*, y advirtiendo que la utilización de fertilizantes químicos en la agricultura pudiera destruir el suelo considerándolo como un organismo vivo. Propone un sistema de cultivo fertilizado por compostajes a base de desechos vegetales y animales. Su discípulo Pfeiffer, entre 1940-1950, fue el encargado de divulgar este sistema por varios países de Europa y en los EEUU. Los alimentos producidos siguiendo este método, se siguen comercializando bajo la marca DEMETÉR.

Posteriormente aparece la **Agricultura Orgánica** (“*organic farming*”), que como antecedente tiene a Albert Howar en Inglaterra, investigador agrario que estuvo trabajando 25 años en la India, donde ideó un sistema de compostaje (método Indore) basado en los desechos orgánicos de origen vegetal y animal. En los años “40” del pasado siglo Lord Northbourne en Gran Bretaña en su libro *Look to The Land* (1940), y en colaboración con el Dr. Müller en Suiza, apoyándose en los principios de Steiner y en dicho método de compostaje, inician la llamada **Agricultura Orgánica-Biológica**, basada en la utilización de fertilizantes orgánicos, buen estado del humus del suelo, limitación de las labores y considerar la finca como ‘una totalidad orgánica, viva y dinámica’. En dicha publicación conocida como el “*Testamento de la Agricultura*”, se señala que la lucha contra los insectos y plagas de los cultivos se debe efectuar optimizando las condiciones del suelo para el cultivo determinado, y considera que la aparición de esos inconvenientes es la consecuencia de cultivos inadecuados con prácticas incorrectas. Este último método fue introducido en Alemania, por el matrimonio Hans y María Müller y su colaborador Peter Rusch, con la denominación de **Agricultura Biológica**, fundando en 1946 la primera Cooperativa que comercializaba alimentos ecológicos.

En la década de los 70 el japonés Fukuoka difunde su **Agricultura Natural**, basada en la filosofía de la no acción: no labrar, no desherbar y no abonar; y en 1978 los australianos Mollison y Holmgren diseñan la **Permacultura**, publicando el libro *Permaculture One*, donde desarrollan la obtención de los sistemas estables, frente a los métodos agroindustriales intensivos y destructivos, que envenenan el suelo y el agua, reduciendo drásticamente la biodiversidad, y destruyendo el medio, que con anterioridad mantenía paisajes fértiles

La preocupación por la imperiosa necesidad de alimentar a una población creciente y con dificultades económicas, después de la segunda guerra mundial, forzó a la intensificación de la agricultura *versus lato* (con la inclusión ganadería, bosques y acuicultura), basada en los avances de la investigación y las tecnologías asociadas a este campo, que dio como consecuencia lo que genuinamente se denominó “*la revolución verde*”.

Con posterioridad a la mecanización del agro y el uso de agroquímicos en la producción vegetal, y de medicamentos, hormonas y otros factores de crecimiento en la ganadería, aparecieron las semillas híbridas de altos rendimientos, y más recientemente los organismos modificados genéticamente con la finalidad de mejorar la adaptación de cultivos a nuevos habitats, resistencia a plagas, cambios en su composición, etc., y en definitiva aumentar la producción. Dichos avances que han aumentado la

producción de alimentos, sin embargo han provocado una grave pérdida de la biodiversidad, contaminación del medio, y problemas en la seguridad en la seguridad alimentaria (colibacilosis, salmonelosis, encefalitis, dioxinas, etc.).

Fue a partir de 1973, cuando aparece la crisis del petróleo y consecuentemente el encarecimiento de la energía, cuando aparecen diferentes asociaciones preocupadas por la protección del medioambiente, la ecología, así como la problemática de la contaminación creciente en las zonas agrícola-ganaderas explotadas intensivamente. Pero fue en la década de los 80, cuando esta preocupación se extiende a los consumidores no sólo de Europa, sino también de Japón, Canadá, EEUU y Australia, entre otros países industrializados, que prefieren alimentos obtenidos por métodos no contaminantes que protegen a la naturaleza, comenzando a desarrollarse los estándares de producción ecológica. En esos años se produce un enfrentamiento entre este nuevo modelo agricultura, y los que practicaban la famosa *“revolución verde”*, o sea la de producir a cualquier precio, incluso al precio de degradar el medioambiente.

Aunque son muchos los autores que han criticado a la agricultura ecológica señalando que era una vuelta a la agricultura del medievo, que traería consigo menores producciones, subida de precio de los alimentos básicos, necesidad de aumentar la superficie agraria en detrimento de la forestal, y un largo etcétera, pero lo que es verdaderamente cierto, que los alimentos obtenidos ecológicamente van teniendo una mayor demanda, y como aconsejaba el viejo Prof. Klatzman (1981), *“hay que procurar producir lo que se vende, más que intentar vender lo que se produce”*, junto a otros motivos no menos importantes como son la protección del medioambiente y la seguridad alimentaria.

## LA AGRICULTURA ECOLÓGICA

El Codex Alimentarius define a la Agricultura Ecológica como *“un sistema de producción agrícola (vegetal y animal) en el que se da prioridad a los métodos de gestión sobre el uso de insumos externos”*. Dicha definición fue aceptada por la Comisión Europea en su documento *“Organic Farming: Guide to Community rules”* (Le Guillou y Sharpé, 2001). Así mismo el National Organic Safety Board de los EEUU (1995), define a la Agricultura Orgánica, como *“el sistema que promueve y estimula la biodiversidad, los ciclos biológicos y la actividad biológica del suelo, con el mínimo uso de recursos externos a la explotación, y empleando prácticas que devuelvan, mantengan y estimulen la armonía ecológica”*.

Estas definiciones pretenden que la mencionada agricultura integre, de forma global, todos los elementos que la componen: el suelo, las plantas y los animales, sin la utilización de compuestos químicos de síntesis, y protegiendo el medioambiente.

Dicho Codex Alimentarius fijo los siguientes objetivos de la Agricultura Ecológica:

- aumentar la diversidad biológica del sistema en su conjunto;
- incrementar la actividad biológica del suelo;
- mantener la fertilidad del suelo a largo plazo;
- reciclar los desechos vegetales y animales a fin de devolver los nutrientes al suelo, disminuyendo el empleo de fertilizantes químicos;
- promover el buen uso del suelo, agua y aire, disminuyendo toda forma de contaminación de estos elementos por las practicas agrícolas y ganaderas;
- manipular los alimentos procedentes de la agricultura ecológica de forma cuidadosa, al objeto de mantener su integridad orgánica y sus cualidades vitales en todas las etapas;
- establecer en cualquier explotación un periodo de conversión, concerniente a cultivos y ganados destinados a producir alimentos ecológicos.

La producción vegetal ecológica se centra en la limitación de agroquímicos, manteniendo la fertilidad del suelo en base al uso de residuos vegetales y animales o compost, establecimiento de diversidad de cultivos para evitar plagas y empobrecimiento de los suelos, así como la buena gestión de los recursos de la explotación, especialmente el agua. Entre los conceptos destacados de de dicha agricultura figuran: la protección del medioambiente, ocupación más armónica del espacio, y la producción de alimentos de gran calidad.

Señalar que la cría ecológica de animales se asienta en el principio de establecer un fuerte vínculo entre los animales y los cultivos agrícolas, obligándose a que los animales tengan acceso a zonas de ejercicio al aire libre, y que en su alimentación no sólo sea ecológica, sino que preferentemente este producida en la explotación, debiéndose cuidar igualmente el bienestar animal y la atención veterinaria de los mismos.

La falta de confianza de los consumidores en la seguridad alimentaria, especialmente a la de los alimentos producidos de forma intensiva, después de episodios de brotes de toxiinfecciones alimenticias, así como el aumento de los niveles de contaminantes en los productos finales, han contribuido a crear ciertas dudas en los métodos intensivos de la producción agrícola y en su seguridad alimentaria.

Con la aprobación del Reglamento n° 2092 en junio de 1991 por el Consejo de Europa y sus ampliaciones y modificaciones posteriores, se dotó del marco legal a las

exigencias que deben cumplir los alimentos ecológicos, que van desde los métodos de producción, de transformación en su caso, y de los conceptos que deben figurar en su etiquetado. Pero este marco legal también contempla, los controles e inspecciones que deben aplicarse a las explotaciones e industrias que transforman este tipo de alimentos, así como su comercio sea intracomunitario o la exportación e importación de terceros países.

En la Unión Europea la Agricultura Ecológica está regulada a partir del 1 de enero de 2009 por el Reglamento (CE) 834/2007 del Consejo de 28 de junio de 2007, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, que deroga el mencionado Reglamento (CEE) 2092/91. En él se especifica claramente las técnicas autorizadas en éste modelo de producción. Los alimentos ecológicos deben llevar obligatoriamente el sello oficial de la agricultura ecológica de la Unión Europea, permitiéndose añadir, además, los logotipos del país o región de origen.

## MARCO LEGAL DE LOS ALIMENTOS ECOLÓGICOS

El papel de la legislación en fijar los estándares de la producción de los alimentos ecológicos, es determinante para el desarrollo de la agricultura ecológica, al pretender establecer el compromiso entre el concepto ideal de dicha agricultura, y de las soluciones técnicas y económicas para llevarlo a cabo. Al mismo tiempo es esencial establecer normas comunes para todos los operadores que producen o transforman alimentos ecológicos.

En el ámbito internacional existen tres organismos cuyos estándares pretenden definir las normas internacionales, y que trabajan para la armonización de las mismas que faciliten el comercio internacional. Dichos organismos son:

- IFOAM (Federación Internacional de Movimientos de Agricultura Ecológica), que publicó sus estándares básicos en 1998.
- Comisión del Codex Alimentarius (programa común de la FAO y OMS), cuya "*Guía de Orgánicos*" (Organic Guidelines), fue aprobada el 4 de julio de 2001, en la reunión conjunta de Viena.
- Estándares para la Agricultura Ecológica y sus alimentos de la UE, aprobados en 1991 y figuran en el Reglamento 2092.

Históricamente los primeros estándares sobre los alimentos ecológicos aparecen en Oregon en 1973, aunque sólo se señalaba la prohibición de la utilización de sustancias sintéticas tanto en la producción como en la transformación de los mismos.



Posteriormente la OFPA (Acta de Producción de Alimentos Orgánicos) en 1990 adopta las normas de producción para los EEUU, y en 1997 se presenta el borrador de los estándares, que fueron modificados en el 2000, y entraron en vigor en el 2001.

En Europa los primeros estándares para la Agricultura Ecológica fueron dado por la legislación francesa en 1980, para posteriormente publicarse en el Reino Unido, Holanda, Alemania y Dinamarca, hasta que en 1991 se aprobó el Reglamento n° 2092 por el Consejo de Europa, que estandariza para toda la Unión las normas que deben seguir la producción, elaboración, comercialización, etiquetado y control de los alimentos ecológicos.

Debe destacarse que para lograr que los alimentos ecológicos se situaran de manera creíble en el mercado de los productos de calidad, fue necesario contar con un marco legal, el Reglamento 2092/91, reconocimiento oficial de este sistema de producción, que se extendió a otros países extracomunitarios y dio lugar a iniciativas de carácter internacional.

La reforma de la PAC de 1992, y dentro de las medidas de acompañamiento, se pusieron en marcha el apoyo y fomento de la Agricultura Ecológica, ofreciendo ayudas financieras a esta modalidad de agricultura con cargo al *Fondo Europeo de Orientación y de Garantía Agrícola* (FEOGA), lo que ha servido para consolidarla como una alternativa en determinadas condiciones de la agricultura tradicional.

En noviembre de 1998 la Federación Internacional de Movimientos de Agricultura Orgánica (IFOAM) creada en 1972, adoptó un *"pliego de condiciones marco para la agricultura ecológica y de la transformación los alimentos ecológico"*, que unificó las normas de producción y transformación de dichos alimentos, lo que ha servido para darle un mayor crédito estos alimentos, e incrementara su difusión a escala internacional.

La Comisión del Codex Alimentarius adoptó en 1999 unas *"Directrices para la producción, elaboración, etiquetado y comercialización de los alimentos producidos ecológicamente"*, directrices que establecen los principios de la producción ecológica en la explotación, en la preparación, almacenamiento, transporte, etiquetado y comercialización de sus alimentos. También en ese año 1999 aparecen los Reglamentos de la CE números 1804/99 y 1257/99, fijándose en el primero las normas de la producción de alimentos ecológicos de origen animal, y en el segundo ayudas del FEOGA al progreso rural, mediante la aplicación de medidas agroambientales en todos los países de la UE, siendo la Agricultura Ecológica la principal protagonista de estas medidas.

La FAO en 1999 aprobó un programa de trabajo sobre Agricultura Ecológica, encaminado a fomentar esta modalidad de producción en los países en vías de desa-

rollo, del mayor interés para los mismo ya que sus economías limitan el empleo de productos químicos de síntesis, y cuya sustitución por prácticas de manejo, debería tener una gran incidencia en los niveles de producción de este tipo de alimentos.

Finalmente desde el 1 de enero de 2009, entrada en vigor del Reglamento (CE) 834/2007 sobre producción ecológica y etiquetado de sus alimentos, derogándose el Reglamento (CEE) 2092/91. Igualmente se cuenta con los Reglamentos R(CE) 889/2008 de la Comisión, por el que se establecen disposiciones de aplicación del R(CE) 834/2007 con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y control, y el R(CE) 1235/2008 de la Comisión por el que se establecen las disposiciones de aplicación del R(CE) 834/2007, en lo que se refiere a las importaciones de productos ecológicos procedentes de terceros países.

Otros países industrializados, fuera de la UE, cuentan también con leyes específicas sobre producción y control de alimentos ecológicos, como es el caso de Argentina, Australia, Canadá, EEUU, Israel, Japón, Suiza, etc., que han permitido el comercio internacional de los mismos, especialmente con los países de la UE.

## DENOMINACIÓN DE ALIMENTO ECOLÓGICO

El calificativo de ecológico se aplica a los alimentos vegetales o animales naturales, a los transformados destinados a la alimentación humana, y a los piensos, debiendo llevar en el etiquetado o documento que los acompañen las indicaciones que se utilicen en cada Estado miembro, para advertir al consumidor o comprador que se trata de un producto ecológico, y de acuerdo con las reglamentaciones y controles establecidos por la UE, por los Estados y en su caso por las Autonomías.

Dependiendo del país la denominación de los alimentos obtenidos por este método es diferente:

- España, Dinamarca y Suecia lo expresan con el término **ECOLÓGICO**
- Grecia, Francia, Italia, Holanda y Portugal con el de **BIOLÓGICO**
- Reino Unido, con el de **ORGANICO**
- Alemania, indistintamente con el de **ECOLOGICO o BIOLÓGICO**

(BG:..... . ES: ecológico, biológico. CS: ekologické, biologické. DA: økologisk, DE: ökologisch, biologisch. ET: mahe, ökoloogiline. EL: ..... EN: organic. FR: biologique. GA: orgánach. IT: biologico. LV: biològisks, ekològisks. LT: ekologiškas. LU: biologesch. HU: ökológiai. MT: organiku. NL: biologisch. PL:

ekologiczne. PT: biológico. RO: ecologic. SK: ekologické, biologické.SL: ekološki. FI: luonnonmukainen. SV: ekologisk, del Reglamento (CE) n° 834/2997)

Igualmente existen distintas versiones del logotipo comunitario para estos alimentos, donde aparece sobre una espiga rodeada de estrellas, el lema: Agricultura Ecológica, Sistema de control CE, en los diferentes idiomas de los Estados miembros. También por las normas legales de la UE, se hizo extensivo esta protección al uso de los términos “BIO”, “ECO” y sus derivados, solos o combinados.

A los alimentos ecológicos se le aplican las normas dictadas para la Agricultura Ecológica, además de las fijadas para los alimentos convencionales, por los que aquéllos tienen un control más estricto que les confiere una mayor seguridad alimentaria.

## SITUACIÓN DE LA AGRICULTURA ECOLÓGICA EN ESPAÑA

España de acuerdo con los datos facilitados por Biocultura 2009, encabeza en la actualidad el ranking europeo en productos ecológicos y biológicos, siendo Andalucía y Cataluña las comunidades autónomas que más producen alimentos ecológicos, y por el contrario es uno de los países europeos con menos consumidores de este tipo de alimentos.

De acuerdo con el MARM (2009) a finales de 2005, la agricultura ecológica representaba en España:

- 15.693 explotaciones agrarias y ganaderas, gestionando una superficie de 807.000 hectáreas. Los cultivos, prados y pastizales ecológicos ocupan un 2,48% de la Superficie Agraria Útil española.
- Unas producciones que alcanzaban en 2004 un valor estimado de 250 millones de euros y algo más de 1.700 industrias de transformación.
- Menos del 1% del gasto en alimentación de los españoles. Se estima que cerca del 80% de la producción española de productos ecológicos se exporta mayoritariamente a Europa, en especial a Alemania, Holanda, Francia y Reino Unido, a donde llegan sobre todo productos frescos.

## CONSUMO DE ALIMENTOS ECOLÓGICOS

Sylvander (2000) señaló que el comercio de los alimentos ecológicos movían unos 6.200 millones de € en Europa, siendo Alemania el mercado de productos ecológicos

más importante en cuanto a nivel de ventas cifradas en unos 1.600 millones de €, pero en general el mercado de los alimentos ecológicos de los países industrializados, como EEUU, Japón, Canadá, Suiza, Israel, Australia y los Estados miembros de la UE con los mayores niveles de ventas, estas se mueven entre el 0,5 al 3% del total del negocio de la alimentación.

El informe Organic Farming in the European Union sobre agricultura ecológica en la Comunidad (Hechos y Estadísticas) publicado en 2005, estimaba el valor del mercado de productos ecológicos era de 11.000 millones de euros en 2004.

Hay países en la UE eminentemente productores de alimentos ecológicos, como es el caso de Italia que exporta entre el 25 y 30% de su producción, mientras otros como Francia, Holanda y Suecia son netamente importadores. Austria y Dinamarca son los países del mundo con una mayor cuota de mercado de alimentos ecológicos el 3%, aunque de ellos la leche ecológica llegue a representar el 20% del total de su consumo en estos países.

En un reciente trabajo de Fuentes y López de Coca de la Dirección General de Industria y Mercados Alimentarios del Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino (2008), titulado “El consumo de productos ecológicos”, se señala que en 2007 el consumo de fruta ecológica esta alrededor de 178.000 toneladas, le siguen las verduras con 124.000 toneladas y, por último, el aceite de oliva, con 428.000 litros, lo que representa una cantidad total de 303.000 toneladas, Todo el consumo de alimentos ecológicos en España se eleva a 6,8 kilos/persona/año. El gasto realizado en las compras de los mismos fue de 243,6 millones de € para la frutas, 193 millones para las verduras y hortalizas, y 3,9 millones para el aceite de oliva, lo que representa un gasto total de casi 441 millones de € en dichos alimentos. Los gastos *per cápita* de dichos alimentos ecológicos, controlados en ese estudio, se acercan a una media de 10 euros/persona/año.

Comparativamente el gasto anual por los suizos alcanzan los 115 euros por persona/año, en Dinamarca 80 €, Austria 64, Alemania 54, Inglaterra 47, Suecia 42, Italia 32, Holanda 28 y Francia 27 € (BioFach y Vivanness 2008).

En el mencionado trabajo se indica que es difícil conocer el consumo directo de productos ecológicos, principalmente por que los consumidores no tienen nada claro lo que son, y .por otra parte los agricultores quizás están dando por ecológico aquello que no lo es por no tener los certificados requeridos. Igualmente los logos que diferencian a un producto ecológico son tan variados, que el público en general los desconoce, y sería conveniente introducir un código de barras que identifique el

producto, sin necesidad de interpretaciones subjetivas del panelista que apunta sus compras.

Sobre este particular, la Profesora Raigón Jiménez (2007) en su libro *Alimentos ecológicos, calidad y salud*, mostró que el consumo de alimentos ecológicos es una cuestión de oferta y de demanda, y de las políticas de intermediarios, precisando que la venta directa es una de las bases de la producción ecológica, como herramienta para paliar el impacto de costes. Producir alimentos ecológicos es más caro que los de la agricultura convencional, porque son más costosa su obtención y menores los rendimientos.

El sobreprecio de los alimentos ecológicos sobre los obtenidos de forma convencional es del 20 al 50%, considerando el perfil del consumidor de este tipo de alimentos, personas entre 20 a 50 años, urbanos, de educación alta, clase media y con hijos pequeños. Los estudios de prospección de mercados demuestran que todavía falta entre los consumidores una información verdadera de lo que son estos alimentos, sobre las características de sus sistemas de producción, su respeto al medioambiente y la calidad saludable de los mismos, señalando las cooperativas y asociaciones de productores la escasa atención que les dedican las administraciones y las asociaciones de consumidores.

En general los alimentos ecológicos se venden mayoritariamente a través de supermercados y en tiendas especializadas, aunque hay excepciones como Alemania a favor de las tiendas especializadas, y también existe la compra a través de internet o directa al productor de carácter más local o por el turismo rural.

Es de destacar las campañas de promoción de los alimentos ecológicos efectuadas por distintas Consejerías de la Junta de Andalucía, para desarrollar el consumo interno de alimentos ecológicos, mediante el impulso a agrupaciones de empresas, especialmente a plataformas distribuidoras y comercializadoras, el fomento del consumo social e institucional de alimentos ecológicos en centros educativos y hospitales, realización de campañas de sensibilización sobre la importancia y beneficios del consumo de productos ecológicos y, finalmente, mediante la difusión de los puntos de venta andaluces de alimentos ecológicos, mereciendo destacarse la publicación

Dietario/Recetario: proyecto alimentos ecológicos para escolares de Andalucía; La red de los restaurantes verdes; La Feria de Alimentos Ecológicos o Bioferia.

## CONTROL Y DISTINTIVOS DE LOS ALIMENTOS ECOLÓGICOS

En España de acuerdo con el Reglamento (CE) 834/2007 sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, el control y la certificación de la producción agraria ecológica es competencia de las Comunidades Autónomas y se lleva a cabo mayoritariamente por autoridades de control públicas, a través de Consejos o Comités de Agricultura Ecológica territoriales que son organismos dependientes de las correspondientes Consejerías o Departamentos de Agricultura, o directamente por Direcciones Generales adscritas a las mismas. No obstante, las Comunidades Autónomas de Andalucía y Castilla La Mancha, han autorizado organismos privados para la realización de estas funciones y, en el caso de Aragón, las autoridades competentes han designado una autoridad de control pública y han autorizado a su vez organismos de control privados.

Como distintivo para que el consumidor de los productos de la agricultura ecológica, todas las unidades envasadas, además de su propia marca y alguna de las menciones específicas de la agricultura ecológica, llevan impreso el código de la autoridad y organismo de control o un logo específico, con el nombre y el código de la entidad de control. También puede ir impreso el logo comunitario de la AE, que será obligatorio, en un nuevo diseño, a partir del 1 de julio de 2010, en las condiciones establecidas en la normativa.

En los alimentos elaborados mediante mezclas de ingrediente, tan sólo podrán denominarse ecológicos cuando al menos el 95% del peso de los mismos se hayan obtenido por dicho método. También se puede indicar en la etiqueta cuando el contenido en ingredientes ecológicos supere el 70%, de que dicho alimento contiene componentes ecológicos.

A continuación resumimos por su interés la Clasificación de los productos ecológicos (orgánicos) en EEUU:

- 100% ecológicos: aquellos productos naturales por completo, sin ingredientes no ecológicos en ninguna de sus etapas.
- Ecológicos: aquellos productos que poseen un 95% de ingredientes ecológicos.
- Hechos con productos ecológicos: aquellos productos que contengan entre un 50% y 95% de ingredientes ecológicos.
- Hecho con menos del 50% de productos ecológicos: aquellos que estén realizados con algunos ingredientes ecológicos, los cuales deberán de especificarse.

## MÉTODO ECOLÓGICO DE PRODUCCIÓN VEGETAL. EXTRACTO DE LAS NORMAS

La fertilización del suelo debe realizarse por rotación de cultivo, utilización de abonos orgánicos obtenidos en explotaciones que cumplen las normas de la agricultura ecológica o compost, pudiendo activarse éstos con preparados biodinámicos a base de microorganismos naturales. En caso necesario pueden utilizarse los abonos orgánicos o minerales de los que figuran en el anexo II del Reglamento 2092.

La lucha contra los parásitos, plagas o malas hierbas, debe basarse en la selección de variedades y especies resistentes, rotación de cultivos, medios mecánicos, lucha biológica y quema de las malas hierbas. Sólo en caso de peligro eminente de plaga podrán utilizarse sustancias señaladas en el anexo II B de dicho Reglamento.

Existe un periodo de conversión de dos años antes de la siembra de praderas, o de tres años antes de la cosecha de alimentos ecológicos, años en los que debe ser aplicadas las anteriores normas.

## MÉTODO ECOLÓGICO DE PRODUCCIÓN ANIMAL. EXTRACTO DE LAS NORMAS

En cuanto a las normas no se permiten explotaciones animales sin superficie agraria, donde se coseche al menos una parte importante de sus dietas, y se fertilice con el estiércol de dichos animales, explotaciones verdaderamente integradas.

Los componentes de las dietas deben proceder de la agricultura ecológica (*piensos ecológicos*), no pudiendo utilizar sustancias químicas de síntesis, antibióticos y sustancias con actividad hormonal como promotores del crecimiento, OMG, ni el uso de tortas de oleaginosas a los que se le ha extraído el aceite con hexano, ni practicar la lactancia artificial. En la lista positiva de aditivos para la alimentación animal figuran los oligoelementos, vitaminas (presente en los alimentos naturales y sólo las de síntesis para los monogástricos), enzimas, agentes ligantes, microorganismos probióticos que no estén modificados genéticamente. No se autorizan ni la adición de grasas, harinas de carne, aminoácidos de síntesis, antibióticos, medicamentos, etc.

Los herbívoros basarán su alimentación en pastos y forrajes y al menos el 60% de la materia seca de la dieta, que deberá estar constituida por pastos, forraje fresco, henificado o ensilado, así como paja y residuos de la agricultura ecológica, También en la dieta de los cerdos y aves se utilizarán forrajes frescos o conservados, y en las aves durante su engorde la dieta contendrá un mínimo del 65% de cereales.

El bienestar animal es uno de los principales objetivos de ésta producción, y la salud de los mismo es una parte importante de ese bienestar, sin embargo la restricción en los tratamientos sanitarios de los animales es una de las principales preocupaciones en la conversión a ganaderías ecológicas. El Reglamento 1804/99 señalaba las estrategias a seguir; selección de razas y estirpes resistentes, cría con la madre en los mamíferos, consumo de alimento verde y buen manejo de los pastos (incluso como método de control de las malas hierbas), consumo de granos y semillas producidos en explotaciones de agricultura ecológica, bajas carga animal, evitar ritmos elevados de crecimientos, alojamientos adecuados con luz, cama, mayores espacios, sobre suelo sólido y favorecer el ejercicio de los animales. Como es lógico, con estas medidas no se pueden prevenir todas las epizootias, por los que en determinadas ocasiones se deberá acudir a la prescripción veterinaria de tratamientos convencionales y a la prevención mediante vacunaciones.

En cuanto a los periodos de conversión en el Reglamento 1804/99 fijaba las normas de aplicación para la producción de carne (12 meses para vacunos y caballos, 4 meses para pequeños rumiantes y cerdos, 10 semanas para las aves), de leche (6 meses) y huevos (6 semanas). Igualmente se señala que el origen de los animales, preferentemente deben ser razas autóctonas adaptadas al entorno y más resistentes a enfermedades endémicas, y para nuevas compras procedan de explotaciones ecológicas.

## PAN, PASTAS Y GALLETAS ECOLÓGICAS

Pan laborado a partir de harinas de cereales de producción ecológica, generalmente dejándole parte de su salvado. Sin levadura industrial añadida, ni otros aditivos que no sean la levadura natural y la sal.

De color más intenso como resultado de larga fermentación de la masa. Corteza gruesa y crujiente, y gracias a esta corteza el pan logra conservarse mucho más tiempo. Miga muy esponjosa, con burbujas de distintos tamaños, por la acción ejercida por los microorganismos, dándole al pan esa característica tan particular.

En España el consumo de pasta ecológica es muy bajo (1,5% del total) y una gran parte de ella es importada, sobre todo de Italia. Además del cereal y verduras deshidratadas, la pasta ecológica suele contener ingredientes con valor nutricional, como la soja o quinoa que completa la composición aminoacídica del trigo duro. Todos estos ingredientes proceden de cultivos ecológicos.



Las galletas ecológicas están elaboradas en base a harina integral de trigo o espelta y de soja no transgénica, azúcar de caña sin refinar, aceite de oliva, malta, sal marina, vainilla y levadura natural, pudiendo estar adicionadas de cacao, frutos secos, pulpa de naranja, frutas deshidratadas, etc., procedentes de cultivos ecológicos (Wright y McCrea, 2002; Martín et al., 2007).

## ACEITE DE OLIVA ECOLÓGICO

Partiendo de la gestión ecológica del olivar se procederá a las podas de aclareo, poco laboreo, desyerbe y cultivos de cobertura (leguminosas-gramíneas); utilización de abonados orgánicos (compost de alperujo con estiércol y residuos vegetales), en el control de plagas con insecticidas naturales y trampas, y en enfermedades cobre y azufre autorizados en la agricultura ecológica (Guzmán Casado et al., 2002)

El aceite ecológico se obtiene con aceitunas sanas y en justa maduración (envero), que previa limpieza para suprimir impurezas y separación por variedades, se muelen el mismo día de su recolección al fin evitar la fermentación y oxidación producida durante el acopio, con la consiguiente pérdida de calidad.

Dicho aceite se elabora mediante tratamientos de extracción en frío, y con técnicas que no extraen el alpechín en la almazara (reduciendo al máximo el impacto medioambiental), usando sólo procedimientos mecánicos o físicos controlados sin alteren la calidad el aceite. De la pasta formada de las olivas, se separa por lado el aceite y por otro el orujo unido al alpechín.

La Comunidad andaluza tiene el 58,96 por ciento de la superficie de cultivos ecológicos de España, con casi 600.000 hectáreas, y es la primera en número de operadores, con más de 7.500. El olivar ecológico en Andalucía supone el 25 por ciento de la superficie total cultivada bajo producción ecológica, con rendimiento del 30 por ciento de la producción final agraria. En cuanto dicho olivar ocupa el primer lugar en superficie de cultivos, principalmente en Córdoba con 4,647 hectáreas cultivadas y 865 operadores, seguida de Sevilla con 2.187 y 532; Huelva 767 y 338; Granada 635 y 349; Jaén 556 y 195; Cádiz 443 y 145; Almería 183 y 264, y Málaga con 117,64 ha y 172 operadores (Ecoliva 2008).

## VINOS ECOLÓGICOS

Las normas técnicas de elaboración de vino de uvas ecológicas, se basan en criterios de calidad y en los principios de la producción ecológica, según se acordó en la Conferencia Sectorial de Agricultura y Desarrollo Rural (23 de octubre 2006), fijándose como principal objetivo de esta producción la obtención de un vino de calidad diferenciada.

La elaboración de vinos ecológicos tiene un severo reglamento controlado por un Consejo Regulador, comenzando por la fertilización de las viñas con solo abonos orgánicos naturales, procurando además que sean de origen vegetal procedentes de residuos del propio cultivo, como orujos o sarmientos triturados, así como estiércol o "compost" por la mezcla de ambos. No se pueden quemar restos de cultivo para no afectar a la microbiota del suelo.

Está prohibida la utilización de herbicidas para luchar contra las malas hierbas, que deberán ser limpiadas con laboreo mecánico, para no dañar la microflora-fauna del suelo que rodea a las cepas.

Para la lucha contra las enfermedades del viñedo sólo se permite la adición de azufre y el llamado "caldo bordelés" (sulfato de cobre). Contra las plagas contar con cepas resistentes, o bien la "lucha biológica".

En la elaboración del vino se exige que la fermentación alcohólica sea por las levaduras naturales existentes en el mosto, que la clarificación sea natural con clara de huevo o gelatina, permitiéndose sólo la adición de contenidos muy pequeños de anhídrido sulfuroso como conservante (**no supere 20mg/l**), y de ácido tartárico para corregir la acidez. La filtración se realizará por los medios adecuados, sin que transmitan al vino olores ni sabores extraños. Se autoriza el empleo de técnicas de frío para acondicionamiento térmico de la vendimia, control de las temperaturas de fermentación, conservación, estabilización frigorífica de los vinos, paralización de la fermentación en la elaboración de los vinos dulces y abocados. En todas las elaboraciones que necesiten adición de alcohol, azúcar, mosto, mosto concentrado o rectificado, deberán provenir de la producción ecológica. El envasado se realizará en botellas de vidrio.

En la actualidad cerca de un centenar de bodegas españolas, o hacen vino ecológico o trabajan con cultivos ecológicos, dado el interés de los consumidores por este productos, y por el por el positivo efecto sobre el medioambiente. El vino ecológico está conquistando el mercado mundial la feria BioFach en la cita de 2009 celebrada en

Núremberg. en el pasado mes de febrero (18 al 22), donde 318 expositores de vinos de producción ecológica. han presentado productos de máxima calidad Los principales representados han sido Italia con 94 expositores, seguida de Alemania (81), España (53), Francia (42) y Austria (16).

## MIELES ECOLÓGICAS

Es frecuente en la miel convencional encontrarse trazas de productos químicos como antibióticos, piretrinas, derivados de la tiazolidina, nitrofuranos, etc. empleados en combatir las enfermedades de las abejas, así como por el tratamiento de plagas de cultivos en zonas donde las abejas recolectan el néctar y polen.

De acuerdo con la reglamentación, la ubicación de las colmenas debe estar en un radio de tres kilómetros en áreas de cultivos producidos ecológicamente o en zonas sometidas a un bajo impacto medioambiental, así como alejadas de cualquier fuente de contaminación (centros urbanos, vertederos, incineradores de basuras, etc.). Los Estados miembros de la UE disponen de normas para prohibir la producción de miel ecológica en zonas o comarcas que no cumplan dichas condiciones.

La apicultura ecológica al igual que la convencional, debe ser cuidadosa en el reconocimiento de las especies que integran la flora de la zona que utilizan las abejas, ya que pueden existir plantas de los géneros *Senecio*, *Heliotropium* y *Crotolaria*, y muy especialmente áreas con flores del *Senecio jacobea*, que contienen alcaloides de la pirrolizidina, algunos de los cuales con una marcada incidencia hepatotóxica, mutagénica y cancerígena, por lo que deben prohibirse la explotaciones apícolas en las zonas donde dicha especie este presente (Boza, 2001).

## ACUICULTURA ECOLÓGICA

Ante la disminución de las capturas por el creciente agotamiento de los caladeros, y la demanda creciente de ésta excepcional fuente de nutrientes esenciales, se pensó como solución su producción en cautividad tanto en esteros, jaulas o bateas. Una especialización de los alimentos ecológicos es su acuicultura El consumo de pescado en España es de 37,2 kg/persina/año

Una de las ventajas es que estos alimentos pasen por lonjas, al comercializarse por establecimientos autorizados y con la garantía de la disponibilidad durante todo el año, al no estar afectados por periodos de veda.

En la actualidad se práctica en acuicultura los siguientes procesos: ablación de camarones hembras con fines reproductivos; introducción poliplóides artificial; hibridación artificial; producción de estirpes de un solo sexo (reversión sexual alimentando alevines con piensos con hormonas masculinizantes para producir sólo machos).

## SEGURIDAD DE LOS ALIMENTOS ECOLÓGICOS

La seguridad de los alimentos ecológicos tiene distintas valoraciones. Si se enfoca al riesgo químico es evidente que son más seguros que aquellos que aplican todo tipo de agroquímicos sin los controles adecuados. Pero de acuerdo con La Torre y colaboradores (2005) el principal problema para los alimentos ecológicos es el de la contaminación bacteriana, como se ha puesto de manifiesto en los EEUU, el país donde ha habido un mayor y más rápido crecimiento de la producción y consumo de alimentos ecológicos. El desarrollo ha llevado al crecimiento de empresas que se dedican en su totalidad a la producción y transformación de estos alimentos. Por este motivo actualmente es posible encontrar verduras, hortalizas y frutas ecológicas que son elaboradas y tratadas industrialmente para poder abastecer el mercado americano.

Pese a la valoración positiva de los alimentos ecológicos, recientemente se han visto implicados en problemas de salud pública. En casi todos los casos relacionados con la bacteria *Escherichia coli* O157:H7. Una revisión de los sistemas productivos ha permitido comprobar que el abonado se hace con mezclas de materias orgánicas, entre las que se encuentran heces de vacuno, a las que se asociado la transmisión directa desde animales portadores a los alimentos. Los posteriores sistemas de lavado no fueron eficaces para eliminar este microorganismo, por lo que pasa al consumo de la población provocando brotes importantes por su extensión, siendo este el principal riesgo biológico que se debe controlar (Tauxe et al., 1995; Hsu et al., 2006).

Otro contaminantes microbiano y por sus toxinas, se presentas en estos alimentos por esporas del *Clostridium botulinum*, descubierto en mieles ecológicas, o de aflotoxinas producidas por mohos que pueden aparecer "per se" en estos alimentos con la misma probabilidad o incluso más que en los convencionales al no estar tratados con funguicidas (Varela et al., 1998).

También pueden estar presentes en los alimentos ecológicos nitratos y/o nitritos, que reaccionan con amins secundarias de los alimentos formando nitrosaminas, o inducir su formación durante el proceso de la digestión del alimento al darse en el estómago condiciones de acidez para su formación. La explicación de su presencia

en estos alimentos, sería por el excesivo abonado con estiércol y purines que incrementa el contenido de nitratos en verduras y frutas. También se pueden formar como consecuencia de una reacción química entre las amidas presente y la adición de aditivos autorizados, pero principalmente esta contaminación sucede por la adición en la industria alimentaria con la finalidad de preservar el color vivo de productos cárnicos transformados. El contenido de nitrosamidas de los alimentos suele estar generalmente a nivel de trazas, de 1 a 20ng/g en diversos alimentos, especialmente en embutidos, jamones, quesos, cervezas, frutas, verduras y conservas.

Los alimentos ecológicos que han originado la llamada “*alimentación natural*”, han tenido también diversas críticas por los productores y transformadores de los alimentos convencionales, ya que dicen que los alimentos ecológicos posiblemente tengan menores cantidades de contaminantes químicos, pero no se libran de los contaminantes microbianos y de sus toxinas. Efectivamente las etiquetas “*natural*”, “*orgánica*”, “*biológica*”, o “*ecológica*”, hace pensar en la inocuidad de estos alimentos para la salud, sin acordarse que los atenienses le dieron a beber a Sócrates un producto natural, jugo de cicuta (*Conium maculatum*) y naturalmente se murió. Todo lo cual nos señalan la necesidad de extremar los controles físico-químicos y biológicos a los alimentos ecológicos que eviten estas posibles incidencias.

## PERSPECTIVAS DE LOS ALIMENTOS ECOLÓGICOS

El sector de la agricultura ecológica dispone como instrumento que le permite afianzar su especialidad y obtener credibilidad en los mercados de alimentos, del Reglamento (CE) 834/2007, que entro en vigor el 1 de enero de 2009. Durante las últimas décadas, los alimentos ecológicos dejaron de ser un sector marginal circunscrito a un mercado local, para entrar en el comercio nacional, intracomunitario e internacional, principalmente a través de operadores, cadenas de tiendas especializadas y supermercados, pero todavía con una cota de mercado del 1 al 3% del total de los alimentos.

Por otro lado, desde hace unos años la agricultura convencional esta cada vez más sujeta a normas estrictas de protección del medioambiente y del bienestar animal. Dicha evolución esta dando lugar a nuevos planteamiento, como los de la “*agricultura integrada*”, concepto propuesto por la Organización Internacional de Lucha Biológica que define esta agricultura integrada como “*un sistema agrario de producción de alimentos en base a recursos y mecanismos naturales, en sustitución de los tratamientos y enmiendas que dañan el medio ambiente, y que garantizan una agricultura viable a largo plazo*”. Por tanto la producción ecológica deberá posesionarse con relación a estos nuevos métodos,

próximos a ella, conservando su identidad específica que la diferencia de los otros modelos de la agricultura.

Padel y Lampkin (1994), estudiaron comparativamente la necesidad de mano de obra de la agricultura ecológica en comparación con la convencional, encontrando que estas últimas necesitaban más mano de obra, tanto si se considera en horas de trabajo o como unidades con dedicación plena (2.200 horas/año), especialmente por las faenas manuales, mecánicas ineludibles que sustituyen a los tratamientos con herbicidas, preparación de los alimentos en granja para su venta, etc. Hecho de crear empleo es de una gran importancia, máxime en las zonas rurales, para evitar el progresivo despoblamiento de las mismas.

En un periodo de crisis, optar por el consumo de productos ecológicos parece un reto difícil a asumir, aunque un sector de la población demanda estos alimentos seguros a un precio razonable, y respetando los márgenes que permiten la supervivencia de los productores. Desde el punto de vista del marketing, se conoce el gran impacto inmediato de las ofertas o bajada de precio, que no lo tienen las propuestas a largo plazo o diferidas en el tiempo, como es la protección del medioambiente o efectos favorables sobre la salud de los alimentos ecológicos. Por todo ello, se ve necesario campañas de divulgación y promoción mostrando las virtudes de dichos alimentos, que fomenten el consumo, así como el de instituciones (centros educativos y hospitales), y, mediante la difusión de los puntos de venta de alimentos ecológicos, mereciendo destacarse la publicación

Dietario/Recetario: proyecto alimentos ecológicos para escolares de Andalucía; La red de los restaurantes verdes; La Feria de Alimentos Ecológicos o Bioferia. Por la junta de Andalucía.

Existe la Comisión controladora de la agricultura ecológica de carácter consultivo, formándose comités territoriales dependientes de las CCAA, para el control de la producción e industrias de los alimentos ecológicos. En este ámbito también se integraron asociaciones y cooperativas de productores y consumidores, con la finalidad de aumentar la producción de estos alimentos, cuidar de su calidad y establecer una red adecuada de comercialización, todo con la finalidad de potenciar la economía local.

## BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Alonso Mielgo, A.M., Sevilla Guzmán, E., Sánchez de Puerta, F. y Guzmán Casado, G., 2001. Propuestas alternativas a la agricultura industrializada: el caso de la agricultura ecológica en España. En Gómez, C. y González, J.J. (coords.). Agricultura y Sociedad en el cambio de siglo. McGraw-Hill. Madrid, pp. 677-708.

- Biocultura**, 2009. Feria de productos ecológicos y consumo responsable. Madrid, 5 al 8 de noviembre de 2009 (edición 25ª).
- Boza, J.** 2001. La seguridad alimentaria en la Unión Europea. *Anales de la Real Academia de Ciencias*, 14: 123-176.
- Boza, J.**, 2002. Alimentos ecológicos. Curso Superior Internacional sobre "Los retos de la Nutrición Animal para el tercer milenio: calidad y seguridad de los alimentos de origen animal". Universidad Internacional de Andalucía, sede de Baeza.
- Carson, R.L.**, 1980 *La primavera silenciosa*. Grijalbo, Barcelona.
- COM**, 2000. The Agricultural situation in the European. Report.: 485 (26.07. 2000).
- Consejería de Agricultura y Pesca (CAP)**, 2003. Plan Andaluz de la Agricultura Ecológica. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. Sevilla.
- Consell Català de la Producció Agrària Ecològica**, 2003. Cuaderno de la Producción Agraria Ecológica [en línea]. Accesible en: <http://www.ccpae.org> [consulta 14/11/2003].
- D'Agostino, F.**, 2003. *Bioética, estudios de filosofía del derecho*. Ediciones Internacionales Universitarias. Barcelona.
- Ecoliva**, 2008. Feria del olivar ecológico y VII Jornadas Internacionales del Olivar Ecológico. Jaén.
- FAO**, 1999. ¿Qué son los alimentos ecológicos y cómo están regulados? Institute of Food Science and Technology. Roma.
- Foster, C. y Lampkin, N.**, 2000. Organic and in-conversion land area, holdings, livestock and crop production in Europe. Final Report 1 (proyecto FAIR 3-CT96 1794).
- Fundación de Ecología y Agricultura**, Stiftung Ökologie & Landbau; (SOEL); Federación Internacional de Movimientos de Agricultura ecológica (IFOAM) e Instituto de Investigación Suizo de Agricultura Biológica (FiBL), 2005 y 2006.
- Fuentes, C., y López de Coca, E.**, 2008. El consumo de productos ecológicos. Distribución y Consumo 7 Mayo-Junio. Dirección General de Industria y Mercados Alimentarios Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Madrid.
- Fukuoka, M.**, 1995. *The One-Straw Revolution: An Introduction to Natural Farming*. Amazon.ca. Toronto,
- García Trujillo, R.**, 2001. Aproximación a las potencialidades y obstáculos de la agricultura y ganadería ecológica en Andalucía. En *La Práctica de la Agricultura y Ganadería Ecológica*. CAAE, Junta de Andalucía. Sevilla,
- Guzmán Casado, G., González de Molina, M., Sevilla Guzmán, E.** (eds.), 2000. Introducción a la agroecología como desarrollo rural sostenible. Mundi-Prensa. Madrid.
- Guzmán Casado, G., Serrano, C. y Alonso, A.M.**, 2002. Evaluación de la productividad del olivar ecológica integrado del municipio de Deifonte (Granada). V Congreso de la SEAE, Gijón: 611-622.
- Hsu, W.Y., Simonne, A., Jitareerat, P.**, 2006. Fates of seeded *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on selected fresh culinary herbs during refrigerated storage. *J. Food Prot.* 69:1997-2001.
- Klatzman, J.**, 1981., Israel. Ariel, colección Elcano, Barcelona, 194.
- International Federation of Organic Agriculture Movements**. 2003. Normas Básicas del IFOAM para la Producción y Procesado Orgánico [en línea]. Accesible en: <http://www.ifoam.org>
- La Torre, A., Leandri, A., Lolletti, D.**, 2005. Comparison of health status between organic and conventional products. *Commun Agric. Appl. Biol. Sci.* 70(3):351-363.
- Le Guillou, G. y Scharpé, A.**, 2001. *La Agricultura ecológica: guía sobre la normativa comunitaria* Dirección General de Agricultura de la Comisión Europea. <http://europa.eu.int>
- MAPA**. 2007. Plan Integral de actuación para el fomento de la Agricultura ecológica 2007-2010. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.



- MARM**, 2009. Agricultura ecológica en España. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid.
- Martín, E., de Mateo, B., Miján, A., Pérez, A. M., Redondo, P., Sáenz, I.**, 2007. Pan y Cereales. Dirección General de Salud Pública y Alimentación. Comunidad de Madrid.
- Martínez Alier, J.** 2005. El Ecologismo de los Pobres. Conflictos Ambientales y Lenguajes de Valoración. Icaria. Barcelona.
- Offerman, F. y Neeberg, H.**, 2000. Economic performance of organic farms in Europe. Organic farming in Europe; Economics and Policy, Vol 5. University of Hohenheim.
- Padel, S. y Lampkin, N.**, 1994. Farm-level performance of Organic Farming Systems. En: The economics of organic farming. An international perspective. Lampkin y Padel eds. CAB International. Wallingford.
- Palacio Valdés, A.**, 1943. La aldea perdida. Espasa-Calpe Argentina, Buenos Aires.
- Plan Andaluz de Agricultura Ecológica. II** (2007-2013). Empresa Pública Desarrollo Agrario y Pesquero. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla.
- Propuesta de Reglamento (CE)** del Consejo que completa para las producciones animales, el Reglamento (CEE) 2092/91. COM/96/0366 final – CNS 96/0205. DO C 293 de 5.10.96.
- Raigón Jiménez, D.**, 2007. Alimentos ecológicos, calidad y salud. Edición de la Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla
- Real Decreto 152/1993** de 22 de octubre de 1993 sobre producción Agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios. BOE nº 283 del 26.11.93.
- Reglamento (CEE) N° 2092/91** del Consejo de 24 de junio de 1991 sobre la producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios. (Diario Oficial L 198 de 22.7.1991).
- Reglamento (CEE) 94/92** de la Comisión de 14 de enero de 1992, por el que se establecen las disposiciones al régimen de importaciones de países terceros. DO L 011 de 17.1.1992.
- Reglamento (CEE) 2078/92** del Consejo de 30 de junio de 1992, sobre métodos de producción agraria compatible con las exigencias de la protección del medioambiente y la conservación del espacio natural, DO L 215 de 30.7.92
- Reglamento (CE) 1804/1999 del Consejo**, de 19 de julio de 1999 por el que se completa, para incluir las producciones animales, el Reglamento 2092/91. DO L 222 de 24.8.99.
- Sanz Pérez, B.**, 1999. Aditivos alimentarios. Editorial Everest, S.A. La Coruña
- Sociedad Española de Agricultura Ecológica (S.E.A.E.).**
- Steiner, R.**, 2001. La filosofía de la libertad. Editorial Cuaderno Pau Damasc. Barcelona. (Traducción de la obra original de 1894 por B.S. Muniaín y A. Anctxabala).
- Sylvander, B.**, 2000. La place de l'agriculture biologique dans l'univers des filières de qualité spécifique. Colloque Lélevage en agriculture biologique. Sommet de l'élevage 2000. Clermont-Ferrand. Francia.
- Tauxe, R., Kruse, H., Hedberg, C., Potter, M., Madden, J., Wachsmuth, K.** 1997. Microbial hazards and emerging issues associated with produce. J, Food Protection, 60:1400-1408.
- Torre, C.** 2001. Las producciones ecológicas. XVII Curso de Especialización FEDNA. Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Complutense. Madrid.
- Varela, G., Núñez, C., Moreiras, O y Grande Covián, F.**, 1998, Dietas mágicas. Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad y Servicios Sociales. Comunidad de Madrid.
- Willer, H. y Yussefi, M.** 2004. The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends. Inter. Federations of Organic Agriculture Movements. Bonn, <http://www.soel.de/oekolandbau/weltweit.html>
- Wright, S. y McCrea, D.**, 2002. Procesado y producción de alimentos ecológicos. Editorial Acribia, Zaragoza.



<http://www.permacultura-montsant.org>  
[http://www.permaculture.co.uk/erc/new\\_books.html](http://www.permaculture.co.uk/erc/new_books.html)  
<http://www.organic-research.com/index.asp>  
<http://www.attra.ncat.org/publication.html>



# RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN ENTEROCOCOS AISLADOS DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL, PESCADO Y MARISCOS

ANTONIO SÁNCHEZ VALENZUELA, NABIL BENOMAR, RUBÉN PÉREZ PULIDO, HIKMATE ABRIQUEL, ANTONIO GÁLVEZ\*

## RESUMEN

La incidencia de resistencias a agentes antimicrobianos en alimentos es una preocupación de la que ya se ha hecho eco la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Dado que los enterococos están presentes con gran frecuencia en alimentos y son considerados como un reservorio de elementos genéticos transmisibles implicados en la diseminación de resistencias, hemos estudiado la incidencia de resistencia a diferentes antimicrobianos en una colección de cepas procedentes de queso, carne, pescado, y marisco. Los resultados obtenidos indican una elevada incidencia de resistencias a antimicrobianos en cepas de enterococos procedentes de queso y carne, siendo también frecuente la presencia de cepas multirresistentes. Por el contrario, las cepas de enterococos procedentes de pescado y marisco presentan una frecuencia menor de resistencia a antimicrobianos.

## INTRODUCCIÓN

Los enterococos son cocos Gram-positivos, anaerobios facultativos, catalasa negativos y la mayoría aglutinan con anticuerpos específicos para el grupo D de Lancefield. Debido a estas características, durante largo tiempo se los consideró como

---

\* Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas, s/n. 23071-Jaén. E-mail: agalvez@ujaen.es

pertenecientes al género *Streptococcus*; sin embargo, los estudios genéticos marcaron claras diferencias con este género, por lo cual a partir de la década de 1980 los enterococos se constituyeron como un nuevo género llamado *Enterococcus* e integrado por 40 especies (tabla 1). Estos microorganismos constituyen un grupo microbiano de interés dentro de las bacterias lácticas (BAL) colonizando numerosos nichos ecológicos debido a su elevada resistencia a condiciones ambientales adversas y constituyendo una parte esencial de la microbiota intestinal de animales y personas, siendo los cocos Gram-positivos más abundantes en humanos (1,2). Por ello, han sido considerados como comensales inoocuos o bien con bajo potencial patogénico. Sin embargo, esta percepción ha sido cuestionada con frecuencia en las últimas décadas debido al incremento de su incidencia en las infecciones hospitalarias, así como de su resistencia a los antibióticos (3). Es ya un hecho que los enterococos se encuentran entre los principales agentes causantes de infecciones nosocomiales, estando implicados con mayor frecuencia en infecciones del tracto urinario, endocarditis, infecciones de heridas quirúrgicas, y bacteremia (4). Por todo ello, los enterococos han pasado de ser meros comensales de la microbiota intestinal del hombre y de estar ocasionalmente implicados en infecciones, a ser considerados un patógeno nosocomial de primer orden con una importancia creciente. Las 2 especies principales causantes de infección enterocócica son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. Históricamente, las infecciones por *E. faecalis* representaban el 80–90%, mientras que las infecciones por *E. faecium* representaban el 5–10 % del total; sin embargo, actualmente la proporción de aislamientos de *E. faecium* ha aumentado respecto a *E. faecalis* y se sitúa entorno del 22,2% (5). Además el género *Enterococcus* representa un desafío terapéutico debido a su resistencia intrínseca (de carácter cromosómico y no transferible) a varios antibióticos (tabla 2). La ampicilina y la vancomicina son los tratamientos estándar para los enterococos sensibles. La combinación de ampicilina o vancomicina con un aminoglucósido es necesaria para alcanzar actividad bactericida para el tratamiento de infecciones enterocócicas graves. Además de la resistencia intrínseca, poseen una gran capacidad de adquisición de otros mecanismos de resistencia y de genes de virulencia, por transferencia de plásmidos o transposones conjugativos, intercambio cromosómico o mutaciones (tabla 2). Es de especial importancia la adquisición de alto nivel de resistencia a aminoglucósidos, así como a penicilina, ampicilina o glucopéptidos. Este se presenta, actualmente, como el gran problema de resistencia emergente en este género, particularmente en *E. faecium*. Se han descrito siete genotipos de resistencia a glicopéptidos denominados vanA a vanG, de los cuales hasta el momento sólo dos (vanA y vanB) tienen impacto clínico por su capacidad de transferencia entre especies y géneros diferentes (6, 7). Las infecciones por enterococos resistentes a la vancomicina (ERV) se producen casi exclusivamente a nivel hospitalario.

El carácter de los enterococos como patógenos oportunistas contrasta con su presencia en numerosos tipos de alimentos, especialmente los de origen animal, donde llegan como parte de la contaminación cruzada a partir del tracto digestivo y el ambiente. Otro factor adicional que contribuye a la presencia de enterococos en alimentos es la elevada capacidad de esta bacteria para soportar condiciones ambientales adversas y proliferar en sustratos ricos en proteínas y otros nutrientes de origen animal. Todo ello hace que los enterococos lleguen a desempeñar un papel importante en determinados alimentos, como son muchos tipos de quesos de la región Mediterránea. No obstante, y debido a su potencial patógeno, los enterococos no están incluidos entre los grupos de bacterias lácticas consideradas como “presuntamente seguras” por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Por consiguiente, el riesgo potencial de las cepas de enterococos presentes en un determinado tipo de alimento debe ser estudiado de forma particular, determinando como riesgo no sólo la presencia de factores de virulencia, sino también la capacidad de actuar como transmisores de genes de resistencia a antimicrobianos.

El objetivo de este trabajo ha sido determinar la incidencia de resistencia a antimicrobianos en poblaciones de enterococos poco estudiadas hasta la fecha en alimentos tales como queso, carne, pescado y mariscos. También es importante establecer relaciones entre los diferentes habitats, la presencia de enterococos, y la frecuencia de cepas multirresistentes a antimicrobianos.

**Tabla 1.** Especies descritas dentro del género *Enterococcus*.

<b>Especie</b>	<b>Especie</b>
<i>Enterococcus faecalis</i> (8)	<i>Enterococcus haemoperoxidus</i> (21)
<i>Enterococcus faecium</i> (8)	<i>Enterococcus moraviensis</i> (21)
<i>Enterococcus durans</i> (9)	<i>Enterococcus porcinus</i> (22)
<i>Enterococcus malodoratus</i> (9)	<i>Enterococcus ratti</i> (22)
<i>Enterococcus avium</i> (9)	<i>Enterococcus villorum</i> (23)
<i>Enterococcus casseliflavus</i> (9)	<i>Enterococcus gilvus</i> (24)
<i>Enterococcus gallinarum</i> (9)	<i>Enterococcus pallens</i> (24)
<i>Enterococcus hirae</i> (10)	<i>Enterococcus canis</i> (25)
<i>Enterococcus mundtii</i> (11)	<i>Enterococcus phoeniculicola</i> (26)
<i>Enterococcus cecorum</i> (12)	<i>Enterococcus hermannienseis</i> (27)
<i>Enterococcus pseudoavium</i> (13)	<i>Enterococcus italicus</i> (28)
<i>Enterococcus raffinosus</i> (13)	<i>Enterococcus saccharominimus</i> (29)
<i>Enterococcus solitarius</i> (13)	<i>Enterococcus aquimarinus</i> (30)
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> (14)	<i>Enterococcus canintestini</i> (31)
<i>Enterococcus dispar</i> (15)	<i>Enterococcus devriesei</i> (32)
<i>Enterococcus seriolicida</i> (16)	<i>Enterococcus caccae</i> (33)
<i>Enterococcus sulfureus</i> (17)	<i>Enterococcus silesiacus</i> (34)
<i>Enterococcus flavescens</i> (18)	<i>Enterococcus termitis</i> (34)
<i>Enterococcus columbae</i> (19)	<i>Enterococcus camelliae</i> (35)
<i>Enterococcus asini</i> (20)	<i>Enterococcus thailandicus</i> (36)

**Tabla 2.** Resistencia intrínseca y adquirida de *Enterococcus* a los antibióticos.

<b>Resistencia intrínseca</b>	<b>Resistencia adquirida</b>
Bajo nivel a betalactámicos: penicilina, ampicilina y piperacilina	Resistencia de alto nivel a betalactámicos
Cefalosporinas	Resistencia de alto nivel a aminoglucósidos
Penicilinas resistentes a penicilinasas:	Glicopéptidos
oxacilina, dicloxacilina	Eritromicina
Clindamicina	Tetraciclinas
Trimetoprim/sulfametoxazol	Fluorquinolonas
Bajo nivel a aminoglucósidos	Rifampicina
	Cloranfenicol
	Rifampicina
	Nitrofurantóina

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Aislamiento de las diferentes cepas de *Enterococcus*

*Preparación de las muestras.* Las diferentes muestras de alimentos fueron depositadas en bolsas de polipropileno estériles bajo condiciones asépticas, y adicionadas de nueve partes de diluyente estéril (NaCl al 0,85% en agua destilada) por cada parte de muestra. Las mezclas fueron homogeneizadas en un triturador de alimentos modelo Stomacher 400 durante 60 segundos a una velocidad intermedia, obteniéndose de este modo las suspensiones madre para los diferentes alimentos. A partir de las suspensiones de alimento se transfirieron 0,5 ml a tubos que contenían 4,5 ml de medio selectivo de Rothe, que fueron posteriormente incubados a 37°C durante 24 h. A partir de los tubos donde se había obtenido crecimiento, se transfirieron 50 µl a un tubo que contenía 2 ml de medio de Litsky. Tras 24 h de incubación a 37°C se observó la presencia de crecimiento, que aparecía depositado en el fondo y con una coloración violeta-azulada.

Los cultivos positivos obtenidos en este segundo medio fueron diseminados, mediante asa de siembra, en placas que contenían agar de Slanetz-Bartley. Tras 24 h de incubación a 37°C se aislaron aquellas colonias que mostraban un color rosáceo o rojizo, y se sembraron en tubos en pico de flauta para su posterior estudio.

### Identificación de las cepas aisladas mediante la reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la extracción de ADN se empleó el método descrito por De Los Reyes-Gavilan *et al.* (37). La determinación de la concentración de ADN se llevó a cabo mediante medida de la absorbancia, siguiendo el método descrito por Sambrook *et al.* (38). Para identificar las cepas aisladas mediante PCR se emplearon los cebadores adecuados (E<sub>1</sub> E<sub>2</sub> para *E. faecalis*, y F<sub>1</sub> F<sub>2</sub> para *E. faecium*). Para la identificación de las cepas aisladas mediante secuenciación del ADN 16S se empleó el método descrito por Cibik *et al.* (39).

### Determinación de la sensibilidad a antibióticos

Este ensayo se realizó empleando galerías ATB ENTEROC 5 (BioMérieux), que permiten determinar la sensibilidad a un total de 14 antibióticos en medio semi-sólido (Tabla 3). Los microorganismos a analizar fueron cultivados en medio MRS o BHI durante 6-8 horas a 37°C (hasta alcanzar una densidad celular aproximada de 0,5 según la escala de MacFarland). A partir de dichos cultivos se adicionaron 200 µl al vial de medio ATB S (suministrado por el fabricante). La mezcla fue homogeneizada mediante una pipeta estéril, evitando la formación de burbujas. La suspensión obtenida en medio ATB S fue utilizada para la inoculación de la galería, a razón de 135 µl por cada cúpula (alrededor de 5x10<sup>5</sup> bacterias/ cúpula). Tras 18-24 horas de incubación, se realizó la lectura del crecimiento de forma visual observando la turbidez.

**Tabla 3.** Concentración de los distintos antibióticos utilizados.

Abreviatura	Antibiótico	Concentración (mg/l)
PEE	Penicilina	8
AMPE	Ampicilina	8
ERY	Eritromicina	0,5-4
TET	Tetraciclina	4-8
CMP	Cloranfenicol	8-16
RFA	Rifampicina	1-2

CIP	Ciprofloxacina	1-2
LVX	Levofloxacina	2-4
VAN	Vancomicina	4-16
TEC	Teicoplanina	8-16
FUR	Nitrofurantoína	32-64
GEH	Gentamicina	500
STH	Estreptomina	1000
QDA	Quinupristina-Dalfopristina	1-2

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los enterococos han atraído una gran atención en los últimos años como una causa importante de infecciones nosocomiales debido al aumento de su resistencia a gran variedad de agentes antimicrobianos. En este estudio se determinó la incidencia de la presencia de resistencia a antibióticos en cepas de enterococos aisladas de pescado, mariscos, queso y carne. En relación al estudio de la presencia de enterococos en diferentes tipos de pescado y mariscos crudos adquiridos en supermercados, la mayoría de las muestras positivas para enterococos correspondieron a filetes de pescado, encontrándose también algunos aislados en almejas y en intestino de pescado. Todos los aislados fueron identificados como *E. faecium*. Hay escasos trabajos sobre la incidencia de enterococos en pescado y mariscos, aunque, *E. faecium* parece ser la especie predominante (40, 41, 42).

Respecto a la sensibilidad a antibióticos, la mitad de las cepas de *E. faecium* fueron resistentes a nitrofurantoína, un tercio a eritromicina y rifampicina, y en menores proporciones a quinupristina/dalfopristina, ciprofloxacina y levofloxacina (figura 1). Ninguno de los aislados ensayados mostró resistencia a ampicilina, penicilina, tetraciclina, cloranfenicol, vancomicina, teicoplanina, gentamicina o estreptomina. Un aislado fue resistente a eritromicina, nitrofurantoína y quinupristina/dalfopristina. Se detectó resistencia simultánea a eritromicina y nitrofurantoína en varios aislados. Por el contrario, ninguna cepa mostró resistencia a vancomicina, aunque otros estudios han detectado enterococos resistentes a vancomicina en mariscos (43).

La resistencia a antibióticos detectada en enterococos procedentes de pescado y mariscos del presente estudio suscita preguntas sobre el origen de los genes de resistencia. Como es bien sabido, los enterococos son intrínsecamente resistentes a un amplio rango de agentes antimicrobianos; esto ha limitado siempre las opciones de tratamiento frente a estos organismos. A causa del aumento mundial de la incidencia de los enterococos como patógenos en infecciones nosocomiales, los antimicrobianos

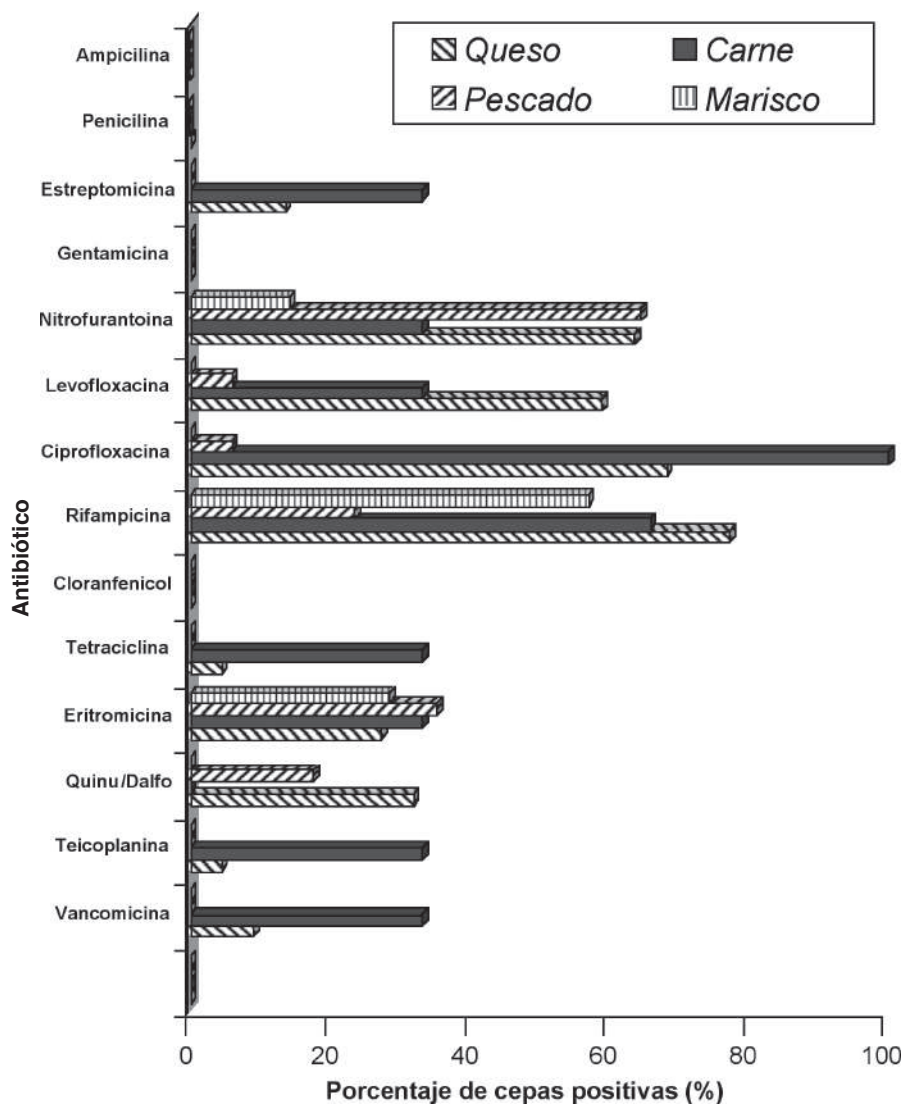


han sido utilizados en mayor frecuencia en hospitales. Además, los mismos agentes antimicrobianos se han utilizado ampliamente como promotores de crecimiento en la cría de animales, por tanto, los enterococos han adquirido genes de resistencia (en plásmidos o transposones) procedentes de otros organismos, o mediante mutaciones espontáneas que les confieren un nivel añadido de resistencia. Es posible que bacterias fecales resistentes a antibióticos de aguas residuales domésticas vertidas al mar puedan transferir sus determinantes de resistencia a antibióticos a la microbiota autóctona de pescado, provocando su diseminación y prevalencia en el ambiente marino. Sewart y Koditschek (44) observaron que la resistencia a  $\beta$ -lactámicos podía ser debida a la diseminación de plásmidos con resistencia a antibióticos en el ambiente marino. La diseminación de caracteres de resistencia a antibióticos en acuicultura es de una preocupación considerable (45, 46). Recientemente, se ha visto que los plásmidos de resistencia a antibióticos pKL10018 del patógeno de pescado *Lactococcus garviae* y pRE25 de *E. faecalis* (aislado de embutidos) son altamente homólogos y tienen un amplio rango de hospedador, lo cual hace que pudieran diseminar en su entorno elementos genéticos móviles que contengan genes de resistencia a antibióticos (47).

En cuanto a las cepas aisladas de queso y carne los resultados obtenidos indicaron perfiles de resistencia bastante diferentes entre las diferentes cepas aisladas (figura 1). Los enterococos aislados revelaron una elevada incidencia de resistencia a rifampicina, ciprofloxacina, levofloxacina y nitrofurantoina en este último, siendo solo dos aislados sensibles a todos los antibióticos probados.

La incidencia de resistencia a tetraciclina y eritromicina en los aislados de carne fue bastante superior que en los aislados de queso. Los plásmidos y transposones portadores de resistencia a eritromicina son frecuentes en enterococos (48). La resistencia a tetraciclina ha sido observada con frecuencia entre enterococos aislados de diferentes fuentes (49, 50, 51), habiéndose descrito varios mecanismos de resistencia, incluyendo bombas de exporte [*tet*(K), *tet*(L)], proteínas de protección ribosómica [*tet*(M), *tet*(O), *tet*(S)], y otros [*tet*(U)] (52). La resistencia mediada por *tet*(M) fue descrita como la más frecuente (49), ya que este determinante podía ser diseminado mediante transposones del tipo Tn916. Sin embargo, en un estudio más reciente el determinante más frecuente responsable de la resistencia a tetraciclina fue *tet*(L) (52). Los determinantes genéticos responsables de la resistencia a tetraciclina en los aislados correspondientes al presente estudio deben ser estudiados, a fin de evaluar su transmisibilidad mediante elementos genéticos móviles.

Otro antibiótico de interés, debido a su importancia clínica, es la vancomicina. En el presente trabajo, una cepas de *E. faecalis* aislada de carne y dos de *E. faecium*



**Figura 1.** Incidencia de la resistencia a antimicrobianos en cepas de *E. faecalis* y *E. faecium* aisladas de alimentos (queso, carne, pescado y marisco).

aisladas de queso mostraron resistencia a vancomicina, solo las dos cepas de *E. faecium* mostraron también resistencia a teicoplanina. Un estudio reciente sugiere que el fenotipo predominante de resistencia a vancomicina (VanA) tanto en aislados clínicos de humanos y animales, como en aislados lácteos, no ocurre por diseminación clonal de cepas resistentes, sino más bien por transferencia del gen *vanA* mediante elementos

genéticos transponibles, como el Tn1546 (53). Esto podría ser, probablemente, el caso de las tres cepas de enterococos resistentes a vancomicina aisladas de alimentos.

Todas las cepas de enterococos aisladas de queso y carne (tanto de *E. faecalis* como de *E. faecium*) fueron sensibles a ampicilina, penicilina, gentamicina y cloranfenicol. Algunos aislados mostraron resistencias múltiples, como por ejemplo la resistencia a eritromicina, rifampicina, ciprofloxacina, levofloxacina, nitrofurantoina, furantoinina y quinupristina/dalfopristina en *E. faecalis*. Un aislado resistente a vancomicina, fue también resistente a eritromicina, tetraciclina, rifampicina, estreptomina y quinupristina/dalfopristina.

En conclusión, la incidencia de resistencias a antimicrobianos en cepas de enterococos procedentes de queso y carne es elevada, siendo también frecuente la presencia de cepas multiresistentes. Las cepas de enterococos procedentes de pescado y marisco presentan una frecuencia menor de resistencia a antimicrobianos. Sin embargo, pensamos que el riesgo de los enterococos debe ser interpretado como una suma de varios factores de virulencia así como de resistencia a antimicrobianos. Por esta razón, es muy importante realizar otros estudios para analizar el número de factores de virulencia encontrados por cada cepa.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Deibel, R.H., J.H. Silliker. 1963. Food poisoning potential of the enterococci. *J. Bacteriol.* 85: 827-832.
2. Deibel, R.H. 1964. The group D streptococci. *Bacteriol. Rev.* 28: 330-366.
3. Fariñas, M.C., C. Torres. 2007. Enterococo ¿un patógeno emergente en nuestros hospitales? *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 25: 500-502.
4. Malani, P.N., C.A. Kauffman, M.J. Zervos. 2002. Enterococcal disease, epidemiology, and treatment. In: Gilmore, M.S., D.B. Clewell, P. Courvalin, G.M. Dunny, B.E. Murray, L.B. Rice, (Eds.). The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. ASM Press, Washington, D.C., p. 385-408.
5. Conde-Estevez, D. Sorli, L., Morales-Molina, J.A., Knobel, H., Terradas, R., Mateu-DeAntonio, J., Pablo Horcajada, J., Grau, S. 2010. Características clínicas diferenciales entre las bacteriemias por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. In press.
6. Woodford, N., Johnson, A., Morrison, D., Speller, D.C. 1995. Current perspectives on glycopeptide resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8(4): 585-615.
7. McKessar, S.J., Berry, A.M., Bell, J.M., Turnidge, J.D., Paton, J.C. 2000. Genetic characterization of vanG, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(11): 3224-8.
8. Schleifer, K.H., R. Kilpper-Bälz. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 31-34.

9. Collins, M.D., D. Jones, J.A.E. Farrow, R. Kilpper-Balz, K.H. Schleifer. 1984. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov., *E. gallinarum* comb. nov., and *E. malodoratus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 220-223.
10. Farrow, J.A.E., M.D. Collins. 1985. *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35: 73-75.
11. Collins, M.D., J.A.E. Farrow, D. Jones. 1986. *Enterococcus mundtii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36: 8-12.
12. Williams, A.M., J.A.E. Farrow, M.D. Collins. 1989. Reverse transcriptase sequencing of 16s ribosomal RNA from *Streptococcus cecorum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 8: 185-189.
13. Collins, M.D., R.R. Facklam, J.A.E. Farrow, R. Williamson. 1989b. *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* 48: 283-288.
14. Rodrigues, U., M.D. Collins. 1991. Phylogenetic analysis of *Streptococcus saccharolyticus* based on 16S rRNA sequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* 71: 231-234.
15. Collins, M.D., U.M. Rodrigues, N.E. Pigott, R.R. Facklam. 1991. *Enterococcus dispar* sp. nov., a new *Enterococcus* species from human sources. *Lett. Appl. Microbiol.* 12: 95-98.
16. Kusuda, R., K. Kawai, F. Salati, C.R. Banner, J.L. Fryer. 1991. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 406-409.
17. Martínez-Murcia, A.J., M.D. Collins. 1991. *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 80: 69-74.
18. Pompei, R., F. Berlutti, M.C. Thaller, A. Ingianni, G. Cortis, B. Dainelli. 1992. *Enterococcus flavescens* sp. nov., a new species of enterococci of clinical origin. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 365-369.
19. Devriese, L.A., B. Pot, M.D. Collins. 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 399-408.
20. De Vaux, A., G. Laguerre, C. Diviès, H. Prévost. 1998. *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 383-387.
21. Svec, P., L.A. Devriese, I. Sedlacek, M. Baele, M. Vancanneyt, F. Haesebrouck, J. Swings, J. Doskar. 2001. *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., new species isolated from water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1567-1574.
22. Teixeira, L.M., M.G. Carvalho, M.M.B. Espinola, A.G. Steigerwalt, M.P. Douglas, D.J. Brenner, R.R. Facklam. 2001. *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov. associated with enteric disorders in animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1737-1743.
23. Vancanneyt, M., C. Snauwaert, I. Cleenwerck, M. Baele, P. Descheemaeker, H. Goossens, B. Pot, P. Vandamme, J. Swings, F. Haesebrouck, L.A. Devriese. 2001. *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 393-400.
24. Tyrrell, G.J., L. Turnbull, L.M. Teixeira, J. Lefebvre, M.G. Carvalho, R.R. Facklam, M. Lovgren. 2002. *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1140-1145.
25. De Graef, E.M., L.A. Devriese, M. Vancanneyt, M. Baele, M.D. Collins, K. Lefebvre, J. Swings, F. Haesebrouck. 2003. Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a later synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al. 2001. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1069-1074.
26. Law-Brown, J., P.R. Meyers. 2003. *Enterococcus phoeniculicola* sp. nov., a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 683-685.

27. Koort, J., T. Coenye, P. Vandamme, A. Sukura, J. Björkroth. 2004. *Enterococcus hermanniensis* sp. nov. from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1823-1827.
28. Fortina, M.G., G. Ricci, D. Mora, P.L. Manachini. 2004. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1717-1721.
29. Vancanneyt, M., M. Zamfir, L.A. Devriese, K. Lefebvre, K. Engelbeen, K. Vandemeulebroecke, M. Amar, L. De Vuyst, F. Haesebrouck, J. Swings. 2004. *Enterococcus saccharominimus* sp. nov. from dairy products. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 2175-2179.
30. Svec, P., M. Vancanneyt, L.A. Devriese, S.M. Naser, C. Snauwaert, K. Lefebvre, B. Hoste, J. Swings. 2005b. *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 2183-2187.
31. Naser, S.M., M. Vancanneyt, E. de Graef, L.A. Devriese, C. Snauwaert, K. Lefebvre, B. Hoste, P. Svec, A. Decostere, F. Haesebrouck, J. Swings. 2005. *Enterococcus canintestini* sp. nov. from faecal samples of healthy dogs. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 2177-2182.
32. Svec, P., M. Vancanneyt, J. Koort, S.M. Naser, B. Hoste, E. Vihavainen, P. Vandamme, J. Swings, J. Björkroth. 2005a. *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 2479-2484.
33. Carvalho, M.G.S., P.L. Shewmaker, A.G. Steigerwalt, R.E. Morey, A.J. Sampson, K. Joyce, T.J. Barrett, L.M. Teixeira, R.R. Facklam. 2006. *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1505-1508.
34. Svec, P., M. Vancanneyt, I. Sedlacek, S.M. Naser, C. Snauwaert, K. Lefebvre, B. Hoste, J. Swings. 2006. *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 577-581.
35. Sukontasing, S., S. Tanasupawat, S. Moonmangmee, J.S. Lee, K. Suzuki. 2007. *Enterococcus camelliae* sp. nov. isolated from fermented tea leaves in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2151-2154.
36. Tanasupawat, S., S. Sukontasing, J.S. Lee. 2008. *Enterococcus thailandicus* sp. nov. isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1630-1634.
37. De los Reyes-Gavilán, C.G., G.K. Limsowtin, P. Tailliez, L. Sechaud, J.P. Accolas. 1992. A *Lactobacillus helveticus*-specific DNA probe detects restriction fragment length polymorphisms in this species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3429-3432.
38. Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 1659.
39. Cibik, R., Lepage, E., Tailliez, P. 2000. Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* isolated from traditional French cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification. *System Appl. Microbiol.* 23: 267-278.
40. Campos, C.A., O. Rodriguez, P. Calo-Mata, M. Prado, J. Barros-Velazquez. 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Res. Int.* 39: 356-364.
41. Tomé, E., V.L. Pereira, C.I. Lopes, P.A. Gibbs, P.C. Teixeira. 2008. In vitro tests of suitability of bacteriocin-producing lactic acid bacteria, as potential biopreservation cultures in vacuum-packaged cold-smoked salmon. *Food Control.* 19: 535-543.
42. Al Bulushi, I.M., S.E. Poole, R. Barlow, H.C. Deeth, G.A. Dykes. 2010. Speciation of Gram-positive bacteria in fresh and ambient-stored sub-tropical marine fish. *Int. J. Food Microbiol.* 138: 32-38.
43. Wilson, I.G., G.G. McAfee. 2002. Vancomycin-resistant enterococci in shellfish, unchlorinated waters, and chicken. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 143-151.
44. Stewart, K.R., L. Koditschek. 1980. Drug resistance transfer in *Escherichia coli* in New York Bight. *Marine Pollution Bulletin.* 5: 71-74.

45. Smith, P. 2008. Antimicrobial resistance in aquaculture. *Ver. Sci. Tech.* 27: 243-264.
46. Sapkota, A., A.R. Sapkota, M. Kucharski, J. Burke, S. McKenzie, P. Walker, R. Lawrence. 2008. Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. *Environ. Int.* 34: 1215-1226.
47. Maki, T., M.D. Santos, H. Kondo, I. Hirono, T. Aoki. 2009. A transferable 20-kilobase multiple drug resistance-conferring R plasmid (pKL0018) from a fish pathogen (*Lactococcus garvieae*) is highly homologous to a conjugative multiple drug resistance-conferring enterococcal plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3370-3372.
48. Murray, B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 46-65.
49. Aarestrup, F.M. 2000. Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. *APMIS Supplement.* 101: 1-48.
50. Butaye, P., K. Van Damme, L.A. Devriese, L. Van Damme, M. Baele, S. Lauwers, F. Haesebrouck. 2000. In vitro susceptibility of *Enterococcus faecium* isolated from food to growth-promoting and therapeutic antibiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 54: 181-187.
51. Pavia, M., C.G. Nobile, L. Salpietro, I.F. Angelillo. 2000. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *J. Food Protect.* 63: 912-915.
52. Hummel, A., W.H. Holzapfel, C.M.A.P. Franz. 2007. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst. Appl. Microbiol.* 30: 1-7.
53. Ribeiro, T., M. Abrantes, M.F. Silva Lopes, M.T. Barreto Crespo. 2007. Vancomycin-susceptible dairy and clinical enterococcal isolates carry *vanA* and *vanB* genes. *Int. J. Food Microbiol.* 113: 289-295.

# EN BUSCA DE LOS PRIMEROS EUROPEOS: EL EXCEPCIONAL REGISTRO FÓSIL DE ORCE (CUENCA DE GUADIX-BAZA, GRANADA) COMO VENTANA AL ESTUDIO DE LOS ECOSISTEMAS DE INICIOS DEL PLEISTOCENO EN LA EUROPA MERIDIONAL

PAUL PALMQUIST BARRENA<sup>1</sup>

**Abstract.** The chronology of the first dispersal of the genus *Homo* in Europe has been subjected to intense debate and controversy during the last two decades. Until the mid-nineties most paleoanthropologists believed that there was no conclusive evidence of permanent human settlements before 0.6-0.4 Ma (Mauer, Boxgrove), with most localities concentrating at 0.3-0.2 Ma (Arago, Petralona, Swanscombe, Steinheim, Atapuerca Sima de los Huesos). However, a number of new findings and the re-evaluation of the evidence available pointed to an earlier dispersal, suggesting that the first arrival of hominids in the Levantine Corridor and Southern Asia took place during late Pliocene times. In addition, there is growing evidence of an early colonization of Western Eurasia, including the fossil remains and lithic tools from Atapuerca TD-6 and Sima del Elefante in NW Spain (both placed below the Bruhnes-Matuyama magnetic reversal, with an age tentatively estimated in 0.8 and 1.2-1.1 Ma, respectively), the archaeological evidence from Fuente Nueva and Barranco León in the Orce area, SE Spain (1.4-1.3 Ma) and, specially, the impressive paleoanthropological record from Dmanisi in the Caucasus (1.77 Ma). The use of combined biogeochemical and ecomorphological approaches has provided an emerging view of the early Pleistocene fauna from Western Europe, making possible to derive inferences on the dietary regimes, habitat preferences and ecological interactions of the large mammals

---

<sup>1</sup> Catedrático de Paleontología de la Universidad de Málaga  
Departamento de Ecología y Geología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, Campus Universitario de Teatinos, 29071-Málaga. Telf.: 952 132002, Fax: 952 137386, Correo electrónico: [ppb@uma.es](mailto:ppb@uma.es)



that composed the community inhabited by the hominids. These studies, developed in the Lower Pleistocene assemblage from Venta Micena (Guadix-Baza basin, Granada), have allowed reconstructing the paleoecological and environmental scenario of the first human dispersal from Africa.

**Keywords:** paleoanthropology, lithic assemblages, large mammal fauna, first human dispersal in Europe.

**Resumen.** La cronología de la primera dispersión del género *Homo* en Europa se ha visto sometida a un debate intenso durante las dos últimas décadas. Así, hasta mediados los noventa la mayoría de los paleoantropólogos pensaba que no existían evidencias concluyentes sobre asentamientos humanos permanentes antes de 0,6-0,4 Ma (Mauer, Boxgrove), con la mayoría de las localidades concentrándose en torno a 0,3-0,2 Ma (Arago, Petralona, Swanscombe, Steinheim, Sima de los Huesos de Atapuerca). Sin embargo, una serie de hallazgos y la reevaluación de las evidencias disponibles han venido a indicar una dispersión anterior, al sugerir que la llegada de los homínidos al corredor levantino y el sur de Asia tuvo lugar a finales del Plioceno. Además, no deja de crecer el número de evidencias que apuntan a una colonización temprana del margen occidental de Eurasia, entre ellas los restos fósiles y asociaciones líticas del nivel TD-6 de Gran Dolina y el yacimiento de Sima del Elefante, ambos en Atapuerca (situados bajo la inversión magnética Bruhnes-Matuyama, con una edad estimada en 0,8 y 1,2-1,1 Ma, respectivamente), las evidencias arqueológicas recuperadas en dos localidades de Orce, Fuente Nueva y Barranco León, en el sureste de España (1,4-1,3 Ma) y, especialmente, el impresionante registro paleoantropológico de Dmanisi en el Caucaso (1,77 Ma). El uso combinado de métodos biogeoquímicos y ecomorfológicos ha proporcionado una imagen emergente sobre la fauna del Pleistoceno inferior de Europa occidental, posibilitando deducir inferencias sobre el régimen trófico, las preferencias de hábitat y las interacciones ecológicas entre las especies de grandes mamíferos que conformaban la comunidad en la que se asentaron estas primeras poblaciones humanas. Tales estudios, desarrollados en la asociación fósil de Venta Micena (cuena de Guadix-Baza, Granada), han permitido reconstruir el escenario paleoecológico y ambiental en el que tuvo lugar la primera dispersión humana desde África.

**Keywords:** paleoantropología, asociaciones líticas, fauna de grandes mamíferos, primera dispersión humana en Europa.



Durante las dos últimas décadas ha tenido lugar un debate intenso sobre el momento en que se produce la primera dispersión del género humano desde el continente natal africano hacia Europa. Así, hasta mediada la década de los noventa la mayor parte de los prehistoriadores eran partidarios de que los primeros asentamientos europeos no habrían tenido lugar antes de seiscientos o quinientos mil años atrás (600-500 ka), fechas documentadas en localidades como Aragón (Francia), Boxgrove (Reino Unido) o Maüer (Alemania), situándose la mayor parte de las evidencias en torno a 300 ka, la edad de la Sima de los Huesos de Atapuerca, yacimiento que ha suministrado más del 90% del registro paleoantropológico mundial para el Pleistoceno medio. No obstante, una serie de evidencias disponible desde los noventa permitían anticipar una colonización más temprana de Eurasia, entre ellas las dataciones absolutas de ciertos fósiles javaneses, como los cráneos de Modjokerto y Sangiran, con una edad de 1,8-1,6 millones de años (Ma), o los restos humanos e industrias líticas recuperados en Dmanisi (Georgia), fechados en 1,77 Ma, a los que se les sumarían los descubiertos en diversos yacimientos de la sierra burgalesa de Atapuerca, como Gran Dolina (>800 ka) y Sima del Elefante (1,2-1,1 Ma), o las evidencias arqueológicas provenientes del sector Orce-Venta Micena en el borde nororiental de la cuenca intramontañosa de Guadix-Baza, en Granada (1,4-1,3 Ma). Tales hallazgos, en particular los efectuados en Dmanisi, localidad caucásica situada a las puertas de Europa, forzaron un cambio de opinión en los investigadores que defendían una cronología más tardía para los primeros asentamientos humanos en la ribera norte del área circunmediterránea, de forma que comenzó a emerger un elevado grado de consenso en torno a una primera dispersión del género *Homo* hacia Europa a comienzos de la época Pleistocena o, incluso, a finales del Plioceno.

Hasta el momento, las discusiones sobre este importante evento se circunscriben en torno a la cronología de las localidades que conservan este importante registro paleoantropológico o al tipo humano implicado en la dispersión (es decir, a quién se puede calificar con propiedad como “el primer europeo”), así como en aspectos tecnoculturales, relacionados con el modo de talla de las industrias líticas documentadas en estos yacimientos, temas en los que tanto Atapuerca como Dmanisi aportan información de primera mano. En cambio, se han dejado de lado otras cuestiones relevantes en la discusión, como el escenario biogeográfico, el contexto ambiental y el marco ecológico en el que tuvo lugar la primera salida del género *Homo* de África, aspectos en los que resulta clave la contribución de los estudios realizados en Orce. A esta problemática se le sumarían otros enfoques, como las adaptaciones ecológicas y fisiológicas que facilitarían la expansión del rango de distribución de los representantes más tempranos de nuestro género, las posibles rutas de dispersión que habrían

seguido estas poblaciones de homínidos y su continuidad en Europa, tanto espacial como temporal.

#### DMANISI: PRIMERAS POBLACIONES HUMANAS A LAS PUERTAS DE EUROPA

Las excavaciones efectuadas bajo el enclave medieval de Dmanisi, próximo a Tbilisi, han suministrado diversos restos humanos, asociados a abundantes útiles líticos de tipología preolduvayense y una fauna fósil de grandes mamíferos de edad villafranquiense (Plioceno superior-Pleistoceno inferior). La datación por el método  $^{40}\text{K}/^{40}\text{Ar}$  de los basaltos infrayacentes a los depósitos sedimentarios, cuya superficie no está meteorizada, suministró una edad de  $1,81 \pm 0.1$  Ma; el estudio de paleomagnetismo mostró que tanto el basalto como los niveles sedimentarios suprayacentes muestran polaridad positiva, mientras que el relleno de las fisuras que aparecen en estos últimos presenta polaridad negativa, por lo que la edad del yacimiento se situaría, dentro del cron Matuyama de polaridad inversa, hacia el techo del subcrón de polaridad normal Olduvai, en torno a 1,77 Ma. Al tratarse de las evidencias más antiguas conocidas por el momento sobre presencia humana a la entrada del continente europeo, el estudio de esta localidad reviste un interés especial.

El primer fósil exhumado en Dmanisi, en 1989, fue la rama horizontal de una mandíbula (D-211) con la dentición permanente completa, asociada a algunos elementos del esqueleto postcranial, industrias líticas y huesos de mamíferos con marcas de corte y evidencias de rotura por percusión. La mandíbula, relativamente grácil, presenta algunas características anatómicas modernas, como la ausencia de espacio retromolar, por lo que se asignó inicialmente a *Homo erectus*. Con ello, la edad del yacimiento se rebajó, de manera arbitraria, a sólo un millón de años, especulando con la posibilidad de depósitos diacrónicos en la asociación faunística, cuya edad es claramente anterior. No obstante, el fósil muestra características que lo asemejan a los representantes tempranos del género *Homo* en África, como el espécimen WT-15000 de *Homo ergaster*, entre ellas una secuencia decreciente de tamaño del primer al tercer molar. En 1999 se produjo un hallazgo espectacular en este yacimiento, al aparecer dos cráneos relativamente completos, que podrían corresponder a un macho y una hembra (ver Figura 1). Uno de ellos, bastante robusto, conserva sólo la bóveda (D-2282) y muestra una capacidad craneana reducida ( $775 \text{ cm}^3$ ). El otro (D-2280), de menor volumen endocraneal ( $655 \text{ cm}^3$ ) y deformado por compactación diagenética, es más grácil, conserva la región facial y se ha asociado a la mandíbula D211. La morfología de estos especímenes es similar a la de *H. ergaster*, aunque su capacidad craneana es más reducida, como en *H. habilis*. En 2001 se encontró un nuevo fósil, bastante completo

(D-2700, con una capacidad craneana de tan sólo 600 cm<sup>3</sup>), asociado a una mandíbula robusta y masiva (D-2735). El cráneo es prognato, con caninos bien desarrollados, características que recuerdan a *H. habilis*, y perteneció a un individuo joven, pues el tercer molar no había comenzado aún a erupcionar. Ese mismo año apareció también en el yacimiento una mandíbula muy robusta (D-2600), que podría ser a un ejemplar de sexo masculino (se ha asociado al cráneo D-2282), con la que se ha descrito una nueva especie, *H. georgicus*. Finalmente, en 2004 se descubrieron un cráneo de 625 cm<sup>3</sup> de capacidad y una mandíbula en conexión anatómica (D-3444/D-3900). Ambos carecen de dentición, salvo un canino inferior, mostrando una intensa reabsorción del tejido óseo mandibular, lo que indica que este individuo perdió los dientes en vida años antes de sobrevenirle la muerte. Dado que esta condición le imposibilitaría el masticar alimentos, cabe especular entonces con la posibilidad de que sus congéneres se los procesasen oralmente. Conviene recordar aquí que, antes de este descubrimiento, las evidencias más antiguas sobre cuidado de ancianos e individuos discapacitados se encontraban con los neandertales, como por ejemplo en el caso del cráneo del “viejo de La Chapelle”, de una antigüedad de “sólo” 60.000-50.000 años, en el que aparece un grado avanzado de reabsorción alveolar asociado a la pérdida de la mayor parte de los dientes. Por ello, el hallazgo de Dmanisi, con una cronología próxima a los dos millones de años, representa un cambio importante de paradigma en relación a la evolución de la sociabilidad en el linaje humano.

Las industrias de Dmanisi son similares a las encontradas en el este de África asociadas a *H. habilis* (Kada Gona, Lokalelei y Fejej, 2,55-1,95 Ma) o a las de los yacimientos de Orce, aunque en este caso están realizadas esencialmente en lava. Destacan la elevada proporción de cantos enteros o con extracciones aisladas, así como los residuos de talla. Algunos cantos muestran estigmas de percusión en una de sus caras, por lo que se habrían usado como yunques. Los núcleos muestran un grado débil de explotación de los soportes, con frecuentes planos de talla cortical en una sola cara. Las lascas, muy numerosas, tienen dimensiones reducidas. Algunos cantos, núcleos y lascas presentan estigmas de abrasión sobre su borde cortante, provocados por un uso intensivo. Tales características tecnopológicas permiten atribuir las industrias al horizonte cultural preolduvayense, caracterizable por la extracción de lascas de pequeñas dimensiones, que se usarían en estado bruto, y por la práctica ausencia de retoques, horizonte que aparece en África oriental hace 2,55 Ma, se encuentra a las puertas de Europa en Dmanisi en torno a 1,8 Ma y, posteriormente, en la franja meridional de Europa occidental hace 1,4 Ma en dos yacimientos de la región de Orce, Barranco León y Fuente Nueva-3, y sobre 1,1 Ma en Atapuerca Sima del Elefante y Le Vallonnet en Francia. Tales industrias son anteriores al horizonte cultural

olduvayense (el llamado Modo 1 de Clarke), definible por la presencia de un utillaje pequeño, retocado y estandarizado, que aparece en África del este hace 1,85 Ma y se constata en la Europa mediterránea (Atapuerca Gran Dolina en España, Isernia y Monte Poggiolo en Italia) en torno a 800 ka, así como a los útiles clasificables en el achelense o Modo 2 de talla, en el que se encuentran ya representados los bifaces, el cual hace irrupción en el registro africano hace 1,5 Ma (yacimiento de Konso Gardula, en Etiopía) y bastante más tarde en Europa, en torno a 0,6-0,5 Ma, asociado a las poblaciones de *H. heidelbergensis* del Pleistoceno medio.

Finalmente, conviene indicar que los estudios morfométricos sugieren que *H. georgicus* sería una forma intermedia entre los representantes tempranos africanos de nuestro género (*H. habilis*, *H. rudolfensis* y *H. ergaster*), diferente a los *H. erectus* asiáticos, lo cual resulta coherente con la edad de esta localidad y, de paso, contribuye a reabrir el debate sobre la validez taxonómica de tales especies, al encontrarse una variabilidad morfológica similar a la del conjunto en un único yacimiento. Por otra parte, un estudio reciente del esqueleto juvenil asociado al cráneo y la mandíbula D2700/2735, junto a diversos huesos largos de tres individuos adultos, ha permitido constatar que *H. georgicus* presentaba un mosaico de características primitivas y derivadas. Entre las primeras se encontrarían el pequeño tamaño corporal, la baja encefalización y la ausencia de torsión humeral; las segundas incluirían unas proporciones corporales ya parecidas a las de la humanidad actual y una morfología de los miembros inferiores indicativa de la capacidad de desplazarse largas distancias, similar a la de *H. ergaster*, que es la primera especie adaptada a los medios abiertos, con potencial para dispersarse desde el continente africano al resto del Viejo Mundo.

## LA ADAPTACIÓN A UNA DIETA CARNÍVORA COMO CLAVE DEL ORIGEN DEL GÉNERO HOMO Y DE LA PRIMERA DISPERSIÓN HUMANA FUERA DE ÁFRICA

El tracto digestivo de los primates presenta variaciones en función de su dieta, con un mayor desarrollo del intestino en las especies de alimentación herbívora. De hecho, en el caso de ciertos monos colobinos, como los langures, el estómago se encuentra compartimentado en una cámara anterior alcalina, que contiene bacterias celulolíticas, y una porción posterior ácida, similar a la de los cercopitecinos y los restantes primates, que muestran un estómago no dividido. Esta especialización, convergente con los rumiantes, les permite digerir de manera más eficiente la celulosa. Además, el ciego intestinal aparece más desarrollado en los primates folívoros que en los omnívoros, lo que les ayuda a asimilar los carbohidratos liberados al degradar

la celulosa; en cambio, en los humanos este apéndice está reducido y no es funcional desde el punto de vista digestivo (de hecho, llega a plantear serios problemas de salud en muchos individuos).

En este contexto, resulta interesante poner de manifiesto la posible conexión entre la adaptación a una dieta carnívora por parte de los representantes tempranos del género *Homo*, como requisito para colonizar las latitudes meridionales en las que el alimento vegetal es escaso durante la estación fría, y la evolución de la sociabilidad, evidenciada en Dmanisi por la supervivencia de un individuo sin capacidad de masticar. Entre las características que indican nuestra adaptación temprana a una dieta con mayor aporte de proteínas de origen animal que la de los grandes simios se encuentran la relación entre la longitud del intestino y la del cuerpo (5:1) o entre la superficie gastrointestinal y la corporal (0,8:1), más próximas a las de los grandes carnívoros (4-5:1 y 0,6:1, respectivamente) que a las de los primates de alimentación omnívora (8:1 y 1,1:1, respectivamente). Otra adaptación fisiológica es la absorción preferente del hierro de la hemoglobina frente al de la materia vegetal, así como el hecho de que los humanos hospedemos diversas especies de cestodos del género *Taenia*, parásitas también de carnívoros. Tales evidencias sugieren la adaptación temprana de nuestros antepasados al consumo de carne, lo que quizás se podría situar hacia el origen del propio género *Homo*, hace 2,5 Ma. De hecho, este tránsito hacia una dieta más carnívora parece haber desempeñado un papel relevante en el origen del género, favoreciendo el incremento de tamaño corporal y la expansión cerebral, el aumento de la sociabilidad, el desarrollo de la tecnología lítica y, en definitiva, la capacidad de dispersión fuera del continente africano, al propiciar el aumento del tamaño de los grupos y, con ello, de la superficie de territorio a prospectar en la búsqueda de recursos animales.

El tamaño relativo del encéfalo ( $M_{\text{cerebro}}$ ) frente a la masa corporal ( $M_{\text{corporal}}$ ) se puede estimar mediante el índice de encefalización (IE), que se calcula a partir de la siguiente ecuación:  $IE = M_{\text{cerebro}} \text{ (en g)} / [11,22 \times M_{\text{corporal}} \text{ (en kg)}^{0,76}]$ . Esta ecuación, ajustada con primates haplorrinos del Viejo Mundo, indica que nuestro cerebro es unas cinco veces mayor del esperable en un mono de nuestro tamaño. Si tomamos como referencia al conjunto de los mamíferos, la ecuación que permite comparar el tamaño del cerebro en relación al del cuerpo es la siguiente:  $IE = M_{\text{cerebro}} \text{ (en g)} / [0,12 \times M_{\text{corporal}} \text{ (en g)}^{0,67}]$  y nos indica que el encéfalo de *Homo sapiens* es unas siete veces mayor de lo que le correspondería a un mamífero de su masa. Finalmente, si usamos la ecuación ajustada sólo para los antropoides, excluido el género *Homo*,  $IE: M_{\text{cerebro}} \text{ (en g)} / [22,39 \times M_{\text{corporal}} \text{ (en kg)}^{0,72}]$ , se comprueba que nuestro encéfalo es unas tres veces mayor que el encontrado en simios de nuestras dimensiones. Dado el enorme coste

metabólico, en términos de consumo de glucosa, que representa el tejido nervioso para un animal, cabe plantearse qué ventaja adaptativa representó la expansión cerebral en el transcurso de la evolución humana. De hecho, la masa del cerebro representa sólo un 2,5% de la masa corporal de *Homo sapiens*, pero su consumo asciende al 22% de la tasa metabólica basal, mientras que en los grandes simios no supera el 8% del gasto energético. Por ello, el cerebro compite metabólicamente con otros órganos vitales, como el tracto digestivo, el corazón, los riñones y el hígado; el tamaño de los tres últimos no se puede reducir de manera significativa, obviamente, por lo que la economía energética llevó ineludiblemente a que las dimensiones del aparato digestivo en los humanos fuesen más propias de un carnívoro. Así, dado que nuestro cerebro es tres veces mayor de lo esperable en un simio antropomorfo, el peso del sistema digestivo representa sólo un 58% frente al esperado.

Este modelo, desarrollado por Aiello y Wheeler, se ha denominado como “*expensive tissue hypothesis*”. En su opinión, el desarrollo cerebral progresivo que caracteriza a la evolución humana estuvo ineludiblemente asociado a la adaptación progresiva a una dieta más carnívora, único recurso que podía satisfacer las elevadas necesidades energéticas de este órgano, el más exigente para el metabolismo animal. A su vez, el cambio en la dieta implicó, habida cuenta de nuestro legado evolutivo como primates, la necesidad de desarrollar una tecnología lítica adecuada para procesar estos recursos, como las lascas de sílex de borde cortante que permitían cortar la piel y la carne de los cadáveres de los ungulados, algo para lo que nuestra dentición se encuentra incapacitada, a diferencia de los grandes depredadores, que disponen de muelas carniceras secantes, o los bloques calizos, usados para fracturar por percusión los huesos largos a efectos de acceder al tuétano de su interior.

Por otra parte, la adaptación a una dieta más carnívora favoreció las posibilidades de dispersión del género *Homo* frente a las de otras especies de homínidos preexistentes (los australopitécinos gráciles) o contemporáneos (los australopitécinos robustos), pues el tamaño del territorio a prospectar en la búsqueda de recursos de origen animal se incrementó, al igual que probablemente también las dimensiones de los grupos familiares, lo que conllevaría la necesidad de relaciones sociales más elaboradas, como las evidenciadas por el individuo desdentado de Dmanisi, traduciéndose en un mayor potencial de dispersión. Además, tales recursos habría que defenderlos frente a otros carnívoros, debiendo elegirse lugares apropiados a los que transportar los cadáveres de los animales para procesarlos. Finalmente, la dieta carnívora, rica en grasas de origen animal con elevado rendimiento energético, permitió colonizar las latitudes templadas de Eurasia, donde en el transcurso de la estación invernal los recursos vegetales son escasos, ayudando a combatir el frío en una época en la que

todavía no se había conseguido el dominio del fuego. Por todo ello, no es contingente que la primera salida humana del continente africano se produzca precisamente tras la aparición del género *Homo*, como evidencia el registro de Dmanisi, y no antes, gracias a las innovaciones tecnológicas y la ampliación del ambiente explotable que supuso el cambio en la dieta.

Un ejemplo similar al del cráneo sin dientes de Dmanisi, que refuerza estos argumentos en favor del desarrollo de la sociabilidad con la dieta carnívora, es el representado por los hallazgos de licaones fósiles en el Pleistoceno inferior de Orce. En este caso, se trata de un cráneo y una mandíbula pertenecientes a un ejemplar adulto de la especie *Lycyon lycaonoides*, cuyas extremidades anteriores tetradáctilas la sitúan como ancestro de los lobos pintados africanos actuales. Este ejemplar presenta una fuerte asimetría bilateral, asociada a fenómenos de agenesia dental. En diversos carnívoros modernos, como el guepardo y el lobo gris, se ha comprobado que tales alteraciones resultan de la homocigosis genética, producto de la endogamia, por lo que este hallazgo permite efectuar inferencias sobre la paleodemografía de la especie que habitaba en la cuenca de Guadix-Baza. Así, se trataría de una pequeña población de cánidos hipercarnívoros, cuyo tamaño efectivo sería incluso más limitado si sólo se reproducían el macho y la hembra alfa de cada manada, como ocurre en los licaones modernos, población que estaría aislada en la cuenca de otras similares. Además, el hallazgo permite efectuar inferencias respecto a la evolución del altruismo y la sociabilidad en estos carnívoros, pues la carencia de un canino superior, entre otros dientes, incapacitaría para la caza a este individuo, cuya supervivencia probablemente se debió al apoyo prestado por el resto de la jauría.

## EL REGISTRO PALEOANTROPOLÓGICO Y ARQUEOLÓGICO DE EUROPA OCCIDENTAL

Los restos humanos e industrias preachelenses de la Gran Dolina de Atapuerca, en Burgos, suministran la información más precisa sobre los primeros pobladores de la Península Ibérica. Conforme a las dataciones por paleomagnetismo, el nivel más antiguo del yacimiento con evidencias paleoantropológicas (TD-6) muestra polaridad negativa; la presencia del arvicólido *Mimomys savini*, roedor característico del Galeariense, indicaría que estos depósitos cársticos se sitúan bajo la inversión magnética Bruhnes-Matuyama, a finales del Pleistoceno inferior, con una edad en torno a 800 ka. A partir de los restos fósiles de TD-6 se ha descrito una nueva especie humana, *H. antecessor*, que se interpreta como el último ancestro común de los “*sapiens*” arcaicos (*H. heidelbergensis*) y los neandertales (*H. neanderthalensis*). El holotipo de la nueva especie,



un maxilar de un ejemplar juvenil, muestra una morfología del hueso malar similar a la de la humanidad moderna. Un frontal de otro individuo, adulto y posiblemente de sexo femenino, muestra la frente huidiza y arcos supraorbitales marcados. Ahora bien, tras estos hallazgos se encontró en el yacimiento una mandíbula grácil, que presumiblemente perteneció a un individuo femenino, con características anatómicas inequívocas de *H. erectus*, como la ausencia de sínfisis mentoniana. En todo caso, un indicio muy interesante es que han aparecido en algunos fósiles del yacimiento marcas de descarnación producidas con útiles líticos, interpretadas en función de su antigüedad como evidencia de canibalismo gastronómico.

Otros restos fósiles europeos interesantes son la calota de Ceprano, encontrada en esta localidad próxima a Roma bajo arenas y gravas volcanoclásticas, datadas en 0,8 Ma por el método  $^{40}\text{K}/^{40}\text{Ar}$ , cuya anatomía permite clasificarla como de *H. erectus*, aunque presenta algunas características diferenciales respecto a los fósiles asiáticos de esta especie. Igualmente, una falange del yacimiento cartagenero de Cueva Victoria ha sido adscrita al género *Homo*, aunque un estudio anatómico comparativo reciente ha revelado que podría pertenecer al gelada extinto *Theropithecus oswaldi*.

Finalmente, las evidencias más antiguas de presencia humana en la margen occidental de Eurasia son las procedentes de los yacimientos arqueológicos del sector Orce-Venta Micena en la provincia de Granada, Fuente Nueva-3 y Barranco León, datadas por paleomagnetismo bajo el subcrón de polaridad normal Jaramillo (>1,07 Ma), consistentes en importantes asociaciones líticas asociadas a restos de fauna de grandes mamíferos con especies de origen africano, como el férido con dientes de sable *Megantereon whitei*, presente también en Dmanisi.

## TRASVASES FAUNÍSTICOS ENTRE ÁFRICA Y EURASIA EN EL LÍMITE PLIO-PLEISTOCENO: EL MARCO ECOLÓGICO DE LA PRIMERA DISPERSIÓN HUMANA

El estudio comparativo de las asociaciones fósiles de edad Villafranquiense con restos de grandes mamíferos de Europa, el corredor levantino y el Cáucaso muestra que la dispersión faunística afectó no sólo al género humano, pues en torno al límite Plio-Pleistoceno se producen importantes trasvases de especies entre África y Eurasia, con la llegada a Europa occidental de una serie de inmigrantes africanos y asiáticos, como los hipercarnívoros ya citados *M. whitei* y *L. lycaonoides*, la hiena gigante *Pachycrocuta brevirostris*, el gelada *T. oswaldi*, el ovibovino *Soergelia minor*, el équido *Equus altidens* o el megaherbívoro *Hippopotamus antiquus*. Es precisamente este reemplazamiento faunístico el que permite explicar la presencia de poblaciones humanas en nuestras



latitudes afines anatómicamente a los representantes africanos más tempranos del género *Homo*, poblaciones que continúan usando hasta bien entrado el Pleistoceno medio una tecnología lítica poco elaborada, el olduvayense, pese a que un modo de talla tecnológicamente más avanzado, el achelense, hace su irrupción en el registro arqueológico del África oriental en torno a 1,5 Ma y se encuentra ya en el corredor levantino a 1,4 Ma, según se evidencia en el yacimiento israelí de Ubeidiyah. En este contexto, el desfase de prácticamente un millón de años entre el recambio tecnológico en África y en Europa, donde las bifaces achelenses no aparecen antes de 0,6-0,5 Ma, tiene una posible explicación en la composición de las comunidades de grandes mamíferos en las que se insertaban las poblaciones humanas.

Tal y como evidencia el estudio de ciertas localidades africanas, como el FLK 22 *Zinjanthropus site* (1,76 Ma) de la garganta de Olduvai, las lascas, núcleos y *choppers* del olduvayense eran plenamente adecuadas para aprovechar los cadáveres de las presas unguladas de porte mediano a grande abandonadas por los macairodontinos, depredadores con dientes en forma de sable a los que su anatomía craneodental sumamente especializada les restringía al consumo de las vísceras y los paquetes musculares más delicados de sus presas. Ahora bien, hace 1,5 Ma se produce en África la extinción de los últimos félidos con dientes de sable, que son reemplazados por leones y leopardos como depredadores dominantes en los ecosistemas terrestres; dado que estos últimos serían capaces de aprovechar más a fondo los cadáveres de sus presas, en función de su dentición menos especializada, dicho factor pudo forzar el desarrollo del achelense. En Europa, en cambio, al sobrevivir los félidos con dientes de sable un millón de años más, momento en el que son sustituidos por los félidos panterinos africanos, se mantienen las condiciones ecológicas del continente austral, por lo que el recambio tecnológico no tiene lugar hasta ya entrado el Pleistoceno medio. Este último aspecto justifica el interés en el estudio de las asociaciones de grandes mamíferos del Pleistoceno inferior de la cuenca de Guadix-Baza, en particular la importante tafocenosis registrada en Venta Micena, yacimiento granadino que ha permitido efectuar inferencias detalladas sobre el marco ecológico y ambiental en el que se desarrollaron las primeras poblaciones humanas, así como las asociaciones líticas de la región, que suministran información sumamente precisa sobre sus capacidades tecnológicas.

## VENTA MICENA: UNA VENTANA EXCEPCIONAL PARA EL ESTUDIO DE LOS ECOSISTEMAS CONTINENTALES DE INICIOS DEL PLEISTOCENO

El yacimiento de Venta Micena se ubica en el borde nororiental de la cuenca intramontañosa de Guadix-Baza, en un paisaje de belleza insólita y agreste. Esta

importante cuenca postorogénica se encuentra rodeada por las sierras más altas de la Cordillera Bética, en el contacto entre sus zonas externas e internas. A finales del Mioceno se cierra su conexión con el mar por el corredor de Huércal-Overa y la cuenca pasa a ser endorreica, vertiendo sus aguas la red hidrográfica en un gran lago desplazado hacia el sector de Baza, lo que propicia el depósito de sedimentos carbonatados en un contexto palustre/lacustre y, con ello, el registro de las tafocenosis que conservan los restos de los vertebrados que habitaban en su entorno. A partir del Pleistoceno superior, momento en que las aguas del paleolago son capturadas por el Guadiana menor, la cuenca pasa a ser exorreica y, al bajar el nivel de base de los ríos, la erosión retrogradante, acelerada en este paisaje de *badlands*, excava profundas gargantas, como la cañada de Vélez, en la que se encuentran los principales yacimientos paleontológicos.

La superficie excavada en Venta Micena (320 m<sup>2</sup>) ha proporcionado una ingente asociación de fósiles, compuesta por casi 8000 elementos esqueléticos identificables, pertenecientes a un número mínimo de 302 individuos de 22 especies de mamíferos (excluidos roedores e insectívoros), así como unos 10,000 fragmentos óseos y astillas no determinables, que varían en tamaño desde premolares y falanges aisladas de pequeños carnívoros hasta mandíbulas de proboscídeos. Los restos de herbívoros dominan la asociación, tanto en número de especímenes identificables como en estimaciones de números mínimos de individuos.

Los huesos largos de Venta Micena no muestran alineaciones preferentes, lo que indica que no fueron depositados por el agua. La estratigrafía revela igualmente la ausencia de corrientes hidráulicas en el área de acumulación. La proporción de dientes aislados frente a vértebras y las frecuencias de huesos agrupados conforme a su potencial de dispersión por el agua son similares a las esperables en ausencia de selección hidrodinámica. Además, la superficie de los restos óseos está bien conservada, sin evidencias de abrasión ni pulido. El análisis de la meteorización cortical de los huesos indica un intervalo de tiempo muy corto de exposición subaérea antes del enterramiento, inferior a un año para la mayoría de los restos óseos, pues sólo un 10% presentan estrías longitudinales debidas a la insolación, sin desarrollar agrietamiento en mosaico de la cortical. Los huesos conservados completos muestran las cavidades internas huecas, sin rellenos geopetales de micrita, incluso en las zonas próximas a los forámenes nutricios, lo que evidencia su enterramiento en estado fresco, cuando se encontraban recubiertos todavía por el periostio. Las fracturas diagenéticas, muy abundantes, dejan siempre en conexión ambas porciones anatómicas, lo que pone de manifiesto la ausencia de reelaboración tafonómica.

El análisis de los patrones de mortandad deducidos para las especies de ungulados a partir de las proporciones de ejemplares con dentición de leche y permanente ha revelado que la mayor parte de los restos procedían de cadáveres carroñeados por las hienas a partir de presas cobradas selectivamente por los félidos con dientes de sable y los cánidos hipercarnívoros. Concretamente, la frecuencia en que están representadas en Venta Micena las especies de herbívoros por individuos con dientes de leche se relaciona inversamente con la masa corporal estimada para los ejemplares adultos. Habida cuenta de que en las poblaciones modernas de ungulados tal frecuencia no depende del tamaño de las especies, este hallazgo evidencia una selección de presas por los depredadores dominantes en estos ecosistemas de inicios del Pleistoceno, los félidos con dientes de sable *Homotherium latidens* y *M. whitei*, el jaguar europeo *Panthera gombaszoegensis* y el perro salvaje *L. lycaonoides*, selección particularmente acusada sobre los ejemplares jóvenes en el caso de las especies de herbívoros de mayor porte, como el hipopótamo *H. antiquus* o el proboscídeo *Mammuthus meridionalis*. Esta conclusión se ve reforzada por el hallazgo de numerosos especímenes fósiles que presentan osteopatologías, como procesos de artrosis en las epífisis distales de los metapodios, ribetes osteofíticos en los bordes de inserción muscular o recrecimientos óseos a nivel de la diáfisis. Tales patologías debieron restringir la capacidad locomotriz de los animales y, con ello, su capacidad de huida frente a los depredadores.

Aunque no hay datos disponibles en la bibliografía sobre la incidencia de estas patologías óseas en las poblaciones salvajes de ungulados, restringiéndose los informes puntuales a animales de zoológico o a restos recuperados en yacimientos arqueológicos, la proporción de restos patológicos observada en Venta Micena es significativa, lo que sugiere una selección de tales individuos por los depredadores. De hecho, aunque la incidencia de estas patologías sea relativamente baja, según se deduce de los escasos porcentajes de elementos anatómicos afectados, su representación no es en absoluto despreciable. Así, los metapodios de équidos afectados suponen un 3,7% del total, porcentaje que se cuatuplicaría si se traduce en la proporción de caballos con capacidad osteocomotriz restringida (en tanto en cuanto un ejemplar con una afección en una de sus extremidades ya se encontraría discapacitado funcionalmente), lo que eleva la cifra de ejemplares con tales deficiencias hasta casi un 15%. Por otra parte, se observa una incidencia diferencial para este tipo de anomalías en su distribución según elementos óseos de las extremidades delanteras y traseras, pues curiosamente se concentran en las extremidades posteriores, lo que quizás señale al hecho de que las que afectaban a los cuartos traseros comprometían más la locomoción del animal en su huida de los depredadores, pues en la mayoría de los mamíferos terrestres (a excepción de los proboscídeos) las extremidades posteriores desempeñan un papel más importante que las delanteras en la propulsión del cuerpo durante la carrera.

Por otra parte, tales osteopatologías están representadas en especies de ungulados de gran porte, como el caballo, el bisonte y el ciervo megacerino, cuyos principales depredadores serían presumiblemente los félidos con dientes de sable *H. latidens* y *M. whitei*, según sugieren los datos biogeoquímicos. En el caso de *Homotherium*, los valores de los índices braquial y crural (longitud del radio frente al húmero y de la tibia frente al fémur, respectivamente) indican que se trataba de un depredador con extremidades alargadas y relativamente gráciles, que abatía sus presas a la carrera en espacios despejados de árboles, mientras que *Megantereon* tenía miembros más cortos y robustos, cazando por emboscada en ambientes forestados. Por ello, dado el diferente comportamiento depredatorio de ambos macairodontinos, se puede concluir que este tipo de lesiones óseas incapacitaban a los animales sobre todo en el momento de emprender la huida, convirtiéndose así en el principal factor selectivo que propició su caza por estos depredadores (selección activa en el caso de *Homotherium*, al optar por los ejemplares rezagados, y pasiva en el de *Megantereon*, al disminuir sus posibilidades de escape en las emboscadas).

Por otra parte, la comparación de la abundancia de los ungulados distribuidos según clases de tamaño corporal con la mostrada por los ejemplares que cazan las hienas manchadas actuales y los que carroñean de las presas abatidas por otros depredadores, revela que en Venta Micena la hiena gigante *Pachycrocuta brevirostris*, el agente acumulador/modificador de la asociación ósea, estaba especializada en aprovechar los cadáveres de las presas cobradas por los hipercarnívoros, quizás ejerciendo un comportamiento cleptoparásito (esto es, arrebatándoles sus capturas, tal y como suelen hacer las hienas manchadas con las presas de los leones cuando los superan claramente en número). Habida cuenta de que hoy en día los ungulados abatidos por los carnívoros apenas representan un 10% de la mortandad en la población de presas, este hallazgo evidencia la estricta dependencia trófica de *Pachycrocuta* hacia los macairodontinos.

Las evidencias tafonómicas derivadas del análisis cuantitativo de la asociación revelan también que las hienas transportaron selectivamente los cadáveres de los ungulados y porciones anatómicas de los mismos hasta sus cubiles de cría, en función de la masa corporal de las especies. Así, en el caso de los herbívoros de menor porte, como caprinos y gamos, las estimaciones de números mínimos de individuos obtenidas a partir de la dentición adulta son mayores que las basadas en los números mínimos de elementos de las extremidades, lo que revela que sus cadáveres eran transportados completos hasta los cubiles, donde buena parte de los huesos del esqueleto apendicular eran fracturados para acceder a la médula ósea de su interior. En cambio, en las especies de mayor tamaño, como el caballo y el bisonte, se aprecia que pese a que un

70% de los huesos largos aparecen fracturados por las hienas, el número mínimo de individuos calculado con los porciones conservadas es sustancialmente mayor que el inferido a partir de los elementos del esqueleto craneal y axial, lo que muestra que las hienas desmembraban estos cadáveres y seleccionaban las porciones anatómicas más provistas de médula ósea para su consumo posterior en el seno de los cubiles (extremidades posteriores en el caso del caballo y cuartos delanteros en los bisontes). La excepción a este patrón es el gran ciervo megacerino, representado por números similares de cabezas y extremidades, debido a la costumbre de las hienas de transportar a sus cubiles las astas de los machos, ricas en tejidos hematopoyéticos y fases minerales para sus crías. Una vez en el seno de los cubiles, la fracturación de los restos esqueléticos por las hienas adultas era también altamente selectiva, conforme a su contenido en médula ósea y densidad mineral, conservándose mejor en el basurero circundante aquellas porciones óseas nutricionalmente menos atractivas. De todo ello se deduce que el comportamiento de esta especie, al menos en la cuenca de Guadix-Baza, era básicamente carroñero, actuando en solitario o en grupos pequeños, pues en caso contrario no se habrían conservado las evidencias de transporte selectivo, ya que un clan numeroso podría haber llevado la totalidad de los cadáveres a los cubiles tras su desmembramiento.

### FÉLIDOS CON DIENTES DE SABLE, HIENAS Y HOMININOS: EL MARCO ECOLÓGICO DE LAS PRIMERAS POBLACIONES EUROPEAS

Con un tamaño corporal un 20% mayor que el de la hiena manchada actual, *Crocuta crocuta*, y una masa estimada en 110 kg, similar a la de una leona, *P. brevirostris* fue el hiénido de mayores dimensiones que jamás haya existido, lo que le capacitaba para desmembrar eficientemente los cadáveres de los ungulados y fracturar sus huesos, tal y como evidencia el estudio tafonómico de Venta Micena, por lo que debió representar un serio competidor para los homininos en el acceso a estos recursos. Aparte de su enorme tamaño, esta hiena difería de las modernas en mostrar un radio y una tibia relativamente cortos frente a las dimensiones del húmero y el fémur. Como resultado, su altura en la cruz no era mucho mayor que la de una hiena manchada, aunque duplicase su masa corporal. El acortamiento de los segmentos distales de las extremidades sugiere, además, que esta hiena extinta tendría hábitos menos corredores que las especies modernas de la familia, obteniendo a cambio mayor fuerza y estabilidad a la hora de desmembrar los cadáveres de ungulados y transportar grandes porciones corporales de los mismos hasta sus cubiles de cría. La dentición muestra igualmente sus adaptaciones para fracturar elementos esqueléticos, pues el

tercer y el cuarto premolares aparecen muy desarrollados, mientras que las muelas carníceras están comparativamente reducidas.

El estudio mediante tablas de contingencia y análisis de correspondencias de las frecuencias en que se conservan las porciones anatómicas de los huesos largos de las especies de ungulados de Venta Micena revela un comportamiento fracturador altamente especializado en esta hiena, en función del tipo de elemento esquelético considerado y del taxón de procedencia. Así, tanto el húmero como la tibia son fracturados siguiendo una secuencia invariante de consumo, comenzando con el roído de la epífisis proximal y finalizando con la liberación de su extremo distal, mientras que en el caso del fémur ambas epífisis son atacadas, por lo que sólo tienden a conservarse las diáfisis. Estos patrones específicos se correlacionan estrechamente con la cantidad de médula ósea que suministra cada elemento esquelético, variable según los diferentes grupos de ungulados.

El estudio de la biomecánica de la masticación en *Pachycrocuta* muestra igualmente la enorme capacidad de esta hiena para fracturar huesos, pues presenta un desarrollo del proceso coronoides y una profundidad de la rama horizontal de la mandíbula, en relación a su tamaño, similar a los de las hienas modernas, en las que ambos aspectos están muy potenciados, lo que revela el enorme desarrollo de la musculatura temporal y la elevada resistencia de la mandíbula a los esfuerzos dorsoventrales ocasionados durante la fracturación de los huesos, así como un mayor desarrollo del proceso angular frente a sus dimensiones en las restantes hienas, lo que indica que la musculatura masetérica era comparativamente más potente, y una menor fuerza en los caninos, aspecto que confirma los hábitos hipercarroñeros de la especie.

Llegados a este punto, cabe preguntarse por el contexto ecológico en el que tuvo lugar la evolución de un hiénido de tal porte, con una etología tan sumamente especializada. La clave está en la composición, durante el Plioceno superior e inicios del Pleistoceno, de la asociación de carnívoros del Viejo Mundo. A diferencia de los ecosistemas modernos, en los que los grandes depredadores terrestres son los félidos panterinos y, en menor medida, los cánidos hipercarnívoros, durante estas épocas se encuentran todavía en los continentes africano y euroasiático depredadores con dientes en forma de sable, como *Megantereon* y *Homotherium*. La anatomía craneodental y postcraneal de estos félidos, que se engloban en la subfamilia de los macairodontinos, muestra numerosas especializaciones que vienen impuestas, en buena medida, por el desarrollo hipertélico de los caninos superiores, los cuales condicionaban tanto sus técnicas de caza como las posibilidades de procesar con la dentición yugal los cadáveres de sus presas. Es precisamente la dinámica evolutiva y biogeográfica de

estos carnívoros la que permite enmarcar el contexto en el que tiene lugar la evolución de carroñeros tan especializados como las hienas gigantes o los homínidos que desarrollan las primeras tecnologías de talla lítica. Así, durante la época Pliocena se encuentra en Europa el félido con dientes de sable *M. cultridens*, que es reemplazado en la base del Pleistoceno por *M. whitei*, especie africana cuya anatomía craneodental, más derivada, muestra importantes diferencias, particularmente a nivel de las dimensiones de la dentición yugal, donde se observa que los premolares aparecen sumamente reducidos, en particular el tercero, así como la cúspide anterior de la muela carnífera, lo que se relaciona con un mayor desarrollo de los caninos superiores. Esta especie se registra a finales del Plioceno a las puertas de Europa en Dmanisi y, ya entrado el Pleistoceno, su presencia se constata en diversos yacimientos de la ribera norte del Mediterráneo, como Venta Micena, Pirro Nord (Italia), Apollonia (Macedonia) y Untermassfeld (Alemania). La clave del papel ecológico desempeñado por *M. whitei* en los ecosistemas de la Europa meridional se encuentra en la relación entre las dimensiones de su dentición y la configuración anatómica de su esqueleto postcraneal. Así, al estimar la masa corporal de esta especie extinta a partir del tamaño de sus muelas carníferas, utilizando las ecuaciones de regresión ajustadas en carnívoros modernos, se obtiene un valor de unos 55 kg, similar al de un leopardo. Si, por el contrario, se calcula la masa usando las dimensiones de la epífisis distal del húmero en su articulación con el radio y la ulna, lo que permite estimar la potencia del antebrazo para inmovilizar sus presas antes de darles muerte con los sables, el valor ajustado es de unos 200 kg, parecido al de un león macho. Finalmente, si se usa en las estimaciones la superficie de la tróclea del húmero o el perímetro de la diáfisis de este elemento, que informan sobre la superficie de sustentación del cuerpo por las extremidades anteriores, se obtienen unos 100 kg de masa corporal, valor similar al de un jaguar. Ello indica que se trataba de un depredador con capacidad de abatir presas unguladas de un porte considerablemente superior a su capacidad de consumir tales cadáveres, por lo que probablemente se limitaba a las vísceras y paquetes musculares más delicados, dejando porciones sustanciales de carne abandonadas en sus presas y la totalidad de los nutrientes óseos internos. Tales recursos podrían ser aprovechados posteriormente por las hienas y los homínidos, en competencia directa, lo que explica la pervivencia en Eurasia de las hienas gigantes y de las poblaciones de homínidos que desarrollaban el modo 1 de talla, adecuado para el carroñeo de estos cadáveres pero no para la caza activa, hasta ya entrado el Pleistoceno medio, cuando se produce la desaparición de estos depredadores y su sustitución por los félidos panterinos modernos, provenientes de África. Es precisamente en estos momentos cuando se extingue *Pachycrocuta*, siendo reemplazada en los ecosistemas europeos por la hiena manchada africana, y cuando hace irrupción en el escenario evolutivo



una nueva especie, *H. heidelbergensis*, que porta ya el modo 2 de talla o achelense, de mayor versatilidad en estas nuevas condiciones.

## ECOLOGÍA DE LAS COMUNIDADES DE GRANDES MAMÍFEROS DE INICIOS DEL PLEISTOCENO: ENFOQUES BIOGEOQUÍMICOS Y ECOMORFOLÓGICOS

La Paleoecología se ocupa de efectuar retrodicciones sobre el género de vida de las especies extintas y sus interacciones en el seno de las paleocomunidades, así como sobre las relaciones funcionales entre los organismos del pasado y el medio en el que se desenvolvían. Dentro de esta disciplina se distinguen la Paleoautoecología, centrada en el estudio de la paleobiología de las especies pretéritas (vg., tipo de hábitat, preferencias tróficas y modo de locomoción) y la Paleosinecología, que se enfoca hacia la reconstrucción de sus comunidades. Desde esta perspectiva, la Paleoecología Evolutiva estudia el contexto físico y biótico de los organismos extintos, así como las consecuencias de los cambios en dicho contexto sobre la evolución de los linajes pretéritos. Los cuatro objetivos principales de este enfoque comparativo serían los siguientes: (i) evaluar si los conceptos ecológicos basados en el análisis de las comunidades modernas resultan válidos para estudiar los cambios espaciotemporales en la composición de las comunidades; (ii) determinar qué propiedades e interacciones ecológicas son independientes de la composición taxonómica y del período de tiempo estudiado; (iii) estudiar las respuestas a largo plazo de los ecosistemas a las condiciones físicas y bióticas cambiantes; y (iv) dilucidar la influencia de las relaciones ecológicas sobre la historia evolutiva de los linajes del pasado.

Una vez estimado, mediante análisis tafonómico, el grado de resolución de la asociación fósil, valorando la fidelidad que guarda respecto a la composición de la biocenosis original, resulta necesario inferir las características autoecológicas de las especies conservadas en la tafocenosis antes de proceder al análisis sinecológico de la comunidad. Las propiedades autoecológicas de las especies extintas se pueden reconstruir siguiendo tres métodos complementarios: (i) los basados en el análisis funcional de la morfología de los fósiles, con vistas a obtener inferencias biomecánicas y ecomorfológicas, lo que se ve facilitado si existen en la actualidad especies emparentadas estrechamente; (ii) los centrados en el uso de técnicas biogeoquímicas, como el análisis de la abundancia relativa de elementos traza e isótopos estables, para inferir los requerimientos tróficos de las especies extintas y sus preferencias de hábitat; y (iii) los que se basan en el contexto sedimentario y los atributos tafonómicos de los fósiles, así como en su distribución según facies. Los resultados obtenidos en la caracterización autoecológica de las especies de grandes mamíferos de Venta Micena,



efectuado combinando aproximaciones ecomorfológicas y biogeoquímicas, permiten efectuar una reconstrucción sinecológica del conjunto de la comunidad, lo cual resulta indispensable con vistas a establecer el marco ambiental en el que se asentaron las primeras poblaciones europeas del género *Homo*.

Los enfoques ecomorfológicos se basan en la relación funcional que muestra la anatomía craneodental y postcraneal de los mamíferos con determinadas características de las especies, tales como el tipo de hábitat y modo de locomoción, o las preferencias alimenticias, correlación que permite inferir las propiedades autoecológicas de las especies extintas. Así, por ejemplo, en los ungulados modernos diversas características del cráneo, la mandíbula y la dentición se correlacionan estrechamente con su dieta, como ocurre con el índice de hipsodoncia, que estima la altura relativa de la corona dentaria en los dientes yugales: los herbívoros pacedores, que se alimentan de plantas herbáceas con alto contenido en silicofitolitos en hábitats despejados de árboles, donde el polvo es otra fuente de material abrasivo, muestran dientes más hipsodontos que los ramoneadores de ambientes boscosos, que consumen hojas suculentas. Los valores de hipsodoncia de los ungulados de Venta Micena permiten apreciar la diversidad de tipos de alimentación y estrategias de uso del hábitat por estas especies. De esta manera, una vez agrupadas las especies identificadas en la tafocenosis según clases de tamaño corporal, estrategias de alimentación y modos de locomoción, la comparación de su abundancia con la mostrada por tales categorías bionómicas en los ecosistemas modernos de África y Asia, ha permitido deducir que la paleomastocenosis de Venta Micena ocupaba un hábitat similar al de las sabanas africanas con parches de árboles.

Durante las últimas décadas, los isótopos estables se han revelado como una herramienta sumamente útil con vistas a obtener inferencias ecofisiológicas de los mamíferos extintos y, también, sobre el medio en el que habitaban. Los diferentes isótopos estables de un mismo elemento químico ( $^{13}\text{C}$  vs.  $^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  vs.  $^{14}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$  vs.  $^{16}\text{O}$ ) son trazadores paleobiológicos pues, como resultado de las diferencias de masa atómica, muestran diferentes propiedades termodinámicas y cinéticas. En los elementos de masa atómica <40, tales diferencias pueden llevar a un fraccionamiento isotópico durante los procesos fisicoquímicos que intervienen en las reacciones metabólicas, traduciéndose en proporciones isotópicas características.

El fraccionamiento natural es muy bajo, por lo que estas proporciones se miden en tantos por mil (‰) de desviación frente a un estándar, usando la notación  $\delta$ :

$$\delta X = [(R_{\text{muestra}} / R_{\text{estándar}}) - 1] \cdot 10^3,$$

donde  $X = {}^{13}\text{C}, {}^{15}\text{N}, {}^{18}\text{O}$  y  $R = {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}, {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N}, {}^{18}\text{O}/{}^{16}\text{O}$ .  $R_{\text{muestra}}$  y  $R_{\text{estándar}}$  son las proporciones del isótopo pesado frente al ligero en la muestra analizada y en una estándar de referencia. Los estándares de comparación para  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$  y  $\delta^{18}\text{O}$  son una muestra de carbonato de calcio proveniente de un belemnites del Cretácico (PDB), el  $\text{N}_2$  atmosférico y la composición media de las aguas oceánicas (SMOW), respectivamente. Los valores positivos de  $\delta X$  indican un enriquecimiento en el isótopo pesado respecto al estándar y los negativos un empobrecimiento.

Las proporciones de  $\delta^{18}\text{O}$  en el esmalte dentario y el hidroxiapatito del hueso permiten estimar cambios en las paleotemperaturas. Ahora bien, en una fauna local indican la fuente principal de agua de los organismos. La razón es que el contenido hídrico de las hojas está enriquecido en  $\text{H}_2{}^{18}\text{O}$  por evapotranspiración diferencial, por lo que los ungulados que obtienen una parte significativa del agua a partir de la vegetación muestran valores de  $\delta^{18}\text{O}$  superiores a los de aquellos que precisan abreviar más. Por otra parte, los carbohidratos están enriquecidos en  ${}^{18}\text{O}$  en comparación con las proteínas, por lo que los carnívoros muestran valores de  $\delta^{18}\text{O}$  más bajos que los herbívoros. En el caso de Venta Micena, los isótopos de oxígeno han permitido estimar los requerimientos hídricos de estas especies villafranquienses. Así, los megaherbívoros *M. meridionalis*, *H. antiquus* y *Stephanorhinus etruscus*, junto al ciervo megacerino, muestran los valores de  $\delta^{18}\text{O}$  más bajos entre los ungulados, lo que indica que estas especies necesitarían abreviar con regularidad, mientras que *Hemitragus albus*, *Soergelia minor* y *Pseudodama* sp. presentan los más altos, lo que sugiere que obtendrían buena parte de sus requerimientos hídricos de la vegetación. Los carnívoros muestran valores de  $\delta^{18}\text{O}$  empobrecidos respecto a los medidos en los herbívoros. Tales inferencias concuerdan con lo observado en los análogos modernos de estas especies.

La mayoría de las plantas terrestres se pueden dividir en dos grupos conforme a su ruta de asimilación del carbono (esto es, según la molécula receptora del  $\text{CO}_2$  y el enzima implicado en ello): plantas  $\text{C}_3$  que comprenden los árboles, matorrales de las zonas templadas y herbáceas adaptadas a condiciones frías y húmedas o a zonas de altitud, y plantas  $\text{C}_4$  que incluyen básicamente monocotiledóneas tropicales como las gramíneas, adaptadas a condiciones áridas. Todas las plantas toman el  ${}^{12}\text{CO}_2$  con preferencia al  ${}^{13}\text{CO}_2$  pero existen diferencias importantes en su composición isotópica. Así, las plantas  $\text{C}_3$  siguen el ciclo de Calvin-Benson, usando exclusivamente como enzima fotosintética la RuBisco, sumamente efectiva al discriminar contra el carbono isotópicamente pesado, de forma que, frente a la composición del  $\text{CO}_2$  atmosférico ( $\delta^{13}\text{C} = -6,5\text{‰}$ ), sus tejidos muestran un valor de  $\delta^{13}\text{C}$  en torno a un  $-26,0\text{‰} \pm 2,3\text{‰}$  (rango: desde  $-35\text{‰}$  en bosque cerrado a  $-20\text{‰}$  en zonas despejadas de vegetación

arbórea). Las plantas  $C_4$  siguen el ciclo de Hatch-Slack, en el que interviene otra enzima (PEP-carboxilasa) como paso previo a la fijación del carbono por la RuBisco; esta enzima discrimina menos efectivamente, por lo que presentan valores de  $\delta^{13}C$  más altos ( $-12,0\text{‰} \pm 1,1\text{‰}$ ; rango:  $-19\text{‰}$  a  $-8\text{‰}$ ). Las plantas  $C_4$  aparecieron a finales del Mioceno, hace unos 7 Ma, según ponen de manifiesto los valores de  $\delta^{13}C$  medidos en los paleosuelos y el esmalte dentario de mamíferos. Al comparar el valor de  $\delta^{13}C$  en la dieta de los animales y la composición del carbono que se incorpora a sus tejidos se observan también diferencias, en este caso de signo opuesto, pues el metabolismo animal produce un enriquecimiento en el isótopo pesado; así, en el caso del colágeno, el incremento es en promedio de  $+4,5\text{‰}$ , por lo que un herbívoro ramoneador de hojas de plantas  $C_3$  mostrará un valor medio de  $\delta^{13}C$  próximo a  $-21,5\text{‰}$ , mientras que para un ungulado pacedor de hierbas  $C_4$  se encontrará en torno a  $-7,5\text{‰}$ .

La composición isotópica del nitrógeno en el colágeno de los mamíferos se relaciona directamente con su posición en la cadena trófica, pues cada nivel experimenta un aumento de  $\delta^{15}N$  en torno a  $+3,4\text{‰}$ . Los principales factores que afectan a la composición isotópica del nitrógeno en el colágeno de los herbívoros son los siguientes: (i) la síntesis de nitrógeno en el suelo; (ii) la dieta del animal (esto es, si las plantas que consume tienen o no la capacidad de fijar el  $N_2$ ); y (iii) su metabolismo del nitrógeno. Los herbívoros de bosques húmedos muestran valores de  $\delta^{15}N$  más bajos que los que se desenvuelven en ambientes abiertos y secos, como consecuencia de la acidez del suelo en los medios forestados. Las plantas que fijan el nitrógeno tienen valores de  $\delta^{15}N$  similares a la composición del  $N_2$  atmosférico ( $0\text{‰}$ ), mientras que las que no asimilan este elemento por sí mismas y usan otras fuentes (iones  $NH_4^+$  y  $NO_3^-$  del suelo) muestran un rango de valores más amplio, en general más positivos. En consecuencia, los herbívoros que consumen plantas fijadoras de  $N_2$  presentan valores de  $\delta^{15}N$  comprendidos entre  $0\text{‰}$  y  $+4\text{‰}$ , mientras que en los que se alimentan de plantas que no fijan el  $N_2$  el rango oscila entre  $+2\text{‰}$  y  $+8\text{‰}$ . Finalmente, las plantas que habitan en ambientes próximos al mar o afectados por la sal se encuentran notablemente enriquecidas en  $^{15}N$ , lo que refleja el mayor contenido en este isótopo de los nitratos y el amonio propios de los suelos salinos. Los efectos del metabolismo del nitrógeno en los animales son también muy importantes. Así, se observan valores superiores de  $\delta^{15}N$  en las especies de regiones áridas, con dieta pobre en proteínas, que excretan urea empobrecida en  $^{15}N$ . Por otra parte, los valores de  $\delta^{15}N$  son más altos en los grandes herbívoros monogástricos, como el elefante, que en los rumiantes. Igualmente, se encuentran valores isotópicos elevados en los ejemplares lactantes, debido a la ingestión de leche materna enriquecida en proteínas, lo que lleva a un incremento aparente en el nivel trófico del animal. Se ha observado también en los

osos de las cavernas (*Ursus spelaeus*) que los valores más altos de  $\delta^{15}\text{N}$  aparecen en los momentos fríos, debido a la reutilización de la urea en la síntesis de aminoácidos durante los períodos prolongados de hibernación.

En el caso de Venta Micena, los estudios realizados han permitido obtener colágeno fósil en aproximadamente un 50% de las muestras analizadas, permitiendo estimar la abundancia relativa de los isótopos de carbono y nitrógeno en las especies de grandes mamíferos. Tales proporciones isotópicas revelan, por ejemplo, diferencias ecofisiológicas significativas entre los perisodáctilos y los rumiantes, pues estos últimos presentan valores enriquecidos de  $\delta^{13}\text{C}$  como consecuencia de su mayor eficiencia digestiva. De manera similar, los niveles de  $\delta^{15}\text{N}$  permiten estimar qué especies se desenvolvían en las zonas boscosas, como los cérvidos, y cuáles se alimentaban en un hábitat más abierto, el caso de los bóvidos, ayudando a detectar aspectos insólitos de la paleobiología de algunos ungulados, como en el caso de *H. antiquus*, especie cuya masa corporal duplicaba la del hipopótamo actual y que parece haber tenido hábitos más anfibios, alimentándose exclusivamente de vegetación acuática.

### Relaciones depredador-presa en Venta Micena: el juego de la vida y la muerte en el Pleistoceno inferior

Las proporciones isotópicas del carbono y el nitrógeno mostradas en la Figura 15 permiten poner de manifiesto la segregación ecológica entre los carnívoros que cazaban por emboscada en medios boscosos (*M. whitei* y *P. gombaszogensis*) y los que abatían sus presas a la carrera en ambientes despejados de árboles (*H. latidens* y *L. lycaonoides*), lo cual abre la posibilidad de efectuar inferencias sobre las relaciones depredador-presa en el seno de la paleocomunidad, por ejemplo entre el macairodontino *M. whitei* y los cérvidos megacerinos, o entre *H. latidens* y las crías de megaherbívoros, confirmando el papel desempeñado por la hiena gigante *P. brevirostris* en la génesis de la tafocenosis, como agente recolector y modificador de elementos óseos.

Además, los valores de  $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$  permiten estimar cuantitativamente la contribución proporcional de diversas presas a la dieta de cada depredador, usando el modelo lineal de mezcla dual de Phillips, en el que se asume el siguiente balance isotópico para tres presas potenciales, dos isótopos estables y un depredador:

$$\begin{aligned}\delta^{13}\text{C}_{\text{depredador}} &= f_A \delta^{13}\text{C}'_{\text{presa A}} + f_B \delta^{13}\text{C}'_{\text{presa B}} + f_C \delta^{13}\text{C}'_{\text{presa C}} \\ \delta^{15}\text{N}_{\text{depredador}} &= f_A \delta^{15}\text{N}'_{\text{presa A}} + f_B \delta^{15}\text{N}'_{\text{presa B}} + f_C \delta^{15}\text{N}'_{\text{presa C}} \\ 1 &= f_A + f_B + f_C\end{aligned}$$

donde  $\delta^{13}C'_{presa}$  y  $\delta^{15}N'_{presa}$  son las proporciones de isótopos de carbono y nitrógeno en cada presa, corregidas para el fraccionamiento isotópico respecto al depredador (+1‰ para el carbono y +3‰ para el nitrógeno), y  $f$  representa la contribución relativa, en tantos por uno, de las presas  $A$ ,  $B$  y  $C$  a la dieta del carnívoro.

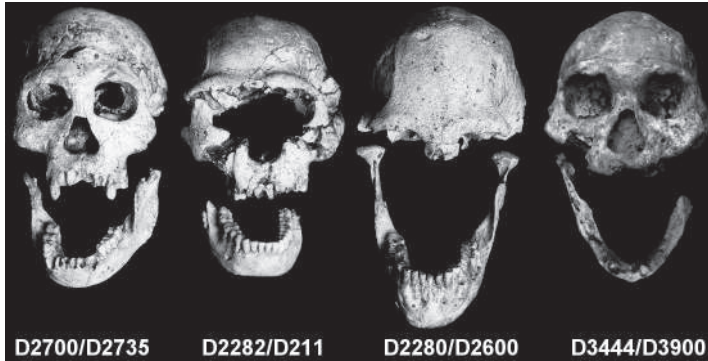
Los resultados obtenidos al aplicar este modelo a la comunidad de Venta Micena permiten apreciar que el caballo, especie mejor representada en la tafocenosis, sería la presa principal de *M. whitei* y *L. lycaonoides*, situándose como la segunda en importancia en el caso de *H. latidens*, mientras que los dos ungulados que le siguen en abundancia, *Bison* sp. y *P. verticornis*, serían las presas más importantes de *H. latidens* y de *P. gombaszoegensis*, respectivamente.

Las inferencias sobre el género de vida y el hábitat en el que se desenvolvían estas especies del Pleistoceno inferior, así como las relativas a las relaciones depredador-presa en el seno de la paleocomunidad, ayudan a definir el nicho ecológico que ocuparían los homínidos. No obstante, la ausencia de registro paleoantropológico en Venta Micena impide efectuar estimaciones directas sobre su paleodieta y las interacciones ecológicas que mantenían con otras especies. Ahora bien, dos localidades próximas, Barranco León y Fuente Nueva-3, han suministrado importantes asociaciones de útiles con tipología preolduvayense, que incluyen abundantes lascas, núcleos, *choppers* y *manuports*, en sílex y caliza, estando representada toda la lítica cadena operativa. Además, en toda una serie de restos esqueléticos exhumados en estos yacimientos aparecen evidencias de acción antrópica, como huellas de descarnación efectuadas con lascas y huesos fracturados por percusión, aunque también se encuentran marcas en la superficie de los huesos ocasionadas por la dentición de los carnívoros. En el caso concreto de Fuente Nueva-3, yacimiento en el que se han identificado numerosos restos de proboscídeos, un esqueleto desmembrado de un individuo femenino de *M. meridionalis*, con una edad de muerte calculada en torno a 60 años, aparece rodeado parcialmente por treinta y cuatro coprolitos de hiena y diecisiete lascas de sílex, según reveló el estudio efectuado por P. Espigares. El hallazgo permite, sin duda, especular por la competencia entre hienas y homínidos por el acceso a los cadáveres de los megaherbívoros. El estudio en profundidad de estos nuevos yacimientos, junto a las inferencias obtenidas en otras localidades, como las del Pleistoceno inferior de Atapuerca, permitirá sin duda definir con mayor precisión el nicho ecológico que ocupaban los primeros inmigrantes del género *Homo* en Europa occidental.

## PARA SABER MÁS:

- AIELLO, L.C. & WHEELER, P. 1995. The expensive tissue hypothesis: the brain and the digestive system in human and primate evolution. *Current Anthropology* 36: 199-221.
- ARRIBAS, A. & PALMQVIST, P. 1999. On the ecological connection between sabre-tooths and hominids: faunal dispersal events in the lower Pleistocene and a review of the evidence for the first human arrival in Europe. *Journal of Archaeological Science* 26: 571-585.
- CARBONELL, E., BERMÚDEZ DE CASTRO, J.M., PARÉS, J., PÉREZ-GONZÁLEZ, A., CUENCA-BESCÓS, G., et al. 2008. The first hominin of Europe. *Nature* 452: 465-469.
- LORDKIPANIDZE, D., VEKUA, V., FERRING, R., RIGHTMIRE, G.P., AGUSTI, J., KILADZE, G., MOUSKHELISHVILI, A., NIORADZE, M., PONCE DE LEÓN, M., TAPPEN, M. Y ZOLLIKOFER, C.P.E. 2005. The earliest toothless hominin skull. *Nature* 434: 717-718.
- LORDKIPANIDZE, D., JASHASHVILI, T., VEKUA, A., DE LEON, M.S.P., ZOLLIKOFER, C.P.E., RIGHTMIRE, G.P., PONTZER, H., FERRING, R., OMS, O., TAPPEN, M., BUKHSIANIDZE, M., AGUSTI, J., KAHLKE, R., KILADZE, G., MARTINEZ-NAVARRO, B., MOUSKHELISHVILI, A., NIORADZE, M. Y ROOK, L. 2007. Postcranial evidence from early Homo from Dmanisi, Georgia. *Nature* 449: 305-310.
- MENDOZA, M. & PALMQVIST, P. 2008. Hypsodonty in ungulates: an adaptation for grass consumption or for foraging in open habitat? *Journal of Zoology (London)* 274: 134-142.
- MENDOZA, M., JANIS, C.M. Y PALMQVIST, P. 2005. Ecological patterns in the trophic-size structure of large mammal communities: a 'taxon-free' characterization. *Evolutionary Ecology Research* 7: 505-530.
- PALMQVIST, P., ARIBAS, A. Y MARTÍNEZ-NAVARRO, B. 1999. Ecomorphological study of large canids from southeastern Spain. *Lethaia* 32: 75-88.
- PALMQVIST, P. & ARIBAS, A. 2001. Taphonomic decoding of the paleobiological information locked in a lower Pleistocene assemblage of large mammals. *Paleobiology* 27: 512-530.
- PALMQVIST, P., GRÖCKE, D.R., ARIBAS, A. & FARIÑA, R. 2003. Paleoeological reconstruction of a lower Pleistocene large mammals community using biogeochemical ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ , Sr:Zn) and ecomorphological approaches. *Paleobiology* 29: 204-228.
- PALMQVIST, P., MARTÍNEZ-NAVARRO, B., TORO, I., ESPIGARES, M.P., ROS-MONTOYA, S., TORREGROSA, V. & PÉREZ-CLAROS, J.A. 2005. A re-evaluation of the evidence of human presence during Early Pleistocene times in southeastern Spain. *L'Anthropologie* 109: 411-450.
- PALMQVIST, P., TORREGROSA, V., MARTÍNEZ-NAVARRO, B. & TURNER, A. 2007. A re-evaluation of the diversity of *Megantereon* (Mammalia, Carnivora, Machairodontinae) and the problem of species identification in extinct carnivores. *Journal of Vertebrate Paleontology* 27: 160-175.
- PALMQVIST, P., PÉREZ-CLAROS, J.A., GRÖCKE, D.R. & JANIS, C.M. 2008. Tracing the ecophysiology of ungulates and predator-prey relationships in an early Pleistocene large mammal community. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 266: 95-111.
- PALMQVIST, P., PÉREZ-CLAROS, J.A., JANIS, C.M., FIGUEIRIDO, B., TORREGROSA, V. & GRÖCKE, D.R. 2008. Biogeochemical and ecomorphological inferences on prey selection and resource partitioning among mammalian carnivores in an early Pleistocene community. *Palaios* 23: 724-737.
- PLUMMER, T. 2004. Flaked stones and old bones: biological and cultural evolution at the dawn of technology. *Yearbook of Physical Anthropology* 47: 118-164.

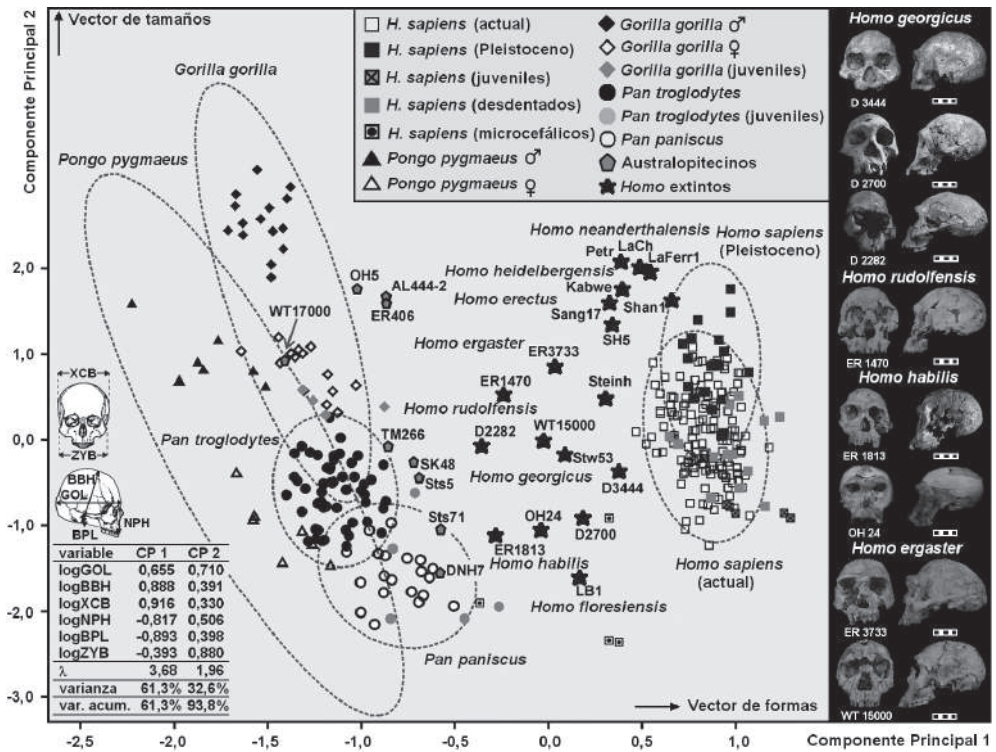




**Figura 1.** Cráneos y mandíbulas exhumados en el yacimiento georgiano del Plioceno superior de Dmanisi, datados en 1,77 Ma.

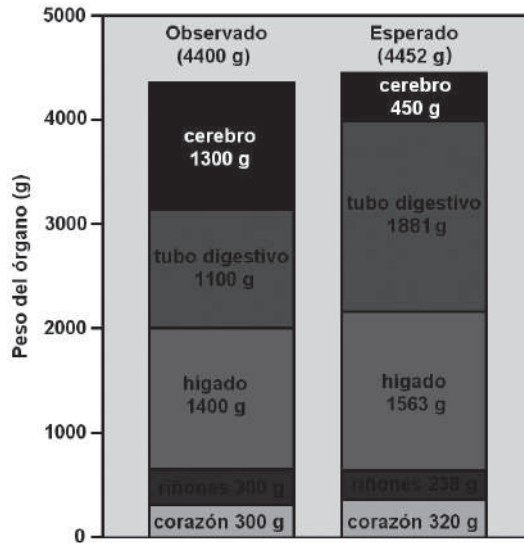


**Figura 2.** Paleopatologías de Venta Micena. A: tercer metacarpiano del caballo *Equus altidens* que muestra una intensa deformación en la epífisis distal. B: metatarsiano de *E. altidens* con abundantes osteofitos en la epífisis distal. C fragmento de pelvis de *E. altidens* con abundantes osteofitos bajo el acetábulo. D: metacarpiano de *E. altidens* con un recrecimiento en forma de espuela. E: metatarsiano de *E. altidens* con un gran recrecimiento en la cara dorsal próximo a la epífisis proximal. F: metacarpiano de *E. altidens* con un recrecimiento circular en la diáfisis. G: serie dental de *E. altidens*, que incluye P<sub>2</sub>-P<sub>3</sub>-P<sub>4</sub>-M<sub>1</sub> izquierdos con líneas de hipoplasia. H: cráneo y mandíbula (VM-7000) del cánido hipercarnívoro *Lycaon lycaonoides* exhumados en el yacimiento granadino de Venta Micena, que presentan diversas patologías dentales, como la ausencia del canino y el primer premolar superiores izquierdos, asociadas a una marcada asimetría bilateral fluctuante, lo que permite deducir una elevada homocigosis genética en la población que habitaba la cuenca de Guadix-Baza en el Pleistoceno inferior.



**Figura 3.** Análisis de componentes principales de la variación craneana en homínidos actuales y homínidos extintos. Los dos primeros ejes dan cuenta de aproximadamente un 94% de la variancia original de las seis variables craneométricas consideradas (GOL: longitud del neurocráneo, entre la glabella y el occipital; BBH: altura del neurocráneo, entre basion y bregma; XCB: anchura máxima del cráneo, entre los parietales; NPH: altura de la cara, entre nasion y prosthion; BPL: longitud de la cara, entre basion y prosthion; ZYB: anchura bicigomática). El segundo componente presenta factores de carga positivos para todas las variables, por lo que es asimilable a un vector de tamaños, mientras que el primero muestra cargas de distinto signo (positivas para las dimensiones del neurocráneo y negativas para las del esplanocráneo), siendo interpretable como un vector de formas. Este último permite diferenciar a los grandes simios (proyecciones negativas, al presentar la cara más desarrollada en relación a la bóveda craneana) de los humanos (proyecciones positivas, debido al desarrollo del neurocráneo), tomando las especies extintas valores intermedios entre ambos grupos que reflejan sus semejanzas anatómicas. Los ejemplares de Dmanisi (D 2700, D 2282 y D3444) muestran posiciones intermedias entre los cráneos de *Homo habilis* (ER 1813 y OH 24), *Homo rudolfensis* (ER 1470) y *Homo ergaster* (ER 3733, WT 15000 y STw53) diferenciándose en sus dimensiones globales de los especímenes asiáticos de *Homo erectus* (Sangiran 17) y de la mayor parte de los fósiles europeos y africanos del Pleistoceno medio, englobados en *Homo heidelbergensis*/*Homo rhodosiensis* (Kawbe, Petralona, cráneo 5 de Sima de los Huesos). Diagrama elaborado con los datos del Dr. Juan Manuel Jiménez Arenas, del Departamento de Prehistoria de la Universidad de Granada.

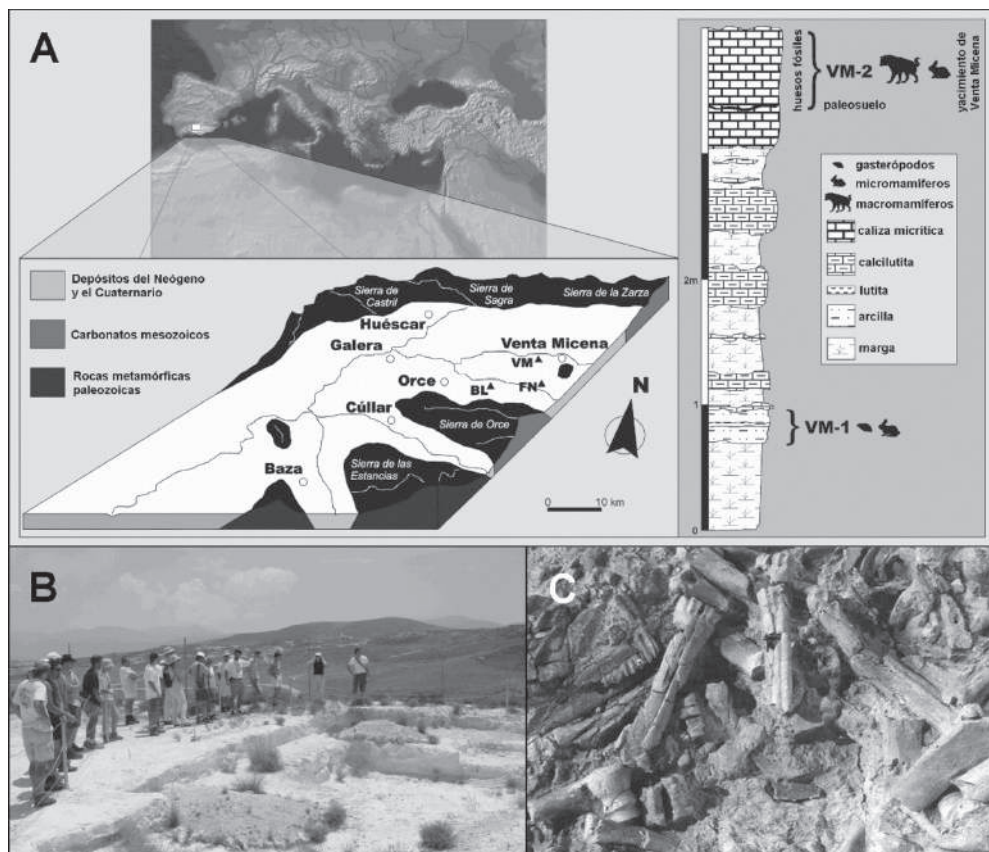




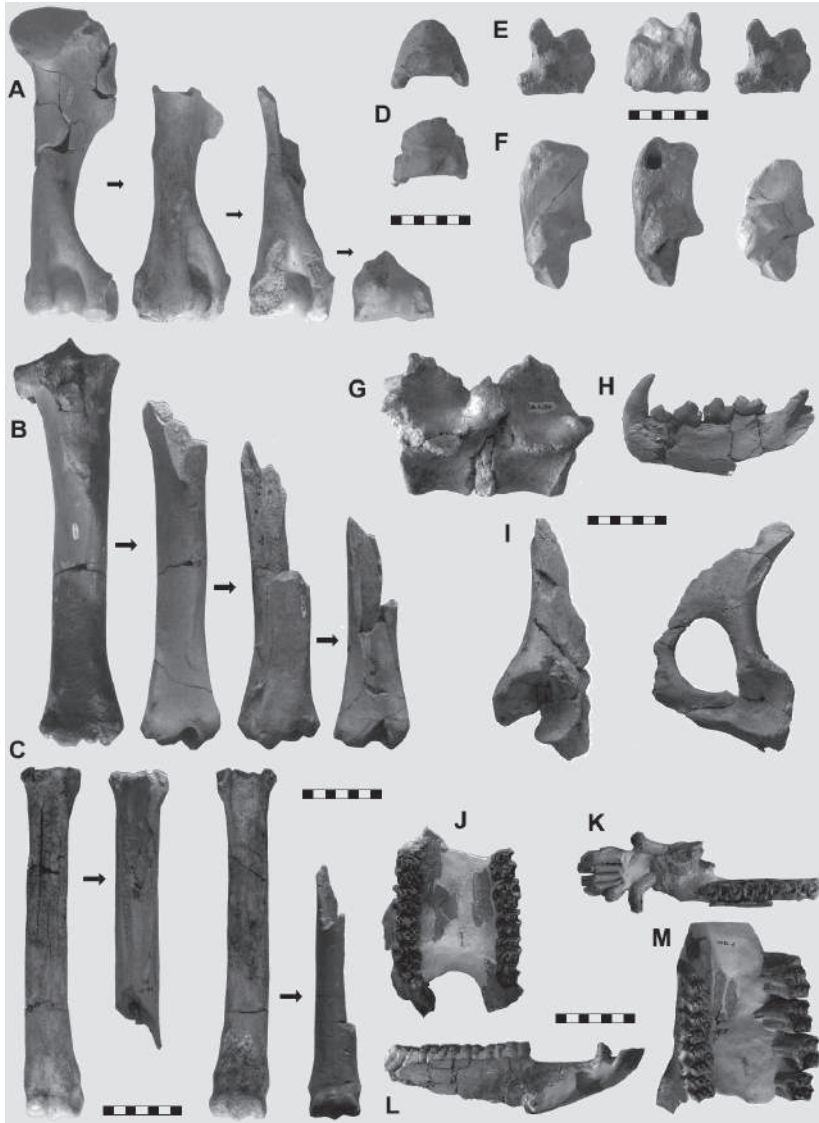
**Figura 4.** Dimensiones de diversos órganos en el cuerpo humano y sus masas en un simio de nuestro porte corporal. Las principales diferencias se encuentran en el tejido encefálico, que viene a representar tres veces el valor esperable, y en la masa del tracto digestivo, que es casi la mitad.



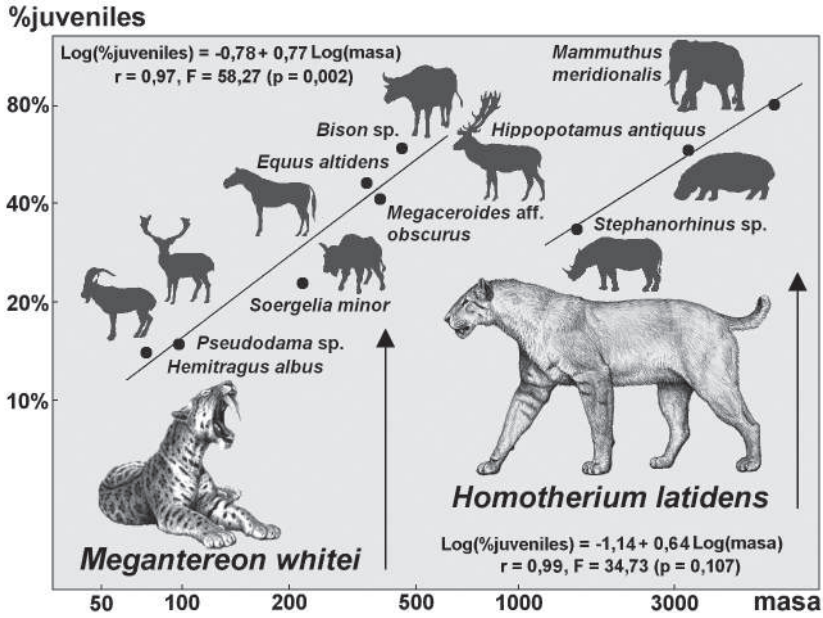
**Figura 5.** Vista de la cañada de Vélez del sector Orce-Venta Micena, excavada en los rellenos sedimentarios del borde nororiental de la cuenca de Guadix-Baza (Granada).



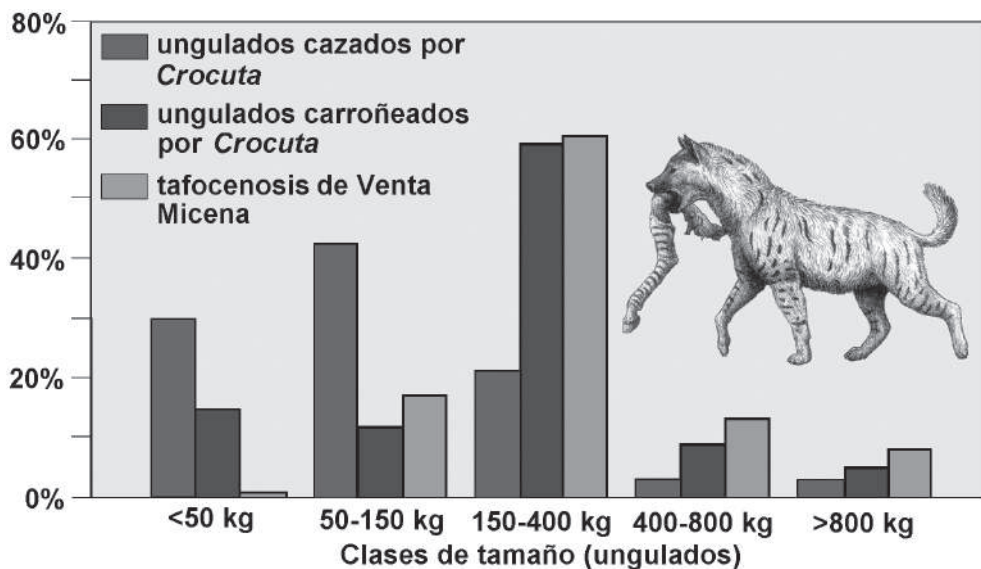
**Figura 6.** Bloque diagrama de la hoya de Baza, en el que se muestra la ubicación de los yacimientos de Barranco León (BL), Fuente Nueva-3 (FN) y Venta Micena (VM), con la columna estratigráfica de este último (A), una vista del Corte 3 de excavación en el estrato Venta Micena (B) y el aspecto de una cuadrícula de la superficie del yacimiento (C).



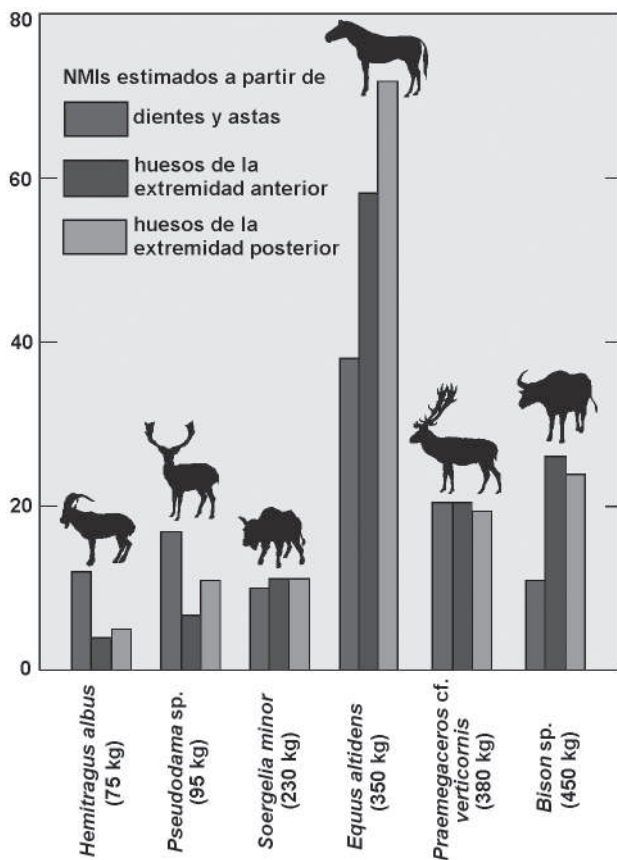
**Figura 7.** Especímenes fósiles de caballo (*Equus altidens*) exhumados en Venta Micena: humeros (A) y tibias (B), que ilustran una secuencia proximodistal de consumo por las hienas, metapodios (C) que revelan un consumo indistinto por las epfisis proximales y distales, terceras falanges (D), astrágalos (E), calcáneos (F), grupos de vértebras (G), fragmentos del pelvis (I), maxilares (J, M) y mandíbulas (K, L). Se muestra también un fragmento de hemimandíbula de la hiena gigante (*Pachycrocuta brevirostris*), en el que falta la rama ascendente (H).



**Figura 8.** Relación entre la proporción de individuos jóvenes con dentición decidua sobre el número mínimo de individuos calculado para cada especie de ungulado y la masa corporal estimada para los ejemplares adultos, que evidencia una selección de presas por los hipercarnívoros.

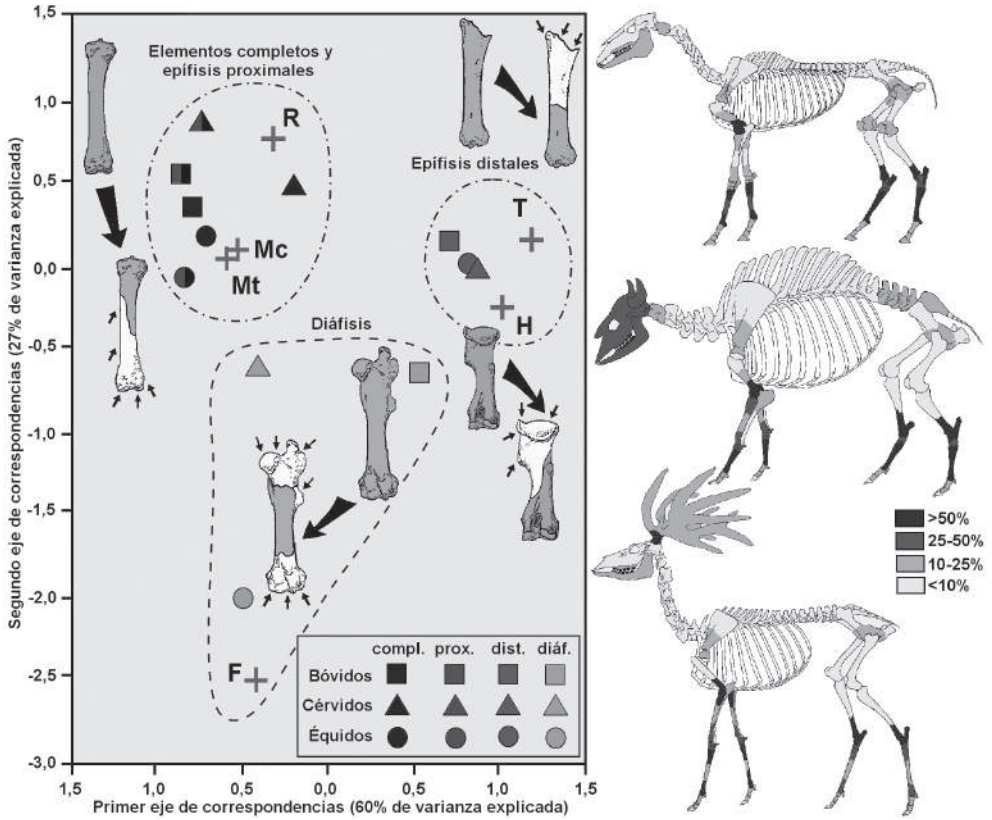


**Figura 9.** Abundancia de ungulados, agrupados según clases de tamaño corporal, en las presas cobradas por las hienas manchadas y carroñeadas por estos carnívoros a leones y licaones (datos tomados de los estudios de Hans Kruuk y George Schaller en el Serengeti y el Ngorongoro), comparadas con su abundancia relativa en Venta Micena. Los histogramas revelan que el yacimiento, atribuido a la hiena gigante *Pachycrocuta brevirostris*, muestra una composición similar a la de las presas que carroñean las hienas actuales, diferenciándose sólo en la exigua representación de animales de menos de 50 kg, cuyo transporte a los cubiles de cría sería poco rentable.

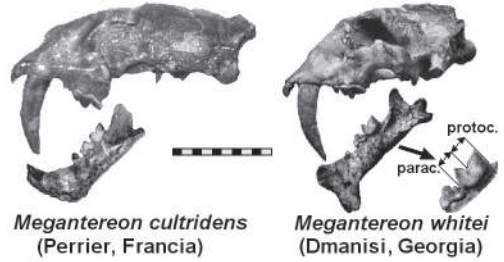


**Figura 10.** Abundancia de las principales especies de ungulados identificadas en Venta Mi-cena, según números mínimos de individuos calculados a partir de elementos del esqueleto craneal (dientes y, en el caso de los cérvidos, astas) y apendicular, diferenciando en este caso extremidades anteriores y posteriores.

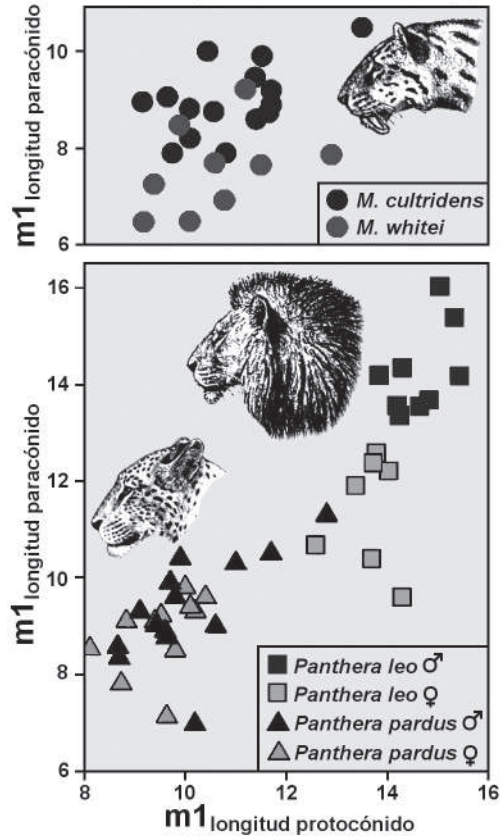




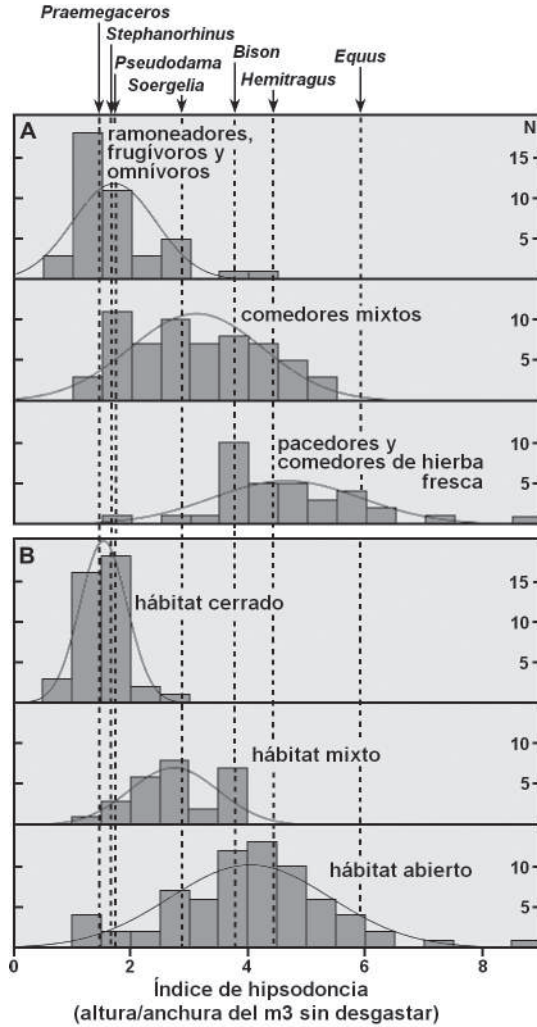
**Figura 11.** Resultados de un análisis de correspondencias sobre la abundancia de los principales huesos largos del esqueleto apendicular (H: húmero, R: radio, Mc: metacarpo, F: fémur, T: tibia, Mt: metatarso) de los tres grandes grupos de ungulados de Venta Micena (équidos, bóvidos y cérvidos), distribuidos según categorías de conservación (elementos completos, epífisis proximales, diáfisis y epífisis distales). Se muestran las porciones esqueléticas conservadas en las tres especies mejor representadas en la tafocenosis, el caballo *Equus altidens*, el bisonte *Bison* sp. y el ciervo *Praemegaceros* cf. *verticornis*.



**Figura 12.** Relación entre las dimensiones de la cúspide anterior (paracónido) y posterior (protocónido) en la carniceira inferior ( $M_1$ ) de *Megantereon cultridens* y *Megantereon whitei*. La especie africana, *M. whitei*, muestra una reducción considerable de la serie premolar, con un  $P_3$  vestigial que deja un diastema hasta el  $P_4$ , lo que se relaciona con una mayor grado de hipercarnivorización que en la especie norteamericana y euroasiática, *M. cultridens*. Esta reducción viene forzada por el mayor desarrollo proporcional de los caninos superiores en la especie africana, lo que conlleva una reducción del proceso coronoides en la mandíbula y una orientación más verticalizada de las fibras musculares en la fosa temporal, a efectos de lograr mayor ángulo de abertura de la boca para poder clavar los sables, lo que se traduce en una reducción de la potencia de mordedura, cuyo momento de fuerza se ve retrasado, por lo que se hace más énfasis en la cúspide cortante posterior de la muela carniceira. Tal diferencia no es imputable al dimorfismo sexual, pues no se observa en leones (*Panthera leo*) y leopardos (*Panthera pardus*). La reducción de la dentición yugal anterior se traduce, igualmente, en la aparición de una sínfisis mentoniana verticalizada, que protege a los caninos superiores cuando la boca está cerrada.



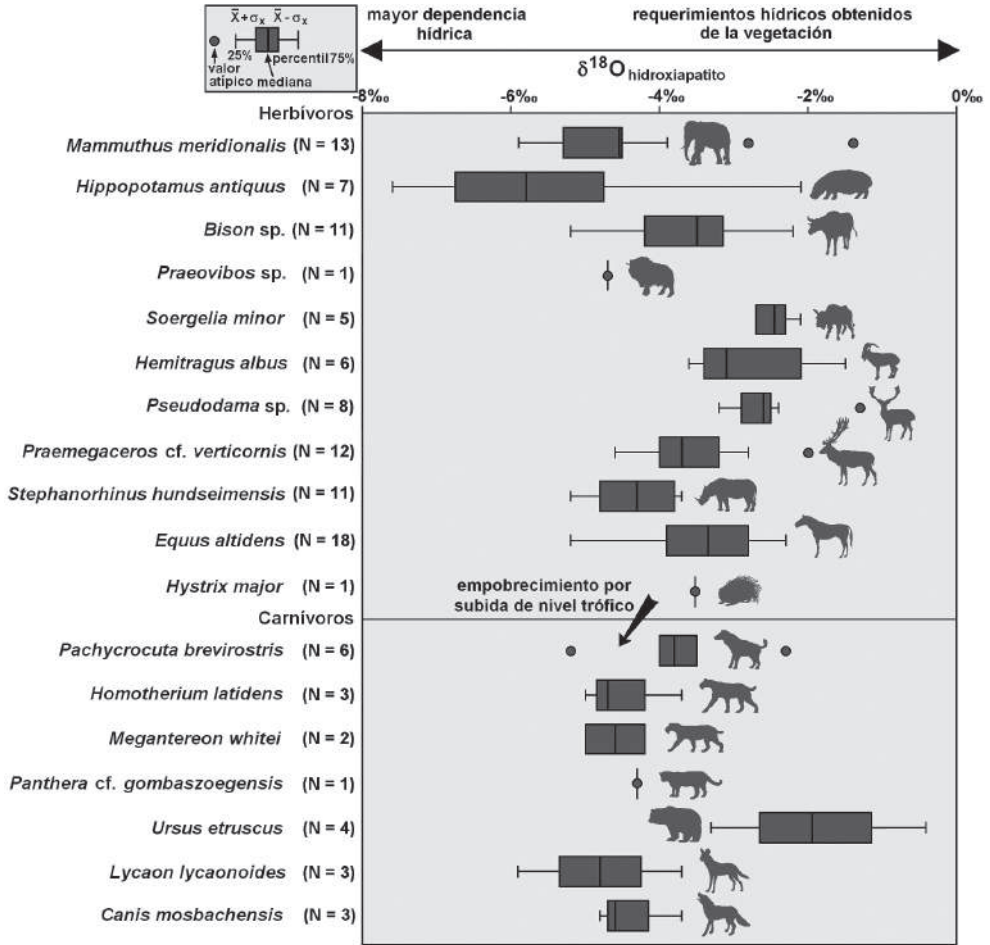




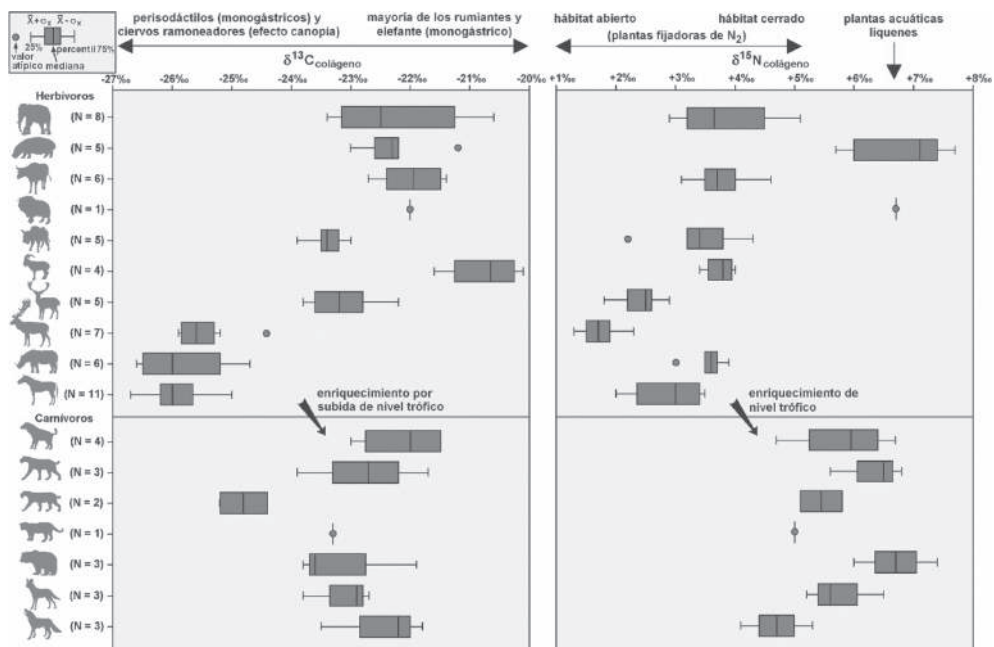
**Figura 13.** Valores del índice de hipsodancia en una amplia muestra de artiodáctilos y perisodáctilos modernos (134 especies), distribuidos según tipos de alimentación y hábitat de preferencia. Las flechas indican los valores de hipsodancia medidos en los ungulados de Venta Micena.



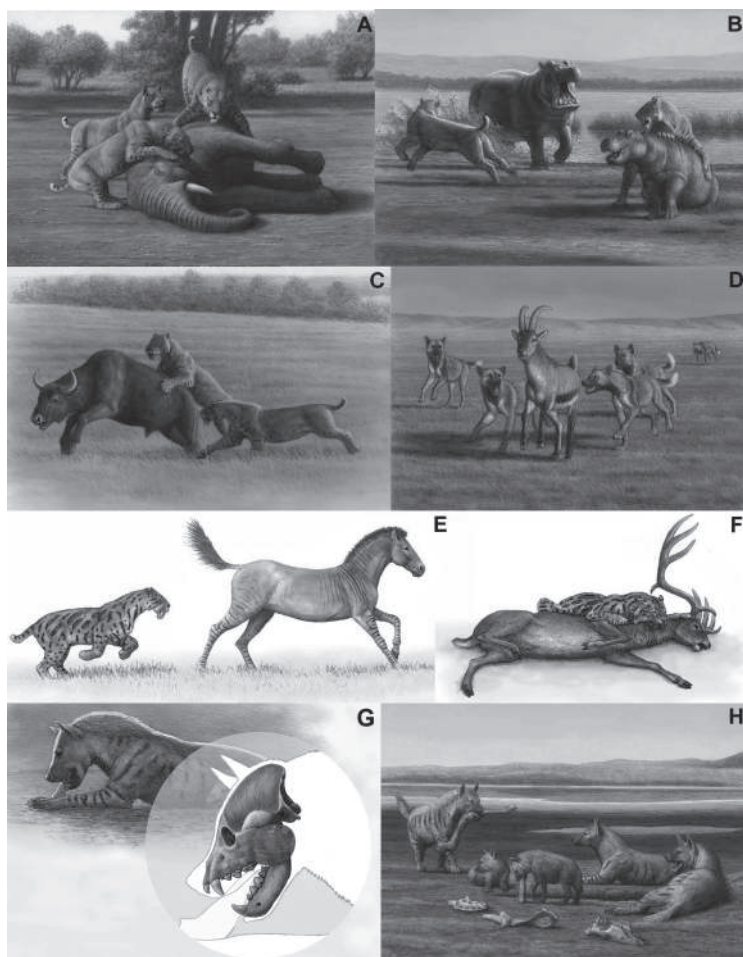
**Figura 14.** Reconstrucción, por Mauricio Antón, del paisaje de Orce a inicios del Pleistoceno. Se muestran algunos componentes de la fauna de grandes mamíferos que habitaba en la llanura que rodeaba el paleolago de la cuenca, en un entorno similar al que debió tener el yacimiento de Fuente Nueva-3. En primer término aparece un félido con dientes de sable de la especie *Homotherium latidens* y en segundo plano se representan elefantes de la especie *Mammuthus meridionalis*, especie de mayor tamaño que los dos proboscídeos modernos, y caballos de la especie *Equus altidens*, cuya anatomía postcraneal es similar a la de las actuales cebras de Grevy, que se desenvuelven en las planicies etíopes. En este yacimiento arqueológico, que ha suministrado una ingente asociación de útiles líticos, los restos de elefantes son muy numerosos, incluyendo defensas de hasta 3 m de longitud y 30 cm de anchura en la base, por lo que cabe contemplar la posibilidad del atrapamiento de estos animales en el lodo de las facies palustres.



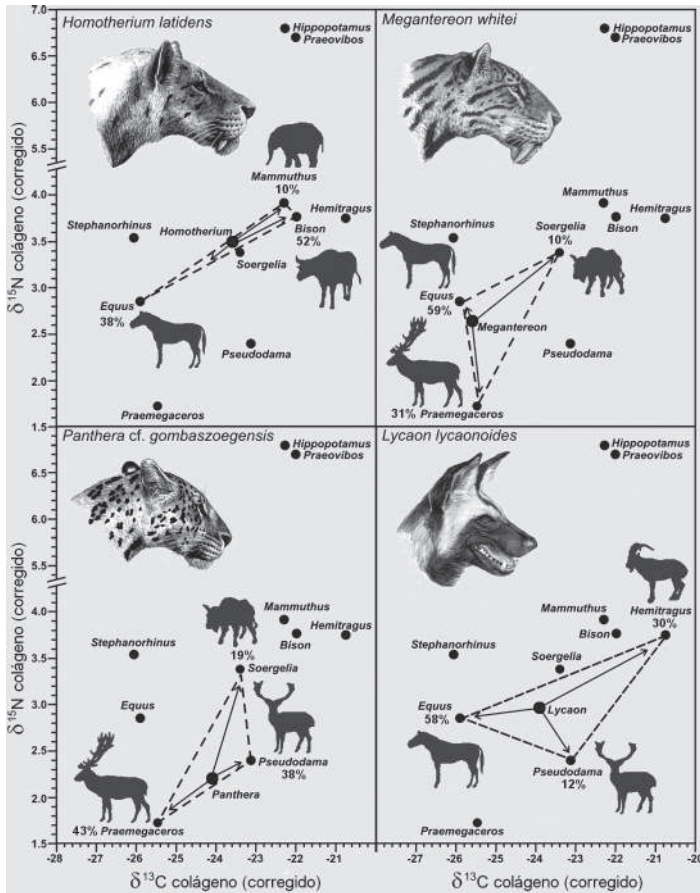
**Figura 15.** Abundancia relativa de isótopos estables de oxígeno ( $\delta^{18}O$ ) en la fase mineral (hidroxiapatito) de muestras de esmalte y hueso fósil de las especies de grandes mamíferos identificadas en el yacimiento paleontológico de Venta Micena, tomando como estándar de comparación la composición isotópica del agua del mar.



**Figura 16.** Abundancia relativa de isótopos estables de carbono y nitrógeno ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) en muestras de colágeno óseo de las especies de macromamíferos de Venta Micena, tomando como estándar de comparación la composición isotópica de una concha de belemnites (PDB) y la del nitrógeno atmosférico. Los nombres científicos de las especies aparecen en la leyenda de la Figura 14.

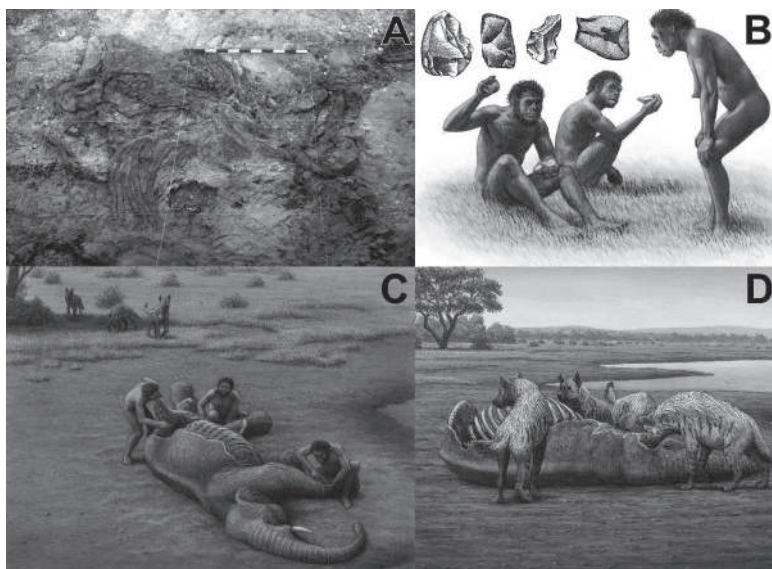


**Figura 17.** Relaciones depredador-presa a inicios del Pleistoceno, evidenciadas por las proporciones isotópicas ( $\delta^{13}\text{C}$  y  $\delta^{15}\text{N}$ ) en el colágeno óseo de las especies de ungulados y carnívoros de Venta Micena. Se muestran el felino con dientes en forma de cimitarra *Homotherium latidens* abatiendo un elefante joven, *Mammuthus meridionalis* (A), una cría de hipopótamo, *Hippopotamus antiquus* (B) y un bisonte adulto, *Bison* sp. (C). También aparecen reconstrucciones del cánido hipercarnívoro *Lycaon lycaonoides* en un lance cinegético sobre un caprino, *Hemitragus albus* (D), y del felino con dientes de sable de origen africano *Megantereon whitei* cazando un ciervo megacerino adulto, *Praemegaceros* cf. *verticornis* (E), y un équido, *Equus altidens* (F). Se ilustra la hiena gigante, *Pachycrocuta brevirostris*, fracturando un hueso largo de ungulado para acceder a la médula de su interior (G) y el entorno de los cubiles de cría de esta especie en Venta Micena (H). La anatomía del esqueleto postcranial de *Megantereon* revela a un cazador por emboscada, con extremidades muy robustas para inmovilizar completamente la presa antes de clavarle los caninos superiores; la razón es que tales puñales, sumamente alargados y comprimidos transversalmente, serían bastante frágiles. En cambio, *Homotherium* muestra caninos más cortos, anchos en la base y de margen aserrado, por lo que probablemente mataba por evisceración, así como extremidades más gráciles y alargadas, con garras no retráctiles, que evidencian sus hábitos de caza a la carrera en espacios despejados de árboles (dibujos de Mauricio Antón).



**Figura 18.** Proporciones de diversas presas unguladas en la dieta de los cuatro depredadores dominantes en los ecosistemas de inicios del Pleistoceno, *Homotherium latidens*, *Megantereon whitei*, *Panthera gombaszoegensis* y *Lycaon lycaonoides*, deducidas a partir de la abundancia relativa de los isótopos estables de carbono y nitrógeno en el colágeno óseo de los grandes mamíferos del yacimiento de Venta Micena (dibujos de los carnívoros realizados por Mauricio Antón).





**Figura 19.** Esqueleto parcial de *Mammuthus meridionalis* del yacimiento granadino de Fuente Nueva-3, que conserva la mandíbula (a la derecha de la fotografía), cuya dentición indica una edad avanzada para este ejemplar (en torno a 60 años, según el especialista en elefantes fósiles S. Ross), la columna vertebral, las costillas y la pelvis (cuya morfología indica que se trataba de una hembra), faltando las extremidades y el cráneo (A). Se muestran también algunas industrias líticas recuperadas en este yacimiento y la reconstrucción de un grupo de homínidos tallándolas (B). El trabajo tafonómico efectuado por P. Espigares ha revelado que el esqueleto se encuentra parcialmente rodeado por industrias líticas y coprolitos de hienas. Se muestra una reconstrucción de la posible historia tafonómica de este ejemplar tras su muerte (C, D), que incluye su carroñeo por los homínidos, que lo desmembrarían, transportando las extremidades a otro lugar, y las hienas gigantes, de la especie *Pachycrocuta brevirostris*, que consumirían el resto de los tejidos blandos (dibujos realizados por Mauricio Antón).





# USO DEL ANÁLISIS ISOTÓPICO DEL CARBONO Y DEL NITRÓGENO EN LA TRAZABILIDAD DE PRODUCTOS DERIVADOS DEL CERDO IBÉRICO

R. NIETO<sup>1</sup> Y J. F. AGUILERA<sup>1,2</sup>

## RESUMEN

La producción tradicional de cerdo Ibérico es un claro ejemplo de sistema extensivo de producción animal sostenible, respetuosa con el entorno, en la línea marcada por las tendencias actuales de la Política Agraria de los países de la Unión Europea. La pureza racial y la alimentación basada en la bellota, en la fase final de cebo durante la montanera en la dehesa mediterránea, son los dos principales factores que afectan a la calidad de los productos derivados de la industria del cerdo Ibérico. El alto valor económico que alcanzan los productos curados cuando proceden de animales producidos en las citadas condiciones hace necesaria la regulación e identificación de los productos que cumplen estos requisitos. Las relaciones isotópicas  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  y  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  determinadas en tejidos de cerdo Ibérico al sacrificio tienen cierto valor potencial como método de identificación y control del tipo de alimentación al que ha estado sometido el animal durante la fase final de cebo previa al sacrificio, es decir, constituyen una herramienta prometedora en la trazabilidad de materiales para diferenciar animales de bellota, recebo y cebo a pienso. Se analizan las variaciones en estas relaciones isotópicas debidas a los tres tipos de alimentación mencionados, en un trabajo de carácter preliminar realizado en colaboración con el Grupo de Bioquímica de Isótopos estables de la Estación Experimental del Zaidín.

**Palabras clave:**  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ , trazabilidad, cerdo Ibérico

---

<sup>1</sup> Instituto de Nutrición Animal, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Cno. del Jueves s/n, 18100 Armilla, Granada.

<sup>2</sup> Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental.

## INTRODUCCIÓN

El sector porcino es el primero en importancia en la ganadería española. El valor económico de su producción anual excede los 4.000 millones de euros, lo que coloca a España como segundo productor de la Europa de los 25. Centrándonos en el cerdo Ibérico, su producción se ha revitalizado en los últimos años gracias a la apertura de los mercados comunitarios y de terceros países a sus productos y a la creciente demanda del propio mercado nacional de productos de elevada calidad, valor añadido y características organolépticas excelentes. De aquí que hayan de quedar garantizados al consumidor su origen y calidad. Actualmente los censos de porcino Ibérico alcanzan aproximadamente un 9-10% del porcino nacional. Andalucía ocupa una posición extraordinariamente importante como base territorial en la explotación del cerdo Ibérico. Según datos del MARM (2010), en diciembre de 2008 se encontraba en nuestra comunidad autónoma el 34% del porcino extensivo del censo nacional y es previsible un aumento de la cabaña porcina Ibérica en los próximos años, siguiendo la tendencia común a todo el territorio nacional, una vez se superen los problemas coyunturales causados por la limitada disponibilidad de materias primas y la crisis económica general.

Es suficientemente conocido que la producción de cerdo Ibérico está fuertemente unida al uso de la dehesa y que posiblemente esta íntima e interdependiente relación sea responsable de que este tipo de explotación haya sobrevivido a la enorme transformación que la producción porcina ha experimentado en las últimas décadas. En efecto, el cerdo Ibérico está muy bien adaptado a las condiciones ambientales y ecológicas de la dehesa. Presenta una gran capacidad para recorrer largas distancias y para seleccionar y consumir su principal recurso alimenticio: la bellota, el fruto de las especies del género *Quercus*, *Q. rotundifolia* (encina), *Q. suber* (alcornoque) y *Q. lusitanicus* (quejigo). De la dehesa el cerdo Ibérico obtiene también hierba, especialmente abundante en primavera, que le permite cubrir parte de sus necesidades energéticas y proteicas, y en menor cantidad también disponible durante el periodo que media entre los meses de octubre y marzo, la cual complementa a la bellota. La producción tradicional de cerdo Ibérico es un claro ejemplo de sistema extensivo de producción animal sostenible, no agresiva respecto a su entorno, que sigue la línea marcada por las tendencias actuales de la Política Agraria de los países de la Unión Europea. La pureza racial y la alimentación basada en la bellota, en la fase final de cebo durante la montanera en la dehesa mediterránea, son los dos pilares en que descansa la calidad inequívoca de los productos de la industria del cerdo Ibérico. El alto valor económico que alcanzan los productos curados cuando derivan de animales producidos en las citadas condiciones ha hecho necesaria la regulación e identificación de los produc-

tos que cumplen estos requisitos. En noviembre de 2007 el Boletín Oficial del Estado publicó el Real Decreto 1469/2007 que aprueba la Norma de Calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos. Recopila la normativa aparecida desde la publicación del RD 1083/2001 sobre esta materia. La norma clasifica los productos curados procedentes de cerdo Ibérico en cuatro categorías (designaciones de calidad), atendiendo al régimen de alimentación de los animales durante la fase final de cebo: a) *De bellota o terminado en montanera*, que requiere al menos 46 Kg de ganancia de peso y 60 días de estancia mínima en montanera y, por lo tanto, con alimentación basada en bellota y hierba, de animales de al menos diez meses de edad y peso medio comprendido entre 92 y 115 Kg a la entrada en montanera; b) *de recebo o terminado en recebo*, que difiere de la categoría anterior en que la ganancia de peso bajo alimentación con bellota debe conducir al menos a una reposición de 29 Kg; c) *de cebo de campo*, si se alimenta a los animales con alimentos o mezclas comerciales basadas en cereales y leguminosas, completan su acabado a pienso con una estancia en campo de al menos 60 días y se les sacrifica a una edad no inferior a los doce meses; y d) *de cebo*, para productos frescos o curados que proceden de cerdos criados a pienso y sacrificados con una edad mínima de diez meses. La normativa, aún con sus evidentes lagunas, presta especial atención al control y certificación de la calidad, el primero constituido por un sistema de autocontrol, establecido por los propios operadores (ganaderos, mataderos, transformadores, comercializadores, etc.) respecto a las operaciones que realicen bajo su responsabilidad, que se complementa mediante controles llevados a cabo por organismos independientes (laboratorios, para análisis de ácidos grasos y análisis genéticos; entidades de inspección y entidades de certificación), reconocidos por la Administración. El estudio isotópico que describimos está relacionado con la actividad a desarrollar por los laboratorios y pretende analizar la viabilidad del análisis isotópico como método de control de la calidad de los productos derivados del cerdo Ibérico, complementario o alternativo al oficial, basado en el perfil de ácidos grasos obtenido por cromatografía de gases (Porrás Tejeiro y col., 2009).

Nuestro grupo de investigación viene prestando especial atención al estudio de la nutrición del cerdo Ibérico y en particular, a la mejora del conocimiento de su metabolismo proteico y energético, con el objetivo general de contribuir a la optimización del uso de los recursos alimenticios y a la preservación y promoción del cerdo Ibérico como raza autóctona en el marco de un sistema sostenible de producción animal. Hemos dedicado un importante esfuerzo a la evaluación nutricional de los recursos disponibles en la dehesa, bellota y hierba, que constituyen la fuente exclusiva de nutrientes para el animal durante su periodo final de cebo en montanera, único que da origen a productos de la máxima calidad organoléptica (Nieto y col.,

2002b; García-Valverde y col., 2007). En estos trabajos hemos evaluado la bellota de encina no sólo como fuente energética, sino como el principal recurso que durante la montanera aporta proteína al animal. Las pruebas realizadas han permitido conocer la digestibilidad real de sus aminoácidos, medida en íleon terminal. El estudio del perfil de su contenido en aminoácidos digeribles sugiere desequilibrios importantes que limitan la deposición de proteína en el animal y penalizan la eficiencia de este proceso de síntesis neta. Así mismo, hemos llevado a cabo, integrados en diversos proyectos de investigación, estudios sobre la nutrición y metabolismo del cerdo Ibérico en distintas fases de su crecimiento-cebo previas a la entrada en montanera para conocer su capacidad de ingesta, la eficiencia de utilización digestiva y metabólica del alimento, particularmente de la proteína de la dieta, determinar la máxima tasa de deposición proteica, los efectos del plano de alimentación sobre la velocidad de deposición de proteína y energía en el animal y definir sus necesidades energéticas en términos de energía metabolizable para mantenimiento y crecimiento y las nitrogenadas en términos de proteína ideal. (Nieto y col., 2002a y 2003; Barea y col., 2006 y 2007). Las estimaciones de la ingestión voluntaria de alimento revelan en el cerdo Ibérico una capacidad de ingesta algo superior a las observadas en razas mejoradas (Nieto y col., 2001). Parece ser que, efectivamente, la selección para lograr mayores capacidades de retención proteica y canales menos grasas ha implicado una pérdida en capacidad de ingestión. Todos estos estudios han permitido estimar las necesidades energéticas y proteicas para el mantenimiento y el crecimiento-cebo. Trabajos adicionales (Rivera Ferre y col., 2005 y 2006; Fernández-Fígares y col., 2007) confirman importantes diferencias metabólicas en el proceso de la renovación proteica entre el cerdo Ibérico y los genotipos mejorados, tanto a nivel corporal total como en tejidos específicos que, junto a singularidades en perfil hormonal, ayudan a explicar las diferencias entre genotipos en deposición de proteína y en la eficiencia de utilización de la energía de la dieta para este proceso, constatadas a nivel práctico. Por otro lado, el gasto energético de la actividad física es un componente importante del gasto energético total del animal en producción extensiva. El cerdo en producción extensiva permanece más tiempo de pie y, además, se desplaza para buscar el alimento. Ambas actividades incrementan sus necesidades energéticas respecto al animal que permanece estabulado. Nuestras estimaciones indican que en el cerdo Ibérico las necesidades energéticas relacionadas con esta actividad física son cuantitativamente pequeñas y podrían representar entre el 3,5 y 5% de sus necesidades energéticas totales (Lachica y Aguilera, 2000), dependiendo de la disponibilidad de recursos, orografía del terreno, etc. Los resultados aportados por todos estos estudios (valor nutritivo de los recursos disponibles, necesidades energéticas y proteicas, gasto energético de la

actividad física) ofrecen la posibilidad de llevar a cabo una explotación más racional del animal en producción extensiva.

De lo anterior cabe deducir que nuestro grupo de investigación ha dedicado una gran parte de su actividad científica a mejorar la eficiencia de producción del cerdo Ibérico a través de un mejor conocimiento del perfil metabólico del animal, y consecuentemente, de sus necesidades nutricionales; a la evaluación de la capacidad de los recursos alimenticios disponibles en su área geográfica de producción para proveer nutrientes, y en definitiva, a la producción de animales de óptima conformación al término del crecimiento-cebo para abordar la entrada en montanera. Ésta es esencial para generar productos de la máxima calidad. La búsqueda de un método de laboratorio preciso, capaz de identificar tales productos nos pareció un importante objetivo que abordamos en colaboración con el Dr. A. Delgado, del grupo de Biogeoquímica de Isótopos Estables de la Estación Experimental del Zaidín del CSIC. Se trata de aplicar un método de análisis que evalúe de forma objetiva la alimentación seguida por el animal en la fase final de cebo previa al sacrificio, dado el papel fundamental que ésta tiene en la calidad de los productos obtenidos del cerdo Ibérico. La exactitud de las medidas viene garantizada por el empleo de materiales de referencia certificados.

## USO DE ISÓTOPOS ESTABLES EN ESTUDIOS BIOLÓGICOS

Los isótopos estables se han utilizado desde hace décadas en la resolución de problemas de naturaleza biológica; por ejemplo, para determinar fraudes en la elaboración de vinos y zumos, tipificación de las denominaciones de origen de vinos, en estudios metabólicos o de nutrición. Nuestro grupo de investigación los ha venido utilizando para la medida de procesos metabólicos relacionados con la utilización de la energía en la actividad física (en ganado caprino; Lachica, 1993; Prieto y col., 2001) o con el reciclado de la proteína en el organismo animal (cerdo Ibérico; Rivera Ferre y col., 2005 y 2006). Las relaciones isotópicas  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  observadas en el colágeno residual presente en los restos de huesos y dientes se han utilizado por los arqueólogos para estudiar las paleodietas del hombre y de los animales (de Niro y Epstein, 1981; Bocherens y col., 1994; Privat y col., 2002).

Llegados a este punto y antes de abordar los resultados del estudio realizado sobre la aplicación del fraccionamiento isotópico  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  en la identificación del origen y calidad de los productos derivados del cerdo Ibérico, conviene recordar que los isótopos son distintas especies de un elemento químico que presentan un mismo **número atómico**, es decir, el mismo número de protones y electrones (lo que

les confiere idénticas propiedades químicas) pero que difieren en su **masa atómica** porque tienen en el núcleo distinto número de neutrones. Esto les confiere distintas propiedades físicas. Por ejemplo, en lo que respecta al carbono, encontramos en el isótopo más abundante en la naturaleza, el  $^{12}\text{C}$ , 6 protones y 6 neutrones en el núcleo y 6 electrones en la corteza; su masa atómica, por tanto, es 12. El carbono 13 presenta un neutrón más en el núcleo y su masa atómica es, por lo tanto, 13. El carbono 12 es más ligero que el  $^{13}\text{C}$  y esto hará que las moléculas que contienen  $^{12}\text{C}$  ( $^{12}\text{CO}_2$ , por ejemplo) tengan más tendencia a la evaporación que las que formadas con  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{CO}_2$ ). Estas características distintas dan lugar a los procesos conocidos como **fraccionamiento isotópico**. Los distintos isótopos de un elemento pueden ser estables o inestables. Estos últimos son los isótopos radiactivos. Como su nombre indica, no son estables, sino que se desintegran espontáneamente para formar átomos de otros elementos emitiendo radiaciones en el proceso. En el caso del carbono el isótopo radioactivo o inestable es el  $^{14}\text{C}$ .

En la naturaleza coexisten los distintos isótopos estables de los elementos (y también los radioactivos, aunque la proporción de éstos es mucho menor) y, en general, el más abundante es aquel que presenta menor masa atómica (aunque hay excepciones; por ejemplo, el Se). Esto ocurre en algunos de los elementos más abundantes en la materia orgánica, como el hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre, entre otros. La distribución de los distintos isótopos estables de un elemento en la naturaleza es lo que se conoce como **abundancia natural** de este isótopo.

En la Figura 1 se indica la **abundancia natural** de los isótopos estables de algunos elementos. Muestra algunos de los más abundantes en la materia orgánica (H, C, N, O, S, Fe). En el caso del hidrógeno, el isótopo más abundante (99,985%) es el que presenta masa atómica 1, mientras que el deuterio, con masa atómica 2, sólo representa el 0,015% de todos los átomos de H presentes en la naturaleza. En el caso del C, como se puede observar, el  $^{12}\text{C}$  supone el 98,89% del total de átomos de carbono y el  $^{13}\text{C}$ , aproximadamente el 1,11 %, mientras que en el caso del nitrógeno, el isótopo más ligero, el  $^{14}\text{N}$  representa el 99,63% del total y el  $^{15}\text{N}$  es sólo el 0,37%.

**Abundancia natural de distintos isótopos**

<b>Elemento</b>	<b>Isótopo estable</b>	<b>Abundancia natural (%)</b>
<b>H</b>	<b>1</b>	<b>99,985</b>
	<b>2</b>	<b>0,015</b>
<b>C</b>	<b>12</b>	<b>98,889</b>
	<b>13</b>	<b>1,111</b>
<b>N</b>	<b>14</b>	<b>99,634</b>
	<b>15</b>	<b>0,366</b>
<b>O</b>	<b>16</b>	<b>99,755</b>
	<b>17</b>	<b>0,039</b>
	<b>18</b>	<b>0,206</b>
<b>S</b>	<b>32</b>	<b>95,00</b>
	<b>33</b>	<b>0,76</b>
	<b>34</b>	<b>4,22</b>
<b>Fe</b>	<b>54</b>	<b>5,82</b>
	<b>56</b>	<b>91,66</b>
	<b>57</b>	<b>2,19</b>
	<b>58</b>	<b>4,22</b>

Figura 1. Abundancia natural de diversos isótopos de elementos presentes en la materia orgánica.

La abundancia de los isótopos estables se cuantifica en unidades delta, en tanto por mil (con una precisión de  $\pm 0,1\%$ ). Es una medida comparativa de la relación existente entre el isótopo más pesado y el más ligero entre la muestra a medir y un material de referencia. Para el carbono, sería la relación  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  en la muestra comparado con su material de referencia. Éste es un estándar internacional llamado PDB (Pee Dee Belemnita), un carbonato en el que, por tanto, su composición en delta  $^{13}\text{C}$  se considera como cero. Materiales con riqueza en  $^{13}\text{C}$  superior al PDB tendrán deltas  $^{13}\text{C}$  positivos y aquéllos en los que la abundancia en  $^{13}\text{C}$  sea menor que en el estándar PDB tendrán valores negativos de delta:



$$\delta \text{‰} = (R_{\text{muestra}} / R_{\text{estándar}} - 1) \times 1000$$

Para **Carbono**  $R = \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}$      $\delta^{13}\text{C} \rightarrow \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}_{\text{Muestra vs.}} \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}_{\text{Estándar}}$

Referencia **PDB**     $\delta^{13}\text{C PDB} = 0$

Para el nitrógeno la abundancia isotópica vendría dada por la relación  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  en la muestra, comparada con la obtenida en su material de referencia, en este caso, nitrógeno del aire ambiental, que tiene asignado un valor en delta  $^{15}\text{N}$  igual a cero. Análogamente a lo indicado en el caso del carbono, materiales con riqueza en  $^{15}\text{N}$  superior al aire ambiente tendrán deltas  $^{15}\text{N}$  positivos y aquellos en los que la abundancia en  $^{15}\text{N}$  sea menor que en el aire ambiente tendrán valores negativos de delta:

$$\delta \text{‰} = (R_{\text{muestra}} / R_{\text{estándar}} - 1) \times 1000$$

Para **Nitrógeno**  $R = \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}}$      $\delta^{15}\text{N} \rightarrow \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}}_{\text{Muestra vs.}} \frac{^{15}\text{N}}{^{14}\text{N}}_{\text{Estándar}}$

Referencia **N<sub>2</sub> aire ambiental**     $\delta^{15}\text{N aire} = 0$

Para cuantificar las relaciones entre los distintos isótopos de los elementos de un material se utilizan **espectrómetros de masas**. Aunque hay de varios tipos, unos más complejos que otros, en todos ellos es posible cuantificar la relación de masas



atómicas que nos interese. En estos equipos, el carbono presente en la muestra se transforma en  $\text{CO}_2$ , de modo que obtendremos la relación  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$ , es decir, la relación de masas 45/44 (Valor de R), tanto en la muestra problema como en el compuesto de referencia. En el caso del nitrógeno, la relación que se cuantifica es la 29/28 ( $^{15}\text{N}^{14}\text{N}/^{14}\text{N}^{14}\text{N}$ ), pues el nitrógeno se transforma en  $\text{N}_2$ , esto es, moléculas de nitrógeno, formadas por dos átomos de nitrógeno.

Ya se ha dicho que los isótopos de un elemento pueden tener distintas propiedades físicas. Esto da lugar a que no estén distribuidos de forma homogénea entre los organismos vivos, sino que se produzca el efecto conocido como **fraccionamiento isotópico**. Un claro ejemplo de este fraccionamiento es el que ocurre en las plantas según el ciclo fotosintético que utilicen. Es conocido que las plantas C3, (la mayoría de las plantas superiores, entre ellas, la mayoría de los cereales, que fijan el  $\text{CO}_2$  vía *ciclo de Calvin*, (con reducción del  $\text{CO}_2$  a fosfoglicerato, de 3 átomos de carbono), presentan una menor riqueza en  $^{13}\text{C}$  que las plantas C4, entre las que se encuentra el maíz, que reducen el  $\text{CO}_2$  a ácido aspártico o málico, de 4 átomos de carbono, en el ciclo de *Hatch y Slack*. En las plantas C3 encontramos valores para delta  $^{13}\text{C}$  cercanos a -28, mientras que en las C4, con mayor riqueza en  $^{13}\text{C}$ , este valor se aproxima a -12. Por esta razón los valores del cociente  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  en los pastos de zonas templadas y frías (C3) son menores que los de las zonas tropicales (con mayor abundancia de especies C4) (aproximadamente -28 vs. -12‰; Minson y col., 1975) y estos valores se reflejan en los tejidos de los animales alimentados con uno u otro tipo de plantas (Minson y col., 1975; de Niro y Epstein, 1978; Tieszen y col., 1979; Metges y col., 1990). En otras palabras, la ingestión de plantas C4 eleva significativamente el contenido en  $^{13}\text{C}$  de los tejidos del animal.

En el caso del nitrógeno la relación entre la composición isotópica de la dieta y de los tejidos animales ha sido estudiada en menor medida que para el carbono. Como sabemos el N es otro de los elementos más abundantes en los organismos vivos, principalmente como elemento constitutivo de proteínas y ácidos nucleicos. El aire es la fuente principal de nitrógeno; sin embargo, pocas especies pueden convertir el nitrógeno atmosférico en formas útiles para los organismos vivos. La etapa inicial es la fijación del nitrógeno atmosférico que llevan a cabo bacterias fijadoras que producen amoníaco, el cual puede ser oxidado a  $\text{NO}_2^-$  o  $\text{NO}_3^-$  por bacterias del suelo o incorporado a aminoácidos en los nódulos de las raíces de las leguminosas. Además, si tiene lugar fraccionamiento isotópico (uso preferencial de uno u otro isótopo) en mayor o menor medida durante la incorporación del nitrógeno a los tejidos de la planta, este fraccionamiento puede conducir a niveles distintos de abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  entre plantas o entre partes de planta, dependiendo de las vías metabólicas implicadas.

Son varios procesos en los que se observa un fraccionamiento isotópico del N, es decir, que los dos isótopos el  $^{14}\text{N}$  y el  $^{15}\text{N}$  no se encuentren distribuidos de forma homogénea en la naturaleza:

- Se ha demostrado que las plantas asociadas a las bacterias fijadoras de N (*Rhizobium*), las leguminosas, presentan valores de  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  más bajos que las plantas no fijadoras de N. Su enriquecimiento en  $^{15}\text{N}$  es próximo al del aire ambiental.
- En el organismo animal, el N corporal tiende a enriquecerse en  $^{15}\text{N}$ , mientras que el N que se elimina en orina (urea en mamíferos, también en ácido úrico en aves y amonio en peces) tiende a empobrecerse en  $^{15}\text{N}$ .

Varios estudios han constatado la existencia de un efecto por el cual al aumentar un eslabón en la **cadena trófica**, se produce un incremento de aproximadamente dos deltas en la abundancia en  $^{15}\text{N}$  en el organismo. Esto es lo que se representa en la Figura 2, en la que vemos sucesivos incrementos de dos deltas entre las plantas, los animales herbívoros, los omnívoros y los carnívoros, respectivamente. Sin embargo, no se conocen los procesos biológicos que conducen a este fraccionamiento isotópico del N en el organismo de los animales y que nos permitan explicar con propiedad la relación entre la composición isotópica de la dieta y de los tejidos animales. Más aún, no sólo los procesos biológicos determinan el fraccionamiento isotópico, sino que es notoria la existencia de factores ajenos al organismo animal (geológicos, geográficos, climáticos, etc.) que pueden ejercer influencia sobre ellos.

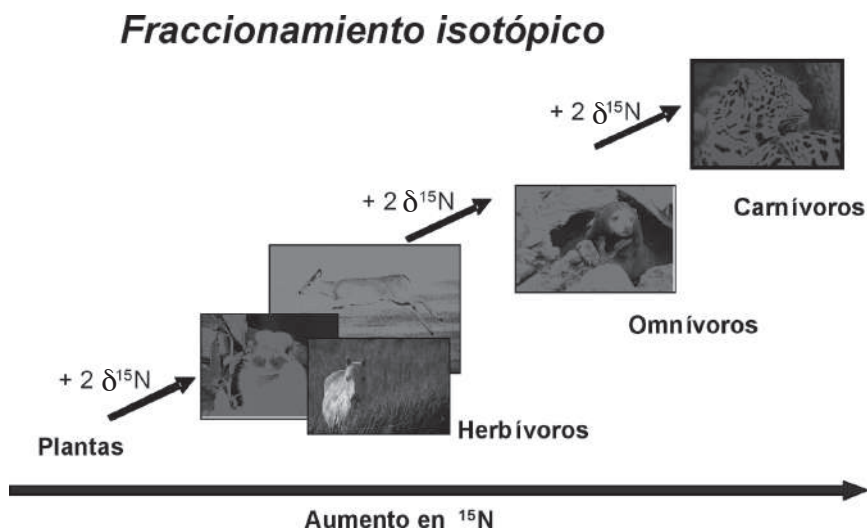


Figura 2. Aumento de la abundancia de  $^{15}\text{N}$  en el organismo conforme a su posición más elevada en la cadena trófica.

## MÉTODOS DE LABORATORIO APLICADOS A LA TRAZABILIDAD DE LOS PRODUCTOS DERIVADOS DEL CERDO IBÉRICO

Entre los métodos existentes para clasificar los productos derivados del cerdo Ibérico según el régimen alimenticio seguido durante la etapa final de cebo, el más comúnmente utilizado descansa en el análisis de las proporciones relativas de los ácidos grasos en la grasa subcutánea, o en otros tejidos, por cromatografía de gases (Cava y col., 1997; Ruiz y col., 1998; García-Olmo y col., 2002; García-Olmo y De Pedro, 2002). Esta técnica requiere cierto tiempo y no siempre discrimina satisfactoriamente (Porras-Tejeiro, 2009). La tecnología NIRS, basada en el análisis de los espectros en el infrarrojo próximo procedentes de preparaciones de productos derivados curados o en fresco (e incluso con posibilidades de aplicación "on line"), abre nuevas perspectivas para diferenciar el régimen alimenticio empleado a partir de modelos desarrollados con espectros NIRS e información de campo (García-Olmo y De Pedro, 2002). Adicionalmente, se ha propuesto el análisis isotópico del carbono (González-Martín y col., 1999) o de carbono y azufre (González-Martín y col., 2001) en tejido adiposo e hígado para discriminar la alimentación con bellota de la llevada a cabo con piensos o ingredientes comerciales. Seguidamente describimos sucintamente un grupo de trabajos de referencia en este campo.

Son varios los estudios publicados que se han realizado en el cerdo Ibérico en los que se ha pretendido identificar la dieta del animal mediante el análisis isotópico de sus tejidos. González-Martín y col. (1999) relacionan la abundancia de  $^{13}\text{C}$  en los tejidos del cerdo ibérico con la alimentación recibida por el animal. Los experimentos se realizaron con cerdos Ibéricos puros y cruzados Ibérico x Duroc 75:25, sometidos a distinto tipo de alimentación durante el tiempo necesario para reponer 5 arrobas. Un grupo consumió sólo pienso comercial; otros, exclusivamente bellota o ésta complementada con pienso comercial, formulado a base de cebada, trigo y harina de torta de soja. Tras el sacrificio, se tomaron muestras en tejido adiposo (grasa dorsal a 5 cm de la cola), hígado y músculo (del jamón). Estos autores determinaron la riqueza en  $^{13}\text{C}$  de distintos ingredientes utilizados en las dietas comerciales para cerdos, lo que les permitió observar que los ingredientes utilizados en el pienso comercial de este experimento presentaban una riqueza en  $^{13}\text{C}$  entre -22 y -25 deltas, y otros ingredientes, como el gluten de maíz y el maíz, alrededor de -11 deltas de  $^{13}\text{C}$ , como corresponde a una planta C4. La bellota muestra un valor de deltas en  $^{13}\text{C}$  entre -21 y -24 deltas, propio de una planta C3. Este trabajo muestra que los análisis de la relación  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  en músculo no permitían discernir sobre el tipo de alimentación recibida por el animal, ya que no existían diferencias en fraccionamiento isotópico entre los animales

que habían repuesto 5 arrobas alimentándose con bellota y los cebados con pienso. Sí aparecían diferencias entre las muestras de hígado y tejido adiposo, con valores menos enriquecidos en  $^{13}\text{C}$  en las muestras de bellota (-0,51  $\delta$  y -1,73  $\delta$ , respectivamente). La diferencia, bastante más amplia en el caso del tejido adiposo, les permite concluir que este tejido era el idóneo para realizar la comparación. De aquí que, utilizando datos de composición isotópica en tejido adiposo, establecieran una regresión lineal entre la riqueza en  $^{13}\text{C}$  y las arrobas de bellota recibidas (x):

$$\delta^{13}\text{C} = -22,12 - 0,35 x; r = 0,982; s = 0,1\text{‰}$$

Lamentablemente, no se especifica el número de animales en el que se basa la relación, información esencial, bajo nuestro punto de vista, para su posible utilización. En un trabajo posterior estos mismos autores hacen uso del análisis de  $^{13}\text{C}$  y de  $^{34}\text{S}$ , un isótopo estable del azufre, para la discriminación de la dieta en el cerdo Ibérico (González-Martín y col., 2001). Los experimentos se realizaron con cerdos de genotipo Ibérico x Duroc 75:25 y cerdos blancos. Los cerdos Ibéricos hicieron una reposición de 5 arrobas con bellota o exclusivamente con pienso; los cerdos de capa blanca recibieron exclusivamente pienso. Los análisis isotópicos se realizaron sobre muestras de hígado. Los autores presentan la composición isotópica en  $^{13}\text{C}$  y  $^{34}\text{S}$  en distintos ingredientes utilizados para la fabricación de piensos, al igual que en caso anterior. Cabe destacar la mayor riqueza relativa en  $^{34}\text{S}$  de la bellota ( $\delta^{34}\text{S} = 9,12$ ) respecto a otros recursos alimenticios ( $\delta^{34}\text{S} = 7,93 - 2,64$  para leguminosas y cereales), por lo que es de esperar mayor riqueza relativa de este isótopo en los cerdos alimentados con bellota. Al analizar el tejido hepático obtuvieron diferencias de 1,8 deltas  $^{13}\text{C}$  entre cerdos Ibéricos de bellota y de pienso, y una diferencia mayor, 2,21 deltas  $^{13}\text{C}$  entre cerdos Ibéricos de bellota y cerdos blancos. Estos últimos y los cerdos Ibéricos de pienso presentaban valores de delta  $^{13}\text{C}$  muy similares. El análisis de  $^{34}\text{S}$  discriminaba bien las muestras de cerdo Ibérico de bellota y cerdo Ibérico de pienso, con una diferencia de 2,5 deltas, pero los cerdos Ibéricos de bellota presentaban valores similares a los cerdos de capa blanca. La combinación de ambos análisis permitió una mejor diferenciación de los tres grupos de muestras, como podemos apreciar en la Figura 3.

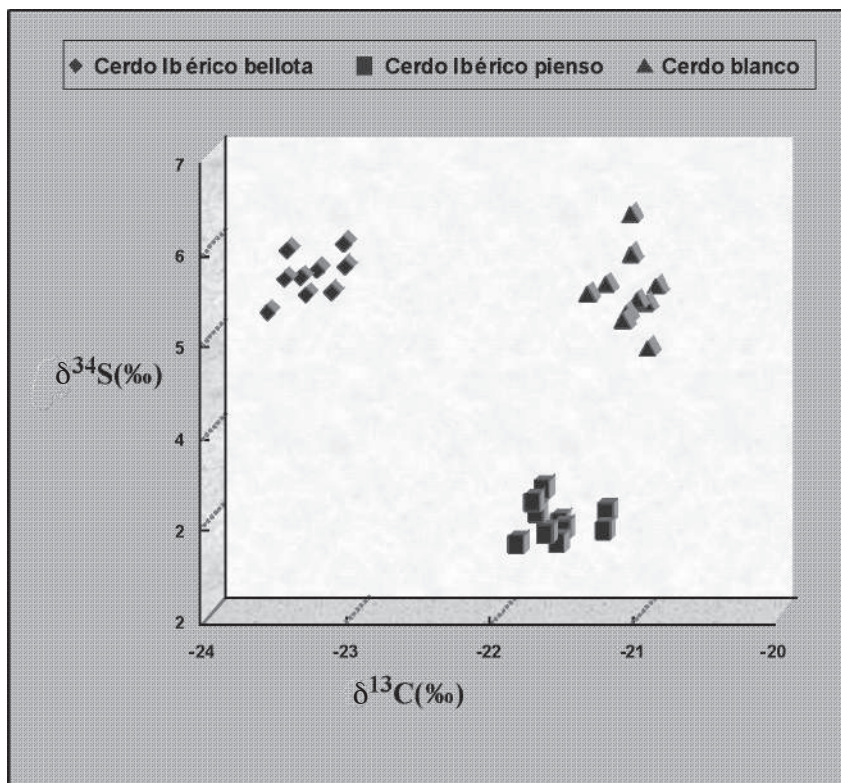


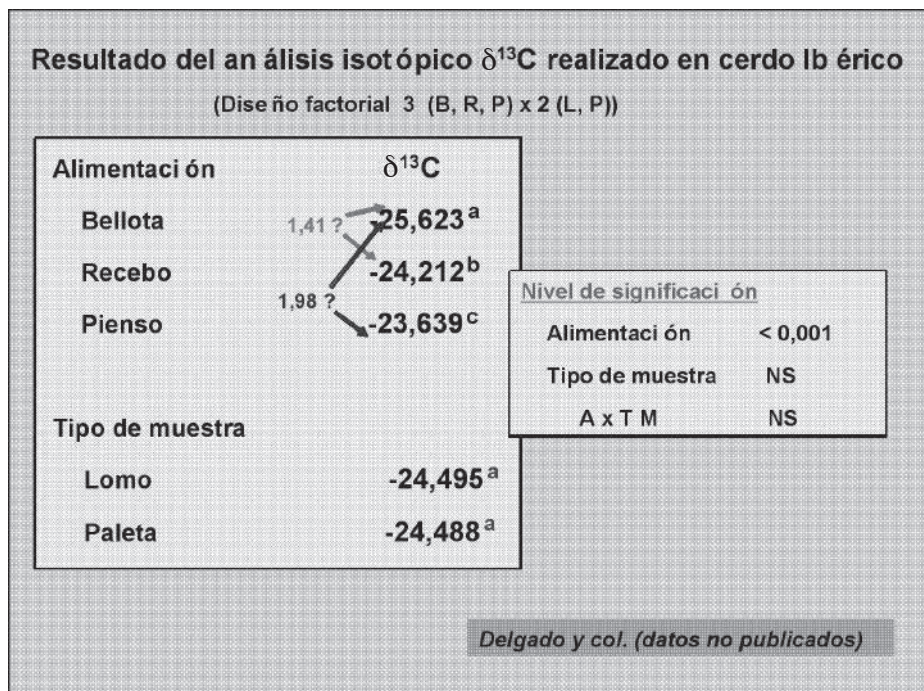
Figura 3.  $\delta^{34}\text{S}$  y  $\delta^{13}\text{C}$  en muestras de hígado de cerdos Ibéricos cruzados y cerdos de capa blanca alimentados con bellota o pienso (González-Martín y col., 2001)

Más recientemente se ha aplicado el análisis isotópico  $\delta^{13}\text{C}$  a ésteres metílicos de los ácidos grasos de grasa fundida en horno de microondas, proveniente de tejido adiposo de cerdos sometidos a distinto tipo de alimentación (Recio, 2010). Las determinaciones isotópicas se llevan a cabo en un espectrómetro de masas de flujo continuo al que se acopla un cromatógrafo de gases mediante una interfase constituida por un horno de combustión. En el caso que nos ocupa, los ésteres metílicos separados por cromatografía capilar pasan al detector del cromatógrafo, para su detección y cuantificación, o a través de la unidad de combustión, donde el carbono se oxida completamente a  $\text{CO}_2$ , al espectrómetro en que se realiza su análisis isotópico. Esta técnica puede resolver problemas de mayor complejidad como los que puede generar la incorporación a los piensos de grasas animales y aceites vegetales, con perfil de ácidos grasos que pudiera aproximarse al que se observa en un animal cebado en montanera. Dado que en todas las muestras están presentes los ácidos oleico (C18:1),

palmítico (C16:0), linoleico (C18:2) y esteárico (C18:0), sus ésteres metílicos son los utilizados para discernir sobre el tipo de alimentación que tuvo el animal. De estos ácidos, el oleico es buen discriminante. Los valores de  $\delta^{13}\text{C}_{\text{C18:1}}$  son muy bajos, inferiores a  $-25,9\text{‰}$  si el cerdo del que procede la muestra analizada consumió exclusivamente bellota en su fase de cebo, previa al sacrificio. Cuando el análisis se realiza en muestras de cerdos alimentados con piensos el análisis isotópico es de más compleja interpretación, si bien el estudio conjunto de las abundancias isotópicas de los cuatro ácidos grasos discrimina con claridad al animal cebado a pienso respecto al de bellota o recebo, este último de discriminación más problemática, lo que es explicable por la amplia variabilidad que puede existir en ingredientes que formen parte del pienso complementario a la bellota y por las características del manejo nutricional. En este punto el análisis isotópico  $\delta^{15}\text{N}$  puede ser muy eficaz como discriminante. Los datos que aporta nuestro propio trabajo, que describimos seguidamente, son de reveladores al respecto.

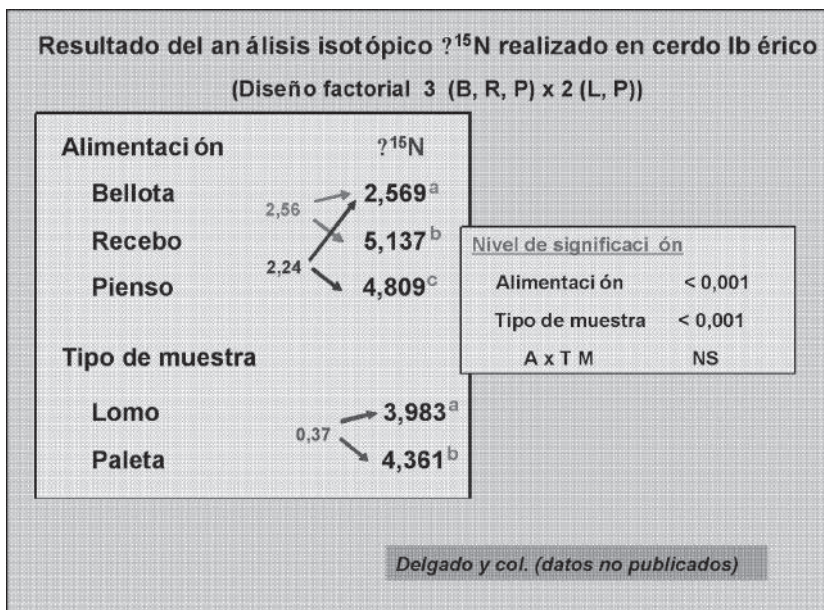
En colaboración con el grupo de Biogeoquímica de Isótopos Estables de la Estación Experimental del Zaidín y Sánchez Romero Carvajal Jabugo nuestro grupo de investigación llevó a cabo un estudio en el que se emplearon muestras de 75 cerdos Ibéricos puros de la estirpe Silvela, procedentes de la citada empresa (Delgado y col., resultados no publicados). Los animales se distribuyeron al azar en tres lotes homogéneos y recibieron al alcanzar los 100 Kg de peso vivo, uno de los siguientes tratamientos: Sólo bellota; bellota y pienso, o sólo pienso. Al sacrificio, realizado a los 160 Kg de peso, se tomaron muestras de lomo y paleta. En estas muestras se analizó la riqueza en  $^{13}\text{C}$  y en  $^{15}\text{N}$  aplicando un análisis factorial 3 (alimentación: bellota, recebo y pienso)  $\times$  2 (tipo de muestra: lomo y paleta). Los resultados del análisis isotópico  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  son los que figuran en el siguiente esquema:





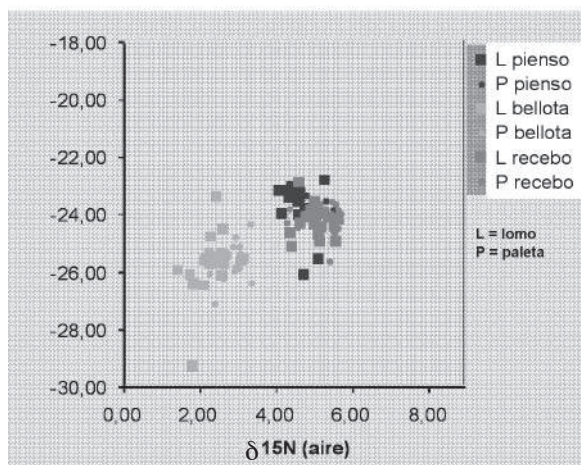
Observamos un efecto muy significativo de la alimentación recibida por el animal ( $P < 0,001$ ). Como en los estudios anteriores, los animales alimentados con bellota presentaban menor riqueza relativa de  $^{13}\text{C}$  respecto a los que no habían recibido bellota. Las diferencias entre grupos fueron de 1,41 deltas entre las muestras de bellota y recebo, y de 1,98 entre bellota y pienso. La diferencia entre los grupos de recebo y pienso fue de tan sólo 0,57 deltas. No obtuvimos diferencias en riqueza en  $^{13}\text{C}$  entre los dos tipos de músculos empleados.

También se obtuvo un efecto muy significativo al analizar la riqueza en  $^{15}\text{N}$  de las muestras de músculo ( $P < 0,001$ ). En este caso, además los valores eran significativamente distintos en los dos tipos de muestras empleados ( $P < 0,001$ ). Las muestras de músculo de los cerdos alimentados con bellota presentaban menor riqueza relativa en  $^{15}\text{N}$  respecto a los otros dos tipos de muestras. Las diferencias entre las muestras de los cerdos que habían recibido bellota y los otros dos grupos eran de mayor amplitud que las obtenidas en el caso del carbono: 2,56 deltas de  $^{15}\text{N}$  respecto a los de recebo y 2,24 deltas respecto a los de pienso. La diferencia entre los grupos de recebo y pienso fue de sólo 0,33 deltas, aunque también significativa. Las muestras de lomo y paleta presentaban una diferencia de tan sólo 0,37 deltas de  $^{15}\text{N}$ , pero muy significativa. Todo ello aparece en el siguiente esquema:



Al combinar todos los datos, observamos un grupo bien diferenciado correspondiente a las muestras de lomo y paleta de los cerdos de bellota, representado en verde, mientras que las muestras de recebo y pienso tienden a formar un grupo común no diferenciado.

**Resultados del estudio de trazabilidad mediante isótopos estables de C y de N en el cerdo Ibérico**





Nuestra conclusión es que la técnica es prometedora, discrimina bien las muestras de músculo de los cerdos de bellota, pero no los de recebo y pienso. Además, habría otros factores a tener en cuenta y que podrían afectar estas variables, como la localización geográfica, el lugar anatómico del muestreo, etc. Existen, pues, aspectos que sugieren la utilidad de esta técnica isotópica para la identificación de la alimentación recibida por el cerdo Ibérico en su fase final de cebo. Sin embargo, hay otros que requieren un estudio más profundo y sistemático, antes de que pueda ser efectivamente un método alternativo o complementario a los ya existentes en análisis de trazabilidad.

## BIBLIOGRAFÍA

- Barea, R., Nieto, R., Lara, L., García, M.A., Vilchez, M.A., Aguilera, J.F. 2006. Effects of dietary protein content and feeding level on carcass characteristics and organ weights of Iberian pigs growing between 50 and 100 kg body weight. *Animal Science* 82, 405- 413.
- Barea, R., Nieto, R., Aguilera J.F. 2007. The effects of dietary protein content and feeding level on protein and energy metabolism in Iberian pigs growing from 50 to 100 kg body weight. *Animal* 1, 357-365.
- Bocherens, H., Fizet, M., Mariotti, A. 1994. Diet, physiology and ecology of fossil mammals as inferred from stable carbon and nitrogen isotope biogeochemistry: implications for Pleistocene bears. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 107, 213-225.
- Cava, R., Ruiz, J., López-Bote, C, Martín, L., García, C., Ventanas, J., Antequera, T. 1997. Influence of the finishing diet on fatty acid profiles of intramuscular lipids, triglycerides and phospholipids in muscles of the Iberian pig. *Meat Science* 45, 263-270.
- De Niro, M., Epstein, S. 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42, 495-506.
- De Niro, M., Epstein, S. 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals . *Geochimica et Cosmochimica Acta* 45, 341-351.
- Fernández-Fígares, I., Lachica, M., Nieto, R., Rivera-Ferre, M.G., Aguilera, J.F. 2007. Serum profile of metabolites and hormones in obese (Iberian) and lean (Landrace) growing gilts fed balanced or lysine-deficient diets. *Livestock Science* 110, 73-81.
- Fernández-Fígares, I., Conde-Aguilera, J.A., Nieto, R., Lachica, M., Aguilera, J.F. 2008. Synergistic effects of betaine and conjugated linoleic acid on growth and carcass composition of growing pigs. *Journal of Animal Science* 86, 102-111.
- García-Olmo, J., De Pedro, E. 2002. Evaluación del régimen alimenticio en canales y productos del cerdo Ibérico. *Sólo Cerdo Ibérico* 8, 53-59.
- García-Olmo, J., De Pedro, E., Garrido, A., Paredes, A., Sanabria, C., Santolalla, M., Salas, J., García-Hierro, J. R., González, I., García-Cachan, M.D., Guirao, J. 2002. Determination of the precision of the fatty acid analysis of Iberian pig fat by gas chromatography. Results of a mini collaborative study. *Meat Science* 60, 103-109.
- García-Valverde, R., Nieto, R., Lachica, M., Aguilera, J.F. 2007. Effects of herbage ingestion on the digestion site and nitrogen balance in heavy Iberian pigs fed on an acorn-based diet. *Livestock Science* 112, 63-77.
- García-Valverde, R. Barea, R., Lara, L., Nieto, R., Aguilera, J.F. 2008. The effects of feeding level upon protein and fat deposition in Iberian heavy pigs. *Livestock Science* 114, 263-273.

- González-Martín, I. González-Pérez, C., Hernández Méndez, J., Marqués-Macías, E., Sanz Póveda, R. 1999. Use of isotope analysis to characterize meat from Iberian breed swine. *Meat Science* 52, 437-441.
- González-Martín, I. González-Pérez, C., Hernández Méndez, J., Sánchez González, C. 2001. Differentiation of dietary regimen of Iberian swine by means of isotopic analysis of carbon and sulphur in hepatic tissue. *Meat Science* 58, 25-30.
- Hatch, M.D., Slack, C.R. 1966. Photosynthesis by sugarcane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochemistry Journal* 101, 103-111.
- Lachica, M., 1993. Estimación del gasto energético de la actividad física en ganado caprino. Comparación de técnicas calorimétricas y no calorimétricas. Tesis doctoral, Universidad de Granada.
- Lachica, M., Aguilera, J.F. 2003. Estimation of energy needs in the free-ranging goat with particular reference to the assessment of its energy expenditure by the  $^{13}\text{C}$ -bicarbonate method. *Small Ruminant Research* 49: 303-318.
- Lachica, M., Aguilera, J.F. 2000. Estimation of the energy costs of locomotion in the Iberian pig (*Sus mediterraneus*). *British Journal of Nutrition* 83, 35-41.
- MARM. 2010. <http://www.marm.es/>
- Metges, C., Kempe, K., Schmidt H-L. 1990. Dependence of the carbon isotope contents of breath carbon dioxide, milk, serum and rumen fermentation products on the  $\delta^{13}\text{C}$  value of food in dairy cows. *British Journal of Nutrition* 63, 187-196.
- Minson, D. J., Ludlow, M. M., Troughton, J. H. 1975. Differences in natural carbon isotope ratios of milk and hair from cattle grazing tropical and temperate pastures. *Nature* 256 (5518), 602.
- Nieto, R., Lara, L., García, M.A., Gómez, F., Zalvide, M., Cruz, M., Pariente, J.M., Moreno, A., Aguilera, J.F. 2001. Evaluación de un sistema integrado de alimentación en el cerdo Ibérico. Análisis del consumo de alimento e índices productivos. *Sólo Cerdo Ibérico* 6, 57-69.
- Nieto, R., Lara, L., García, M.A., Vílchez, M.A., Aguilera, J.F. 2003. Effects of dietary protein content and feed intake on carcass characteristics and organs weight of Iberian pigs growing from 15 to 50 kg body weight. *Animal Science* 77, 47-56.
- Nieto, R., Miranda, A., García, M.A., Aguilera, J.F. 2002a. The effect of dietary protein content and feeding level on the rate of protein deposition and energy utilization in growing Iberian pigs from 15 to 50 kg body weight. *British Journal of Nutrition* 88, 39-49.
- Nieto, R., Rivera, M., García, M.A., Aguilera, J.F. 2002b. Amino acid availability and energy value of acorn in the Iberian pig. *Livestock Production Science* 77, 227-239.
- Porras-Tejeiro, C.J., Pérez Almero, J.L., Brun Esquiliche, P., Casas Millán, C. 2009. Validez analítica de los ácidos grasos en cerdo Ibérico. *Sólo Cerdo Ibérico*, 21, 85-89.
- Prieto, C, Lachica, M., Nieto, R., Aguilera, J.F. 2001. The  $^{13}\text{C}$ -bicarbonate method: its suitability for estimating the energy expenditure in grazing goats. *Livestock Production Science* 69, 207-215.
- Privat, K. L., O'Connell, T. C., Richards, M.P. 2002. Stable isotope analysis of human and faunal remains from the Anglo-Saxon cemetery at Berinsfield, Oxfordshire: Dietary and social implications. *Journal of Archaeological Science* 29, 779-790.
- Recio, C. 2010. Métodos isotópicos como herramienta para determinar la alimentación aportada al cerdo Ibérico (GC-C-IRMS de ácidos grasos y otras técnicas). *Sólo cerdo Ibérico* 23, 29-45.
- Rivera-Ferre, M.G., Aguilera J.F., Nieto, R. 2005. Muscle fractional protein synthesis is higher in Iberian than in Landrace growing pigs fed adequate or lysine deficient diets. *Journal of Nutrition* 135, 469-478.
- Rivera-Ferre, M.G., Aguilera J.F., Nieto, R. 2006. Differences in whole-body protein turnover between Iberian and Landrace pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *Journal of Animal Science* 84, 3346-3355.

- Ruiz, J., Cava, R., Antequera, T., Martín, L., Ventanas, J., López-Bote, C. 1998. Prediction of the feeding background of Iberian pigs using the fatty acid profile of subcutaneous fat, muscle and hepatic fat. *Meat Science* 49, 155-163.
- Tieszen, L. L., Hein, D., Qvortrup, S. A., Troughton, J. H., Imbamba, S. K. 1979. Use of  $\delta^{13}\text{C}$  values to determine vegetation selectivity in East African herbivores. *Oecologia* 37, 351-359.



# LAS PROTEINAS DE FASE AGUDA COMO BIOMARCADORES DE BIENESTAR Y NIVEL SANITARIO DE LAS EXPLOTACIONES DE PORCINO

RODRÍGUEZ-GÓMEZ IM <sup>1</sup>, BARRANCO I <sup>1</sup>, PALLARÉS FJ <sup>2</sup>, RODRÍGUEZ-ESTÉVEZ V <sup>3</sup>, GÓMEZ-LAGUNA J <sup>4</sup>, CARRASCO L <sup>1</sup>

La respuesta de fase aguda es el conjunto de mecanismos que se producen en el hospedador como respuesta a cambios externos o internos, como infecciones, inflamaciones, cirugías o situaciones de estrés (Eckersall, 2000; Ceciliani *et al.*, 2002; Gruys *et al.*, 2005). Durante esta respuesta se va a producir un cambio en la concentración de determinadas proteínas sanguíneas, denominadas proteínas de fase aguda (PFA). Las PFA se encuadran dentro de la respuesta inmune innata involucrada en la restauración de la homeostasis y el control de infecciones (Gabay and Kushner, 1999; Murata *et al.*, 2004; Piñeiro C *et al.*, 2007; Piñeiro M *et al.*, 2007).

La alteración de la homeostasis va a producir por un lado la activación del eje simpático-adrenal, con la liberación de catecolaminas por parte de la médula adrenal, y por otro la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, con la liberación de glucocorticoides (Leonard, 2005) (Figura 1). Estas catecolaminas activan a diferentes células inmunes, como los macrófagos, linfocitos,... (Steptoe *et al.*, 2001), que a su vez liberarán diversas citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la interleuquina-1 (IL-1 $\beta$ ) y la interleuquina-6 (IL-6). A su vez,

---

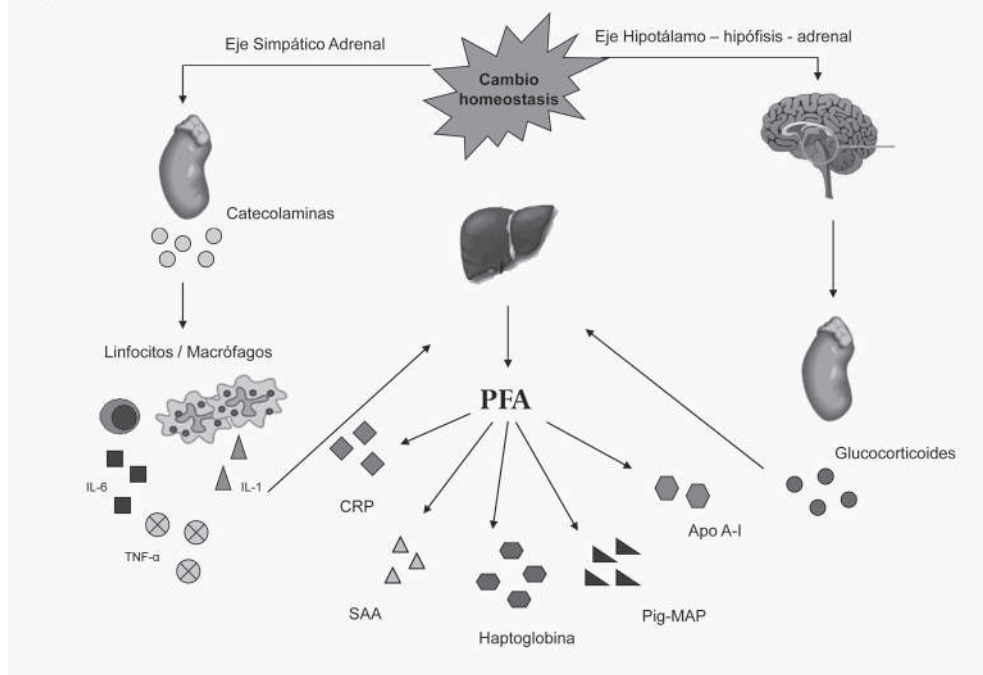
<sup>1</sup> Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba.

<sup>2</sup> Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia

<sup>3</sup> Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba

<sup>4</sup> Centro de Investigación y Calidad Agroalimentaria del Valle de los Pedroches (CICAP), Pozoblanco, Córdoba  
e-mail: [irenero22@hotmail.com](mailto:irenero22@hotmail.com)

Figura 1: Mecanismo de inducción de PFA.



la síntesis de glucocorticoides y de citoquinas pro-inflamatorias pueden provocar la disminución o aumento en la producción y liberación de PFA (Baumann and Gaudie, 1994; Murtaugh *et al.*, 1994; Gruys *et al.*, 1999; Eckersall, 2000; Petersen *et al.*, 2004; Murata, 2007).

En la mayoría de los estudios realizados sobre las PFA se ha analizado su papel como marcadores de infección y/o inflamación, relacionándose sus niveles en sangre con la severidad del desorden (Chen *et al.*, 2003) y describiéndose que estos niveles de producción pueden estar incrementados (son las denominadas PFA positivas) o disminuidos (PFA negativas). Además, dentro de las PFA positivas, se diferencian aquellas en las que se produce un cambio en la concentración mayor, intermedio o menor (Kushner and Mackiewicz, 1987; Steel and Whitehead, 1994). El patrón de respuesta de PFA es específico de especie, considerándose a la haptoglobina (Hp), la proteína C reactiva (CRP), la amiloide sérica A (SAA) y la proteína de fase aguda mayor porcina (pig Major Acute-phase Protein, pig-MAP) como las principales PFA positivas porcinas (Kushner and Mackiewicz, 1987; Lampreave *et al.*, 1994; González-Ramón *et al.*, 1995; Heegaard *et al.*, 1998; Hultén *et al.*, 2003; Carpintero *et al.*, 2005). Mientras que la Apolipoproteína A-I (Apo A-I) y la albúmina sérica son consideradas

como las principales PFA negativas de esta especie (Carpintero *et al.*, 2005), aunque en la mayoría de las investigaciones realizadas se han centrado en la Apo A-I.

## PRINCIPALES PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EN EL CERDO

La Hp es considerada como una de las PFA de mayor valor diagnóstico y su función biológica más importante consiste en la prevención de la pérdida de hierro por la formación de complejos hierro-hemoglobina (Ceciliani *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2002), lo que le confiere un efecto bacteriostático, al reducir los niveles de hierro que muchos microorganismos requieren para crecer (Petersen *et al.*, 2004) (Figura 2). La expresión de esta proteína también se ha relacionado con la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, principalmente IL-10, a través de la interacción con el receptor CD163, que es exclusivamente expresado en células de la estirpe monocito/macrófago (Moestrup and Moller, 2004; Philippidis *et al.*, 2004). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual la Hp puede modular la respuesta inmune permanece sin aclarar (Murata and Miyamoto, 1993). El valor de esta proteína puede incrementarse hasta más de 10 veces los valores normales, encontrándose diferencias entre rebaños y, observándose que los niveles en cerdos adultos son más bajos que en hembras o cerdos castrados (Hall *et al.*, 1992; Lipperheide *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 2002). Sin embargo, no se han encontrado diferencias entre razas (Lipperheide *et al.*, 1998).

Figura 2: Principales funciones biológicas de las PFA.

PFA	Función biológica principal
Hp	Bacteriostática
CRP	Quimiotaxis de neutrófilos
SAA	Quimiotaxis de monocitos, macrófagos, linfocitos T y neutrófilos
Pig-MAP	Sin determinar
Apo A-I	Modulación de la inflamación

La CRP es considerada como un bioindicador temprano del estatus sanitario (Stevenson *et al.*, 2006) y está relacionada con la opsonización y activación del complemento cuando se produce una infección o daño tisular, activando a los monocitos/macrófagos que producirán citoquinas pro-inflamatorias, facilitando la quimiotaxis de neutrófilos, por lo que se activaría y potenciaría la respuesta de fase aguda (Ceciliani *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2004). Los valores de esta PFA no se incrementan tanto como los de Hp, normalmente se encuentran entre 1 a 10 veces por encima de los valores normales (Petersen *et al.*, 2004).

La proteína SAA se relaciona con la quimiotaxis de monocitos, linfocitos T y neutrófilos, así como con la activación de las plaquetas (Ceciliani *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2004) (Figura 2). Al igual que la Hp, sus valores en el curso de una respuesta de fase aguda pueden verse incrementados por encima de 10 veces (Petersen *et al.*, 2004).

Las funciones biológicas de la pig-MAP no están totalmente claras, debido a que se trata de una proteína relativamente reciente. De acuerdo a la cinética seguida por esta proteína, existen diferencias sobre el incremento en los valores de concentración sérica, existiendo autores que encontraron un incremento por encima de 10 veces (Petersen *et al.*, 2004), mientras que otros sugieren que solo se produce un aumento moderado (Parra *et al.*, 2006).

La Apo A-I es una proteína asociada con lipoproteínas de alta densidad involucradas en la modulación de la inflamación (Burger and Dayer, 2002), describiéndose que disminuye la concentración de esta proteína durante infecciones e inflamaciones agudas, con valores hasta 10 veces inferiores a los normales (Carpintero *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2005).

## LAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA Y EL BIENESTAR:

El análisis de las PFA es considerado como una herramienta útil en la monitorización del bienestar y del estado de salud del cerdo (Eckersall, 2000; Petersen *et al.*, 2004) ya que puede utilizarse como un método de screening primario para posteriormente pasar a un diagnóstico específico de los procesos que afectan al estado del animal (Chen *et al.*, 2003). Al poder evaluar el estado del bienestar, estas proteínas pueden ser utilizadas para determinar el nivel de estrés que presentan los animales cuando llegan al matadero, ya que este proceso tiene una gran influencia en la calidad de la carne y, por tanto, en el valor del producto final (Piñeiro M *et al.*, 2007).



Existen numerosos estudios que avalan la utilización de las PFA como biomarcadores del estrés. Estos trabajos se han centrado principalmente en determinar los cambios que se producen en sus niveles después de un transporte prolongado o corto, la adaptación a un nuevo habitáculo y cambios en la alimentación (Figura 3). Cambios que en la mayoría de las ocasiones están agravados por circunstancias inevitables como la carga y descarga, espacios limitados, mezcla con otros animales, menor ventilación y, privación de agua y/o comida (Broom and Johnson, 1993).

Figura 3: PFA utilizadas para evaluar el bienestar animal.

SITUACIÓN	PFA
Transporte prolongado + pobre condición de comodidad	Hp / CRP / pig-MAP
Transporte prolongado + buena condición de comodidad	pig-MAP
Transporte a media distancia + condiciones mínimas exigidas legalmente	Hp / CRP / pig-MAP / Apo A-I
Transporte prolongado + nuevo alojamiento	Hp / CRP / pig-MAP
Nuevo alojamiento (sin transporte previo)	No variaciones en Hp / pig-MAP / fibrinógeno / glicoproteína $\alpha 1$
Patrón de alimentación ( <i>ad libitum</i> vs. restringido)	Variación Hp / CRP / pig-MAP / Apo A-I sólo en ♂

En transportes prolongados y pobres condiciones de comodidad (1,5m<sup>2</sup>/reproductor, sin virutas, ni alimento ni agua) las PFA Hp, CRP y pig-MAP incrementan sus valores en suero (Murata *et al.*, 2004; Piñeiro M *et al.*, 2007; Salamano *et al.*, 2008). Al mejorar las condiciones (2m<sup>2</sup>/reproductor, con viruta y provisiones de alimento y agua) es la pig-MAP la mejor predictora del estrés debido al transporte (Piñeiro M *et al.*, 2007). En transportes a media distancia (12 horas) y en condiciones mínimas exigidas legalmente (0,35m<sup>2</sup>/animal) todas las PFA positivas del cerdo incrementan sus valores, así como, también se produce una disminución de la PFA negativa Apo A-I (Piñeiro M. *et al.*, 2007).

La Hp, CRP y pig-MAP no sólo reflejan el estrés debido al transporte, sino también la adaptación a un nuevo alojamiento después de un transporte prolongado,

como consecuencia del nuevo ambiente, manejo y mezcla de animales (Salamano *et al.*, 2008). Sin embargo, los cambios en los sistemas de alojamiento sin un transporte previo no parecen provocar un incremento en los niveles de las PFA. Así, los estudios realizados por nuestro grupo de investigación demuestran que no se produce un incremento de pig-MAP al realizar cambios de alojamiento (jaula vs. parque) en cerdas de raza Ibérica. Resultados que son coincidentes con los obtenidos en experiencias similares realizadas en cerdos de cruce industrial en las que no se encontraron diferencias en los niveles de pig-MAP, Hp (Chapinal, 2006; Sorrels *et al.*, 2007), fibrinógeno y glicoproteína  $\alpha 1$  (Sorrels *et al.*, 2007).

En el caso de cambio en el patrón de alimentación (*ad libitum* vs. restringida), los resultados obtenidos muestran una clara diferencia entre machos y hembras. Mientras que las hembras no presentan una variación en los valores de las PFA, los machos ven incrementados sus valores de Hp, CRP y pig-MAP, así como, una disminución de los niveles de Apo A-I, posiblemente debido a una manifestación exacerbada de su comportamiento ante una restricción del alimento, donde la lucha, dominancia y competición por el mismo son más patentes que en las hembras (Piñeiro C. *et al.*, 2007).

## LAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA COMO BIOMARCADORES DE INFECCIONES:

Los niveles de PFA también se van a ver incrementados durante el curso de infecciones (Figura 4), tanto de origen bacteriano como vírico, siendo considera la Hp como el principal biomarcador, ya que, en todos los casos su concentración se encontró incrementada. El resto de PFA muestra un diferente patrón de presentación según la enfermedad.

En infecciones mixtas con *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida* tipo D no variaron los niveles séricos de ninguna PFA, a excepción de la Hp (Francisco *et al.*, 1996). En el caso de *Actinobacillus pleuropneumoniae* o *Streptococcus suis*, todas las PFA positivas incrementaron sus valores, que en el caso de *S. suis* también se acompañó de una disminución de la concentración sérica de Apo A-I (Hall *et al.*, 1992; Heegaard *et al.*, 1998; Knura-Deszczja *et al.*, 2002; Hulten *et al.*, 2003). En el caso de la infección por el virus del Síndrome Reproductivo y Respiratorio Porcino, nuestro grupo de investigación (Gómez-Laguna *et al.*, 2009) ha descrito que en suero se produce un incremento de todas las PFA positivas, aunque en las proteínas CRP y SAA, su incremento fue retrasado y ondulante. Adicionalmente, en muestras de saliva y jugo de carne se

Figura 4: PFA utilizadas para evaluar el agente etiológico.

AGENTE ETIOLÓGICO	PFA
<i>Bordetella bronchiseptica</i> + <i>Pasteurella multocida</i> tipo D	Hp
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Hp / CRP / pig-MAP / SAA
<i>Streptococcus suis</i>	Hp / CRP / pig-MAP / SAA / Apo A-I
PRRS	Hp / CRP / pig-MAP / SAA
Aujeszky	Hp
Circovirus porcino tipo II	Hp / CRP / pig-MAP / SAA

ha visto un incremento de Hp y CRP para esta misma enfermedad, encontrándose correlaciones positivas con las muestras séricas (Gutiérrez *et al.*, 2009). En el caso de la enfermedad de Aujeszky sólo se han descrito cambios en la Hp (Parra *et al.*, 2006) y en la infección por Circovirus Porcino tipo II todas las PFA positivas incrementaron sus valores (Segalés *et al.*, 2004; Parra *et al.*, 2006; Stevenson *et al.*, 2006).

En las inflamaciones locales derivadas de una inyección con turpentina se observa un incremento de los niveles de Hp, CRP y pig-MAP (González-Ramón *et al.*, 1995; Eckersall *et al.*, 1999).

#### CONCLUSIÓN:

El estudio de la respuesta de fase aguda puede tener una gran repercusión, ya que, nos permitiría monitorizar el estado de bienestar y salud en el que se encuentra una granja o los animales que llegan a matadero. Además, nos pueden facilitar la detección de enfermedades subclínicas, donde aunque no hay sintomatología aparente, el rendimiento de los animales se ve mermado y, por tanto, se producen graves pérdidas económicas.

Inicialmente, los niveles de PFA se han medido en suero sanguíneo ya que la mayoría de métodos comercializados estaban diseñados para este tipo de muestra. Sin embargo, recientes estudios señalan que el jugo de carne y la saliva son dos muestras alternativas con las que se puede trabajar, ya que el jugo de carne, puede ser una muestra de elección en el matadero y la saliva es una muestra biológica fácil de obtener del animal vivo con una mínima manipulación.

Sin embargo, no deben de considerarse valores aislados de las PFA como diagnósticos, sino que debemos de utilizar el análisis de la cinética de estas PFA como biomarcadores y después establecer el diagnóstico mediante las técnicas específicas de cada enfermedad.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias al Proyecto financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación AGL2009-12438 y a una Beca del Programa de Formación del Profesorado Universitario (AP2007-02607).

## BIBLIOGRAFÍA

- Baumann, H., Gaudie, J.**, 1994. The acute phase response. *Immunol. Today* 15, 74-80.
- Broom, D.M., Johnson, K.G.**, 1993. *Stress and Animal Welfare*. Animal Behaviour Series. Chapman and Hall, London.
- Burger, D., Dayer, J.M.**, 2002. High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation? *Autoimmun Rev.* 1, 111-7.
- Carpintero, R., Piñeiro, M., Andrés, M., Iturralde, M., Alava, M.A., Heegaard, P., Jobert, J.L., Madec, F., Lampreave, F.**, 2005. The concentration of apolipoprotein A-I decreases during experimentally induced acute processes in pigs. *Infection and Immunity* 73, 3184-3187.
- Ceciliani, F., Giordano, A., Spagnolo, V.**, 2002. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein and peptide letters* 9, 211-223.
- Chapinal, N., 2006. Effect of the housing and feeding system on the welfare and productivity of pregnant sows. <http://www.tesisenred.net/TDX-0223107-154324/>.
- Chen, H.H., Lin, J.H., Fung, H.P., Ho, L.L., Yang, P.C., Lee, W.C., Lee, Y.P., Chu, R.M.**, 2003. Serum acute phase proteins and swine health status. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 67, 283-290.
- Eckersall, P.D., Duthie, S., Toussaint, M.J.M., Gruys, E., Heegaard, P., Alava, M., Lipperheide, C., Madec, F.**, 1999. Standardization of diagnostic assays for animal acute phase proteins. *Advances in Veterinary Medicine* 41, 643-655.
- Eckersall, P.D.**, 2000. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue de Médecine Vétérinaire* 151, 577-584.
- Francisco, C.J., Shryock, T.R., Bane, D.P., Unverzagt, L.**, 1996. Serum haptoglobin concentration in growing swine after intranasal challenge with *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* type D. *Can J Vet Res.* 60, 222-7.

- Gabay, C., Kusher, I.,** 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 340, 448-54.
- Gómez-Laguna, J., Salguero, F.J., Pallarés, F.J., Fernández de Marco, M., Barranco, I., Cerón, J.J., Martínez-Subiela, S., Van Reeth, K., Carrasco, L.,** 2009. Acute phase response in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Diseases* (in press).
- González-Ramón, N., Alava, M.A., Sarsa, J.A., Piñeiro, M., Escartín, A., García-Gil, A., Lampreave, F., Piñeiro, A.,** 1995. The major acute phase serum protein in pigs is homologous to human plasma kallikrein sensitive PK-120. *FEBS Letters* 371, 227-230.
- Gruys, E., Toussaint, M.J.M., Landman, W.J.M., Tivapasi, M., Chamanza, R., van Veen L.,** 1999. Infection, inflammation and stress inhibit growth. Mechanism and non-specific assessment of the processes by acute phase proteins. *Production diseases in farm animals*, pp. 72-87.
- Gruys, E., Toussaint, M.J., Niewold, T.A., Koopmans, S.J.,** 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* 6, 1045-56.
- Gutiérrez, A.M., Martínez-Subiela, S., Soler, L., Pallarés, F.J., Cerón, J.J.,** 2009. Use of saliva for haptoglobin and C-reactive protein quantifications in porcine respiratory and reproductive syndrome affected pigs in field conditions. *Vet Immunol Immunopathol.* 132, 218-23.
- Hall, W.F., Eurell, T.E., Hansen, R.D., Herr, L.G.,** 1992. Serum haptoglobin concentration in swine naturally or experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Am Vet Med Assoc.* 201, 1730-3.
- Heegaard, P.M., Klausen, J., Nielsen, J.P., González-Ramón, N., Piñeiro, M., Lampreave, F., Alava, M.A.,** 1998. The porcine acute phase response to infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of infection. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 119, 365-373.
- Hulten, C., Johansson, E., Fossum, C., Wallgren, P.,** 2003. Interleukin 6, serum amyloid A and haptoglobina as markers of treatment efficacy in pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 95, 75-89.
- Knura-Deszczk, S., Lipperheide, C., Petersen, B., Jobert, J.L., Berthelot-Hérault, F., Kobisch, M., Madec, F.,** 2002. Plasma haptoglobin concentration in swine after challenge with *Streptococcus suis*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 49, 240-4.
- Kushner, I., Mackiewicz, A.,** 1987. Acute phase proteins as disease markers. *Dis. Markers* 5, 1-11.
- Lampreave, F., González-Ramón, N., Martínez-Ayensa, S., Hernández, M.A., Lorenzo, H.K., García-Gil, A., Piñeiro, A.,** 1994. Characterization of the acute phase serum protein response in pigs. *Electrophoresis* 15, 672-676.
- Leonard, B.E.,** 2005. The HPA and immune axes in stress: the involvement of the serotonergic system. *European Psychiatry* 20, S302-S306.
- Lipperheide, C., Diepers, N., Lampreave, F., Alava, M., Petersen, B.,** 1998. Nephelometric determination of haptoglobin plasma concentrations in fattening pigs. *Zentralbl Veterinarmed A.* 45, 543-50.
- Moestrup, S.K., Møller, H.J.,** 2004. CD 163: a regulated hemoglobin scavenge receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann Med.* 36, 347-54.
- Murata, H., Miyamoto, T.,** 1993. Bovine haptoglobin as a possible immunomodulator in the sera of transported calves. *The British Vet J.* 149, 277-83.
- Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M.,** 2004. Current research on acute phase proteins in Veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal* 168, 28-40.
- Murata, H.,** 2007. Stress and acute phase protein response: an inconspicuous but essential linkage. *The Veterinary Journal* 173, 473-474.
- Murtaugh, M.P., Baarsch, M.J., Zhou, Y., Scamurra, R.W., Lin, G.,** 1994. Inflammatory cytokines in animal health and diseases. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54, 45-55.

- Navarro, M.A., Carpintero, R., Acín, S., Arbonés-Mainar, J.M., Calleja, L., Carnicer, R., Surra, J.C., Guzmán-García, M.A., González-Ramón, N., Iturralde, M., Lampreave, F., Piñeiro, A., Osada, J., 2005. Immune-regulation of the apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster in experimental inflammation. *Cytokine* 31, 52-63.
- Parra, M.D., Fuentes, P., Tecles, F., Martínez-Subiela, S., Martínez, J.S., Muñoz, A., Cerón, J.J., 2006. Porcine acute phase protein concentrations in different diseases in field conditions. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 53, 488-93.
- Petersen, H.H., Dideriksen, D., Christiansen, B.M., Nielsen, J.P., 2002. Serum haptoglobin concentration as a marker of clinical signs in finishing pigs. *Vet Rec*. 151, 85-9.
- Petersen, H.H., Nielsen, J.P., Heegaard, P.M.H., 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research* 35, 163-187.
- Philippidis, P., Mason, J.C., Evans, B.J., Nadra, I., Taylor, K.M., Haskard, D.O., Landis, R.C., 2004. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circulation Research* 94, 119-26.
- Piñeiro, C., Piñeiro, M., Morales, J., Carpintero, R., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J.M., Alava, M.A., Lampreave, F., 2007. Pig acute-phase protein levels after stress induced by changes in the pattern of food administration. *Animal* 1, 133-139.
- Piñeiro, M., Piñeiro, C., Carpintero, R., Morales, J., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J.M., Lampreave, F., 2007. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *The Veterinary Journal* 173, 669-674.
- Salamano, G., Mellia, E., Candiani, D., Ingravalle, F., Bruno, R., Ru, G., Doglione, L., 2008. Changes in haptoglobin, C-reactive protein and pig-MAP during a housing period following long distance transport in swine. *The Veterinary Journal* 177, 110-115.
- Segalés, J., Piñeiro, C., Lampreave, F., Nofrarías, M., Mateu, E., Calsamiglia, M., Andrés, M., Morales, J., Piñeiro, M., Domingo, M., 2004. Haptoglobin and pig-major acute protein are increased in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Res*. 35, 275-82.
- Sorrells, A.D., Eicher, S.D., Harris, M.J., Pajor, E.A., Richert, B.T., 2007. Periparturient cortisol, acute phase cytokine, and acute phase protein profiles of gilts housed in groups or stalls during gestation. *Journal of Animal Science* 85, 1750-1757.
- Steel, D.M., Whitehead, A.S., 1994. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 15, 81-88.
- Stephoe, A., Willemsen, G., Owen, N., Flower, L., Mohamed-Ali, V., 2001. Acute mental stress elicits delayed increases in circulating inflammatory cytokine levels. *Clinical Science* 101, 185-192.
- Stevenson, L.S., McCullough, K., Vincent, I., Gilpin, D.F., Summerfield, A., Nielsen, J., McNeilly, F., Adair, B.M., Allan, G.M., 2006. Cytokine and C-reactive protein profiles induced by porcine circovirus type 2 experimental infection in 3-week-old piglets. *Viral Immunol*. 19, 189-95.

# LA GRIPE PORCINA: UNA ENFERMEDAD CLÁSICA CON CARÁCTER ZONÓTICO Y EMERGENTE

M<sup>a</sup> ÁNGELES MARTÍN DEL BURGO, BLANCA CHINCHILLA RODRÍGUEZ Y GUSTAVO DEL REAL SOLDEVILLA\*

## INTRODUCCIÓN

La Gripe o Influenza Porcina es una de las enfermedades infecciosas respiratorias más comunes que afectan al cerdo. Se encuentra muy extendida por todo el mundo y, en la mayoría de los países, tiene carácter endémico.

En España, el virus de la Influenza Porcina constituye uno de los patógenos primarios más relevantes y tiene un fuerte impacto en la industria porcina, una de las principales de Europa. La enfermedad genera importantes pérdidas económicas, principalmente debidas al retraso en el crecimiento de los animales infectados y, ocasionalmente, a abortos.

La Influenza Porcina, además, tiene una gran importancia desde el punto de vista de la salud pública: en las últimas décadas se han descrito casos de infección en el hombre por virus Influenza porcinos con síntomas similares a una infección gripal por virus humanos y que, en algunos casos, tuvieron un desenlace fatal. Es muy interesante el hecho de que la gripe en el cerdo es muy similar en cuanto a patogenia, sintomatología, curso de la infección, etc. a la gripe humana por lo que constituye un excelente modelo animal para estudios experimentales sobre la enfermedad.

El cerdo es susceptible de ser infectado por virus Influenza de otras especies, así se ha postulado su importancia como hospedador intermediario tanto para la adap-

---

\* Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).  
Trabajo galardonado con el "XI Premio Francisco Fernández López" del Colegio Oficial de Veterinarios de Almería.



tación de cepas aviarias a hospedadores mamíferos como coctelera en el cual tras la infección con virus diferentes se genere un nuevo virus con potencial pandémico.

La nueva cepa H1N1 que se ha extendido actualmente en la población humana y que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha calificado recientemente como pandémica, se ha originado por reagrupamientos génicos de virus preexistentes siendo la hemaglutinina y la neuraminidasa, proteínas más relacionadas con la virulencia e inmunidad protectora, de origen porcino.

La Influenza Porcina es una enfermedad extremadamente contagiosa, transmitida por contacto directo a través de aerosoles (muy infectivos) eliminados por los animales enfermos. La morbilidad es prácticamente del 100%. Tras la infección, el cerdo sufre un cuadro clínico muy similar al de la gripe humana con síntomas de tipo respiratorio, fiebre y de curso autolimitado, resolviéndose en 2-4 días. La severidad de la infección depende de factores tales como son: la edad del animal, la cepa viral, las condiciones medioambientales y las infecciones secundarias asociadas.

Existen claras diferencias geográficas entre los diferentes subtipos que afectan al cerdo entre Europa, Asia y América. En España la situación es bastante desconocida lo que hace necesario un estudio epizootiológico tanto de la prevalencia de la infección como de las cepas circulantes y un estudio profundo tanto genético como de diferencias en su patogenia. Por lo tanto, la vigilancia epizootiológica de la Influenza Porcina, tal y como aconsejan la OMS y la OIE, es fundamental debido a la enorme variabilidad antigénica de los virus Influenza, lo que conlleva la aparición de cepas diferentes así como de nuevos subtipos, y a las implicaciones derivadas en cuanto al diagnóstico y al diseño de vacunas eficaces.

En este trabajo se exponen los resultados obtenidos en el estudio de la enfermedad en España con respecto a su prevalencia y a las características genéticas, antigénicas y patogénicas de los subtipos virales circulantes en la actualidad. Las conclusiones alcanzadas en este trabajo están siendo importantes para la comprensión del carácter zoonótico de esta infección, tal y como lo atestigua la citación de datos genéticos de cepas virales caracterizadas en este estudio en publicaciones internacionales relacionadas con la gripe pandémica actual. Además, los datos epizootiológicos obtenidos son fundamentales para la valoración de la eficacia de las vacunas actuales y para la eventual reformulación de las mismas.

Por último, la información sobre los determinantes patogénicos de los virus puede contribuir a un mayor conocimiento de la patogenia de la infección y, como

consecuencia, al desarrollo de nuevas armas terapéuticas frente a la enfermedad, no sólo porcina, sino también humana.

## ETIOLOGÍA

El agente causal de la gripe porcina son virus Influenza tipo A pertenecientes a la Familia *Orthomyxoviridae*. Los virus Influenza presentan una envuelta lipídica externa, derivada de la membrana celular, que les hace muy susceptibles a la acción de determinados detergentes y desinfectantes (**Diseases of swine, 2006**). Por debajo de la membrana se encuentra una capa constituida por la proteína matriz (M1), soporte estructural de la partícula, y en su interior un conjunto de ribonucleoproteínas (vRNPs) que constituyen el genoma del virus. En función de la nucleoproteína (NP) y de la proteína M se clasifican en Influenza tipo A, B y C. Bajo un prisma veterinario, los virus Influenza tipo A se consideran más relevantes que los B o C, dado que infectan a un amplio rango de hospedadores incluyendo a las personas, los cerdos, los caballos, los mamíferos marinos y las aves.

Son virus de genoma segmentado constituido por 8 segmentos de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa. La secuencia completa del genoma contiene aproximadamente 13600 nucleótidos. Cada segmento de RNA está asociado a la polimerasa viral, complejo de tres subunidades distintas (PB1, PB2 y PA), mediante interacción con los extremos del RNA y está protegido por asociación a monómeros de la nucleoproteína.

En la superficie del virión, e insertadas en su membrana, se encuentran dos glicoproteínas, que dan lugar a proyecciones de dos tipos: **hemaglutinina** (HA) y **neuraminidasa** (NA). La HA, una vez activada enzimáticamente por proteasas del hospedador, es la responsable de la unión del virus a sus receptores celulares de ácido siálico y de la fusión de la envoltura viral con la membrana citoplasmática de la célula diana, procesos que determinarán la penetración de la nucleocápside en el interior celular. La NA participa, gracias a su actividad sialidasa, en la liberación de las nuevas partículas virales a partir de la célula diana al impedir su agregación en la superficie celular, además de facilitar la difusión de los viriones a través de la mucina del epitelio respiratorio (**Matrosovich, 2004**).

La HA induce la producción de anticuerpos que neutralizan la infectividad viral, al impedir su unión a los receptores celulares, esto es de gran importancia en la inmunidad protectora frente a la gripe. Si bien los anticuerpos frente a la NA no

neutralizan la infectividad del virus, éstos poseen un importante papel en la reducción de la difusión viral en el epitelio respiratorio aunque no previenen la infección.

Otras dos proteínas virales son la M2, que constituye un canal iónico dependiente de pH, y la proteína no estructural NS2, relacionada con la exportación nuclear de las RNPs (O'Neill y col., 1998).

Durante la infección van a aparecer otras dos proteínas virales no presentes en el virión: la proteína no estructural NS1, que une RNA de doble cadena, modula la replicación viral y está relacionada con el bloqueo de respuesta celular mediada por interferón (García-Sastre, 2001); y la proteína PB1-F2, relacionada con apoptosis o muerte celular programada como consecuencia de la infección (Chen, 2001) fundamentalmente de células inmunes del hospedador (macrófagos), lo que se relaciona con la pérdida de efectividad de la respuesta inmune contribuyendo así a la patogenicidad (Zamarin y col., 2005).

Los virus Influenza tipo A se clasifican en subtipos en base a la estructura antigénica de la HA y la NA. Se han descrito un total de 16 HA y 9 NA para el virus de la gripe A en su reservorio natural aviar.

Existen dos mecanismos por los cuales los virus Influenza evolucionan genéticamente: por un lado, la aparición de mutaciones puntuales (*drift*) debido a una tasa de error de la polimerasa viral de  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  nt / ciclo de replicación (Parvin y col., 1986) y, por otro lado, el genoma segmentado de los virus Influenza permite el reagrupamiento génico entre cepas virales diferentes que infecten la misma célula dando lugar a un virus nuevo con segmentos de uno o de otro virus (*shift*).

Las mutaciones puntuales o *drift* se asocian principalmente a las proteínas de superficie, la HA y la NA, frente a las cuales se generan los anticuerpos neutralizantes. Por este motivo, mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas hacen posible que el virus escape de la respuesta inmune del hospedador al no ser reconocido por dichos anticuerpos.

## EPIDEMIOLOGÍA

Los cerdos son susceptibles de ser infectados por diferentes subtipos de Influenza, incluyendo Influenza humana y aviar, pero actualmente los subtipos antigénicos que normalmente afectan al cerdo son H1N1, H1N2 y H3N2. Estudios epidemiológicos resaltan la amplia distribución mundial de la infección, así como la aparición

de cambios antigénicos en las cepas circulantes (drifts) y el surgimiento de nuevos subtipos, consecuencia de reagrupamientos génicos (shifts). Además, existen claras diferencias geográficas entre los diferentes subtipos que afectan al cerdo entre Europa, Asia y América.

La Influenza Porcina se describió por primera vez en 1918 (**Koen, 1919**) asociada a brotes en granjas de cerdos de Estados Unidos (**Shope, 1964**). Estos brotes coincidieron temporalmente con la pandemia humana de influenza más grave de los tiempos modernos, que se estima fue responsable de la muerte de aproximadamente 20-50 millones de personas en todo el mundo.

El primer virus Influenza aislado, A/swine/Iowa/15/30, se aisló en cerdos de Norteamérica (**Shope, 1931**). Desde entonces, ha permanecido endémico en la población porcina norteamericana como el subtipo H1N1 "clásico" y se sabe que dicho agente se encuentra relacionado genética y antigénicamente con el subtipo causante de la pandemia humana. (**Gorman y col., 1991; Kanegae y col., 1994; Reid y col., 1999, 2000**). Además, evidencias recientes indican que los aislados iniciales de los virus del hombre y del cerdo eran de origen aviar, y estaban estrechamente relacionados (**Taubenberger y col., 1997, 2000**).

En cualquier caso, este virus H1N1 clásico continuó siendo la causa predominante de influenza en los cerdos de los EE.UU., permaneciendo muy conservado hasta la década de los noventa (**Chambers y col., 1991; Hinshaw y col., 1978; Olsen y col., 2000**). A partir de entonces la evolución génica fue mucho más rápida, apareciendo constantemente nuevos subtipos H3N2, H1N2 y H1N1, consecuencia de reordenamientos génicos ente cepas porcinas, humanas y aviares (**Zhou y col., 1999, Choi y col 2002, Karasin y col., 2002, Webby y col., 2004, Vincent y col., 2006**).

Antes de 1975 había pocos casos documentados de gripe porcina fuera de los EE.UU. En Europa no hubo prácticamente evidencias de gripe porcina hasta el año 1976, cuando la enfermedad surgió en granjas del norte de Italia (**Nardelli y col., 1978**). Desde su entrada en Europa en 1970, el virus H1N1 clásico se distribuyó gradualmente por todo el continente; sin embargo, a partir de los últimos años de la década de los 70 desapareció y fue reemplazado por un nuevo virus H1N1 de origen aviar, actualmente circulante (**Abusugra y col. 1987; Barigazzi y col., 2003**).

El subtipo H3N2, virus humano que originó la pandemia de 1968, fue aislado en cerdos en Europa a principios de los años 70 (**Kundin 1970; Tumova y col. 1976; Ottis y col. 1982**) pero hasta 1984 no se asoció directamente con brotes de enfermedad respiratoria porcina (**Haesebrouck y col. 1985**). Actualmente los H3N2 dominantes

en Europa son de origen aviar-humano (**Castrucci y col., 1993**), sustituyendo al tipo humano de los años 70-80. La HA y NA son de origen humano de cepas circulantes H3N2 y los 6 genes internos de H1N1 “tipo aviar”.

A partir de los años 90 empezó a circular un nuevo subtipo en Europa, el H1N2. Los primeros aislados fueron en Gran Bretaña en 1994 (**Brown y col., 1995, 1998**) y desde entonces se ha extendido por el resto de Europa (**Gourreau, y col. 1994**), aumentando en los últimos años su prevalencia. La HA del H1N2 está estrechamente relacionada con cepas humanas de los años 80, la NA parece proceder de cepas circulantes porcinas H3N2 y los genes internos son de origen aviar.

## INFLUENZA PORCINA Y ZONOSIS

La importancia del cerdo en la ecología y evolución de los virus Influenza se basa en su susceptibilidad de ser infectado por virus de Influenza aviar y humana (**Kida y col. 1994**). Este hecho se relaciona con la presencia en su epitelio traqueal de receptores para cepas tanto humanas como aviares (**Ito y col., 1998**). Así, se cree que los cerdos podrían tener un papel importante en la transmisión interespecífica de virus Influenza, dado que, por un lado, pueden actuar como hospedadores intermediarios en la adaptación de virus aviares a los mamíferos (**Campitelli y col., 1997**) (**Kida y col., 1994**) y, además, ser infectados por virus de especies distintas pudiendo dar lugar a un nuevo virus por un mecanismo de reagrupamiento génico.

Virus aviares han sido aislados en cerdos (**Karasin y col, 2000**), y virus de cerdo han sido aislados en aves (**Choi y col. 2004**). En los recientes casos de infección de humanos por cepas aviares H5N1 de alta patogenicidad, anticuerpos frente al virus o el propio virus ha sido aislado de cerdos asintomáticos en Asia (**Choi y col. 2005, Li y col., 2004**), y también han sido aislados de cerdos virus de Influenza Equina H3N8 (**Tu y col., 2009**) e incluso cepas humanas, hechos que reflejan el posible papel del cerdo como hospedador intermediario, al que ya nos hemos referido con anterioridad.

Por otra parte, en las últimas décadas se han descrito casos esporádicos de infección en humanos por virus de IP provocando cuadros respiratorios, y de forma ocasional, hospitalizaciones y muerte (**Kendal y col., 1977, Gaydos y col., 1976, Rimmelzwaan y col., 2000, Gregory y col., 2003**). También han sido detectados anticuerpos frente a cepas porcinas en trabajadores de granjas (**Gray y col. 2007**). Recientemente, en España se ha descrito un caso de transmisión de virus porcino H1N1 a una persona en Aragón (**Adiego y col., 2009**).

En Abril del 2009, un virus H1N1 no descrito anteriormente ni en humanos ni en ganado porcino, fue aislado en humanos en México y EEUU, y, en pocas semanas, se extendió por todo el mundo, con transmisión de humano a humano. Este nuevo virus tiene su origen en un triple reagrupamiento génico (**Smith y col., 2009**) entre cepas porcinas H1N1 “tipo aviar” circulantes en Europa, cepas porcinas *clásicas* H1N1 circulantes en EEUU y cepas resultantes de reagrupamientos génicos entre cepas aviares y humanas.

## PATOGENIA

La replicación del Virus de la Influenza Porcina queda generalmente restringida al aparato respiratorio del cerdo, considerándose el pulmón como el principal órgano diana. También se han visto afectadas las células de la mucosa nasal, tonsilas, tráquea y linfónodos traqueobronquiales (**Lanza y col., 1992; Brown y col., 1993; Heinen y col., 2000**).

El virus accede vía nasofaríngea y penetra en el epitelio respiratorio, donde causa inflamación y necrosis de las células que tapizan los bronquios y bronquiolos.

En el pulmón, el efecto citopático sobre los neumocitos alveolares tipo II altera la producción de surfactante. Esto dificulta la fagocitosis por los macrófagos alveolares. El exudado inflamatorio en la vías respiratorias menores puede bloquearlas, dando lugar a atelectasia, enfisema y neumonía broncointersticial. En la mayor parte de los casos el daño epitelial es reparado, y las lesiones remiten en 5-7 días.

En la patogenia intervienen factores dependientes del hospedador, como es la presencia de anticuerpos, y factores del propio virus que hacen que la virulencia o patogenicidad varíe de unas cepas a otras, como son: la actividad apoptótica de la proteína PB1-F2 en macrófagos, lo que además va a favorecer la aparición de infecciones secundarias (**Coleman y col., 2007**), o la proteína NS1, responsable de la inactivación de la respuesta inmune innata bloqueando la respuesta antiviral de IFN $\alpha$ /B (**Salvatore y col., 2002**). Otra forma de escapar de la respuesta inmune es a través de fenómenos de evolución génica por mutaciones puntuales de la HA y de la NA, evadiendo así el reconocimiento por los anticuerpos del hospedador.

## CUADRO CLÍNICO

Tras un período de incubación de aproximadamente 1-3 días, el virus induce la aparición de un cuadro respiratorio agudo que cursa con síntomas tales como fiebre,

disnea, tos, estornudos, descarga nasal, anorexia, pérdida de peso, letargia y conjuntivitis (Van Reeth 2000; Yoon y col., 2004). También se han descrito abortos debido a la fiebre (Yoon y col., 2004). El curso de la enfermedad es autolimitado y se resuelve en pocos días. La transmisión se produce a través del contacto con el virus presente en secreciones y aerosoles eliminados por toses y estornudos de animales infectados.

La morbilidad es elevada y la mortalidad generalmente baja. La presencia de infecciones secundarias asociadas (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasterella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis* y *Streptococcus suis* y agentes virales como el virus del Síndrome Reprodutor y Respiratorio porcino (PRRS)) puede exacerbar los signos clínicos.

## LESIONES

La severidad de las mismas, así como el desarrollo de la enfermedad, dependen directamente de la cepa viral, de la cantidad de virus que alcanza las vías respiratorias profundas y de la consecuente liberación de mediadores de la inflamación, principalmente IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL1 e IL6 (Van Reeth y col., 1999, 2000, 2006).

Los virus Influenza inicialmente infectan el epitelio de las vías aéreas y la lesión predominante que producen es una *bronconeumonía intersticial* (Yoon y col., 2004; Richt y col., 2003; Born y col., 1998), asociada a un aumento en el tamaño de los nódulos linfáticos regionales (*Diseases of swine*, 9ª edición). Macroscópicamente, las zonas afectadas del pulmón están claramente demarcadas, atelectásicas o consolidadas, y se encuentran distribuidas por todo el órgano pero siendo más extensas ventralmente.

Microscópicamente, en los casos de influenza porcina no complicada, puede observarse una degeneración diseminada y necrosis del epitelio respiratorio bronquial y bronquiolar con la consecuente descamación celular (Haesebrouck y col., 1985; Haesebrouck 1986). Debido a esto, las luces de los bronquios, bronquiolos y alvéolos se encuentran repletas de un exudado que contiene células descamadas, neutrófilos y, posteriormente, macrófagos. Estos neutrófilos también contribuyen al daño pulmonar mediante la liberación de enzimas propias. Además, existe una hiperemia variable con dilatación de los capilares y la subsecuente aparición de un infiltrado inflamatorio linfoplasmocitario a nivel perivascular y peribronquiolar (Van Reeth y col., 1998; Richt y col., 2003). Extensas áreas de atelectasia y enfisema alveolar y neumonía intersticial acompañan a estas lesiones (Shope, 1931; Urman y



col. 1958; Witte y col., 1981). En casos graves, también se pueden apreciar congestión y un acusado edema de todo el pulmón.

## DIAGNÓSTICO

El **diagnóstico clínico** de una infección por virus Influenza sólo puede realizarse de forma presuntiva dado que los signos no son patognomónicos de la enfermedad, siendo necesario hacer un diagnóstico diferencial con la variedad de cuadros respiratorios que afectan al ganado porcino. Por lo tanto, un **diagnóstico definitivo** sólo es posible a través del aislamiento vírico o la detección de ácido nucleico, proteínas virales y anticuerpos específicos en el laboratorio.

Para una mejor identificación del agente es preferible la recogida de muestras en las primeras 24-48 h tras el inicio del cuadro clínico. El virus puede ser detectado a partir de muestras de tejido pulmonar y de hisopos nasales. El aislamiento viral se realiza en cultivos celulares (línea celular MDCK) o bien en huevos embrionados de pollo de 10 días de edad. Los virus aislados pueden ser subtipados mediante PCRs específicas y por secuenciación de los genes de la HA y NA o por test de Inhibición de la HA y de Inhibición de la NA con sueros subtipo-específicos.

Para la detección de antígenos del virus se emplean, principalmente, dos técnicas: la inmunofluorescencia directa (IFD) sobre tejido fresco y la inmunohistoquímica (IHQ) sobre tejido fijado.

El principal test serológico para la detección de anticuerpos es la Inhibición de la Hemaglutinación, que requiere de la obtención de muestras de suero pareadas (tomadas al principio y al final del brote) con el fin de demostrar un aumento del título de anticuerpos específicos.

Otras pruebas que pueden utilizarse para la detección de anticuerpos en suero son la seroneutralización, el ELISA (*Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay*), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la inmunodifusión en gel de agar.

También se puede detectar la presencia viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que tiene la ventaja de diferenciar subtipos directamente sobre muestras clínicas o sobre aislados (*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. OIE).

## PREVENCIÓN Y CONTROL

La principal medida de prevención se basa en impedir la entrada del virus en la explotación mediante un plan de bioseguridad basado en: limitar el acceso de personas y vehículos ajenos a la granja, la limpieza y desinfección exhaustiva de los camiones de transporte y la cuarentena de cualquier animal nuevo que vaya a entrar en la misma para evitar la introducción de portadores. Debido a la transmisión del virus entre diferentes especies las medidas deben ir destinadas a minimizar el contacto entre el hombre y el cerdo, así como evitar el contacto con aves.

En Europa, se dispone de vacunas inactivadas frente al virus de la Influenza Porcina que contienen las cepas H1N1 y H3N2. Las vacunas deben contener los subtipos y cepas circulantes para garantizar una adecuada protección (*Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE*).

La evolución génica de los virus Influenza requiere la valoración constante de la eficacia de las vacunas frente a nuevos subtipos como es el caso del H1N2 porcino, así como frente a los subtipos previamente circulantes que, por fenómenos de drift, pueden derivar antigénicamente haciendo que las vacunas no protejan de forma adecuada al hospedador. **(De Jong y col., 1999, 2001)**.

## OBJETIVOS

1. Estudio de la prevalencia de la Influenza Porcina en España.
2. Análisis genético de aislados recientes españoles.
3. Estudio de reactividad cruzada entre subtipos virales.
4. Estudio de patogenicidad viral en ratón.
5. Estudio de patogenicidad viral en cerdo.

## RESULTADOS

### 1. ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA INFLUENZA PORCINA (IP) EN ESPAÑA

Considerando la cabaña porcina española, se analizaron 1503 sueros procedentes de 167 granjas de engorde distribuidas por toda España (nivel de confianza estadística del 95%) por el test de Inhibición de la Hemoaglutinación frente a virus de los tres

subtipos circulantes en España. Este test se basa en la actividad hemoaglutinante de la HA sobre glóbulos rojos de gallina, de modo que la presencia de anticuerpos neutralizantes de la HA en el suero de animales seropositivos inhibe dicha actividad hemoaglutinante.

Los sueros fueron tratados con RDE (receptor destroying enzyme) procedente de *Vibrio cholerae* para inactivar moléculas inhibitoras no específicas y adsorbidos con una dilución de glóbulos rojos de gallina al 50% para eliminar aglutininas inespecíficas. (*WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (OIE)*).

Los resultados (Tabla 1) mostraron la amplia distribución de la infección en España: el 82.7% de las granjas presentaron anticuerpos frente a uno o varios subtipos.

El subtipo más frecuente fue el H1N1 detectándose anticuerpos en el 70% de las granjas analizadas, el 57% de las granjas fueron seropositivas a H3N2, y el 55% a H1N2. Solamente el 17% de las granjas fueron seronegativas.

Las infecciones mixtas constituyeron un elevado porcentaje, un 79% de las granjas positivas presentaron anticuerpos frente dos o tres subtipos, de ellas un 42% de las granjas fueron positivas a los tres subtipos.

**Tabla 1: Epidemiología de IP en España**

Subtipo	Granjas	%
H1N1	16	9,58
H1N2	5	2,99
H3N2	8	4,79
H1N1 + H1N2	21	12,57
H1N1 + H3N2	22	13,17
H1N2 + H3N2	8	4,79
H1N1 + H1N2 + H3N2	58	34,73
<b>Granjas positivas</b>	<b>138</b>	<b>82,65</b>
<b>Granjas Negativas</b>	<b>29</b>	<b>17,37</b>
<b>TOTAL</b>	<b>167</b>	<b>100</b>

## 2. ENSAYO DE REACTIVIDAD CRUZADA POR INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (IHA)

Con el fin de conocer el grado de similitud antigénica entre los tres subtipos virales aislados en España, se enfrentaron sueros de cerdos positivos frente a un subtipo a cepas de campo correspondientes a los tres subtipos. Así, se observó que los anticuerpos frente a la HA eran subtipo-específicos, careciendo de reactividad

cruzada heterosubtípica incluso en el caso de anticuerpos frente a la HA1 de subtipos diferentes, como es el caso de H1N1 y H1N2 (Tabla 2).

Se utilizaron sueros de referencia frente a cepas H1N2 A/Swine/410440/Scotland/1993.

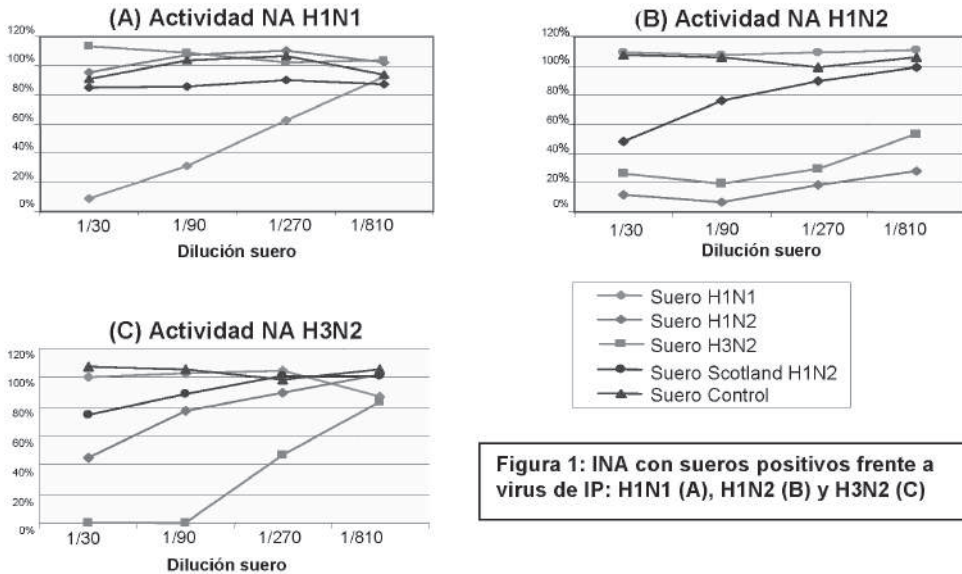
El título de anticuerpos del suero se determinó como la última dilución del suero que produce inhibición de la hemoaglutinación enfrentándose a una dilución viral de 4 unidades hemoaglutinantes, considerando una unidad hemoaglutinante como la mayor dilución del virus que produce una completa hemoaglutinación.

Antisuero		Título de anticuerpos frente a virus					
		H1N1 51316	H1N1 53207	H1N2 40564	H1N2 Scotl.	H3N2 54008	H3N2 54226
H1N1	Suero 1	320	40	<10	<10	<10	<10
	Suero 2	320	80	<10	<10	<10	<10
H1N2	Suero 1	<10	<10	160	40	<10	<10
	Suero 2	<10	<10	80	20	<10	<10
	Suero Scotland	<10	<10	20	360	<10	<10
H3N2	Suero 1	<10	<10	<10	<10	320	320
	Suero 2	<10	<10	<10	<10	640	640

### 3. ENSAYO DE REACTIVIDAD CRUZADA POR INHIBICIÓN DE LA NEURAMINIDASA (INA)

Se estudió la similitud antigénica de las neuraminidasas de los tres subtipos virales. Para ello, se realizaron ensayos de INA (WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance) con diferentes diluciones de sueros frente a cada uno de los subtipos de Influenza Porcina. La presencia de anticuerpos subtipoespecíficos frente a la NA neutraliza la actividad sialidasa del virus.

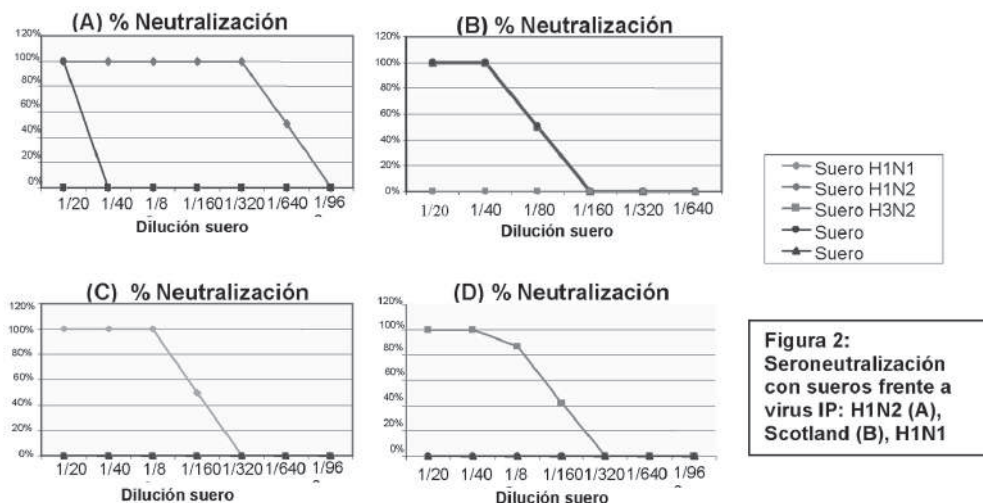
Los resultados muestran la reactividad cruzada entre NA2 de los subtipos H1N2 y H3N2: sueros positivos H1N2 neutralizan tanto virus H1N2 como H3N2 y viceversa (Figura 1).



#### 4. ENSAYO DE REACTIVIDAD CRUZADA POR SERONEUTRALIZACIÓN

Para el estudio de la existencia de protección cruzada entre los antisueros específicos de cada subtipo, se realizaron ensayos de seroneutralización.

Se realizaron diluciones seriadas de los sueros y se enfrentaron a 100 TCID<sub>50</sub> de cada uno de los subtipos de Influenza Porcina. Tras incubar durante 2 horas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>, se transfirió 100 µl de la mezcla virus-suero a cada pocillo de una placa de microtitulación con células MDCK confluentes incubando 2h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, tras lo cual se eliminó el inóculo y se añadió medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium con 4.5g/l glucosa, 25mM de HEPES, 100U/ml de penicilina, 100 µgr/ml de estreptomycin, 0.2% de Albúmina sérica bovina fracción V (BSA), 2mM de L•Glutamina) con tripsina a una concentración de 2 µg/ml. Se mantuvieron 3•4 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> observando diariamente el efecto citopático para calcular la dilución de suero que por unión específica de los anticuerpos bloquea el efecto citopático del virus.



Los resultados muestran ausencia de reactividad cruzada y de protección de los anticuerpos frente a virus heterólogos (Figura 2). Además, se observó una pérdida de reactividad entre el aislado reciente H1N2 y el virus de referencia H1N2 Scotland (aislado en 1994) tanto en los ensayos de IHA como en seroneutralización en células, lo que indicaría una deriva antigénica producto de la evolución del virus a lo largo del tiempo y una consecuente pérdida de reconocimiento antigénico por los anticuerpos frente a la HA.

## 5. SECUENCIACIÓN DE AISLADOS VIRALES DE CAMPO

Se secuenció el genoma completo de 7 cepas de campo aisladas recientemente en España. Los análisis filogenéticos de las secuencias fueron realizados usando el programa MEGA version 3.1 (Kumar, Tamura, Nei 2004) y los árboles filogenéticos se realizaron por el método Neighbor-Joining con un bootstrap de 5000 replicados.

Los números de acceso a GenBank de las cepas secuenciadas son:

- CY009380-9387 (A/Swine/Spain/33601/2001 (H3N2))
- CY009372-9379 (A/Swine/Spain/39139/2002 (H3N2))
- CY009892-9899 (A/Swine/Spain/50047/2003 (H1N1))
- CY010564-10571 (A/swine/Spain/54008/2004 (H3N2))
- CY010572-10579 (A/swine/Spain/51915/2003 (H1N1))

- CY010580-010587 (A/swine/Spain/53207/2004 (H1N1))

*National Center for Biotechnology Information (•CBI). Influenza Virus Resource. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/>*

El análisis filogenético de la HA y la NA (Figuras 3 y 5) del virus H1N2 A/Swine/40564/Spain/2003 confirma la elevada homología de la HA con aislados humanos de los años 80 y la relación de la NA con cepas circulantes porcinas H3N2 indicando, tal y como estaba descrito para otros aislados H1N2 europeos, que el origen del H1N2 fue un reagrupamiento génico entre cepas humanas H1N1 y cepas porcinas H3N2. La homología de la HA de la cepa H1N2 respecto a la HA de las cepas H1N1 porcinas es del 73%, mientras que la NA del H1N2 con las cepas H3N2 españolas secuenciadas es del 83-84%.

En el análisis filogenético de la HA1, se observa la elevada homología de la HA de las cepas H1N1 asociadas a brotes humanos en 2009 con cepas H1N1 porcinas tipo clásico que llevan circulando en los últimos 80 años en cerdos de Norteamérica, lo que sugiere un origen porcino de las mismas. Sin embargo, la caracterización genética de la NA las relaciona más con cepas H1N1 porcinas circulantes en Europa, cuyo origen es tipo aviar (Figuras 3 y 4).

Se muestran en azul las cepas H1N1 de la pandemia 2009 y en rojo las cepas españolas porcinas, así como un caso en Aragón de un aislado de virus porcino H1N1 en una mujer en el 2008.



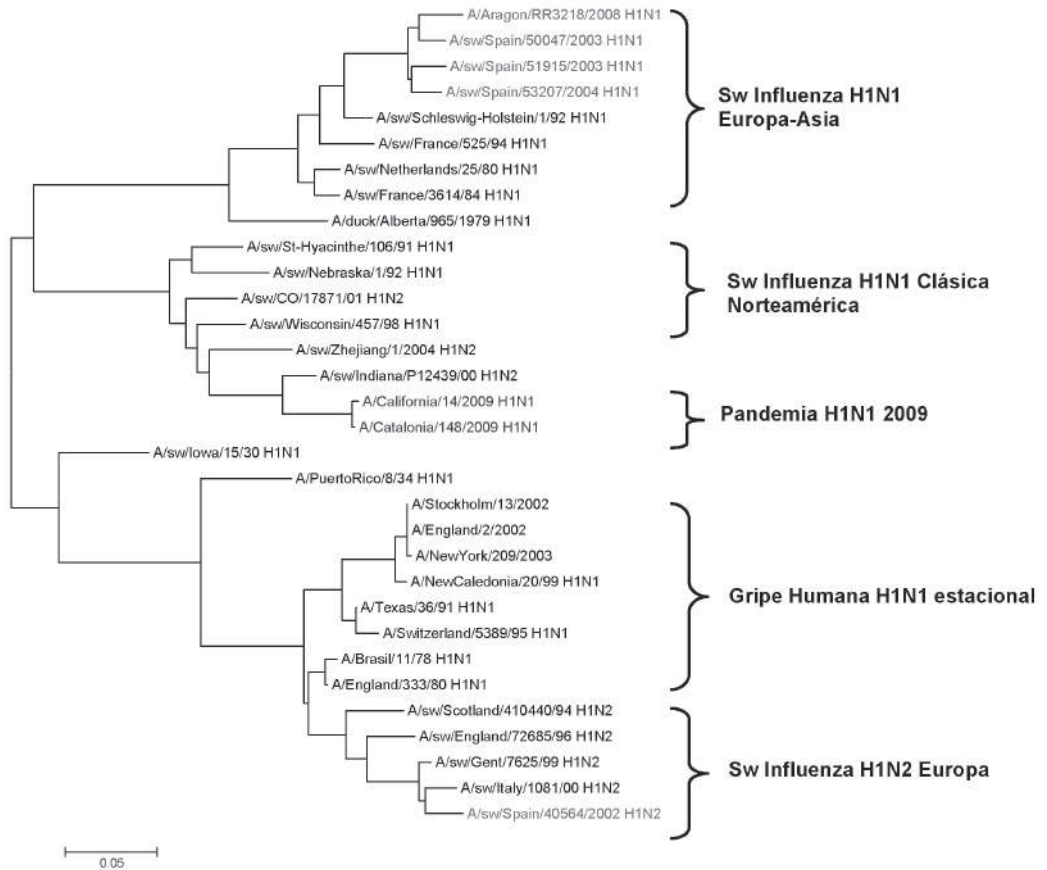


Figura 3: Árbol filogenético de la secuencia de nucleótidos de HA1

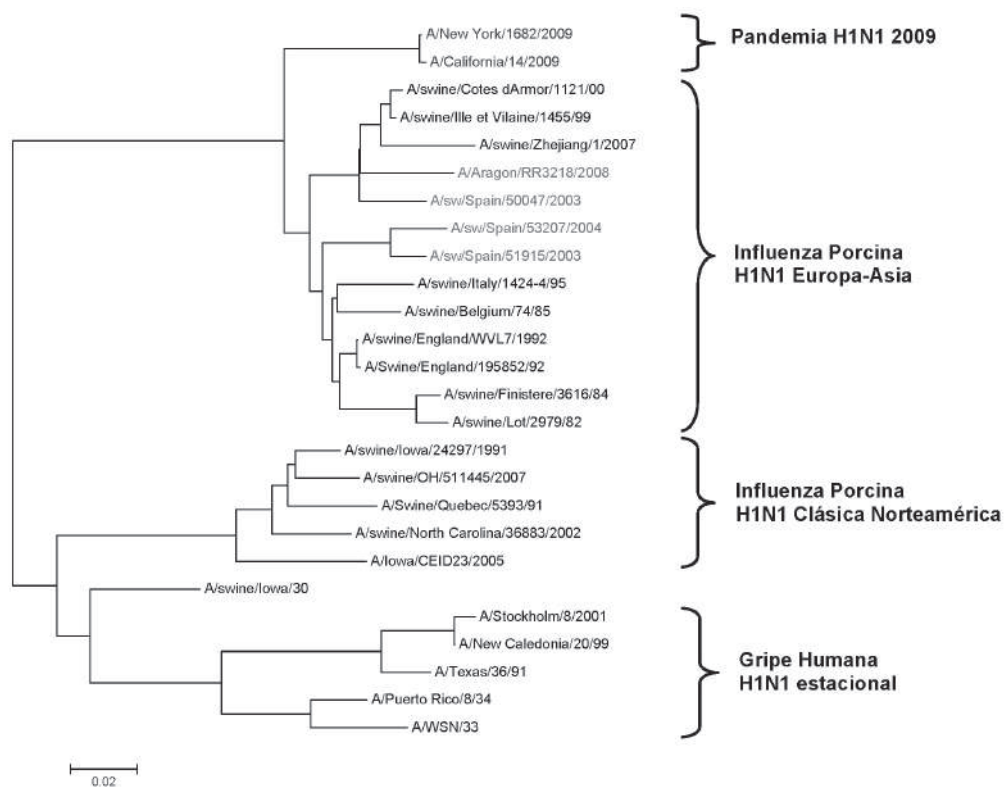


Figura 4: Árbol filogenético de la secuencia de nucleótidos de NA1

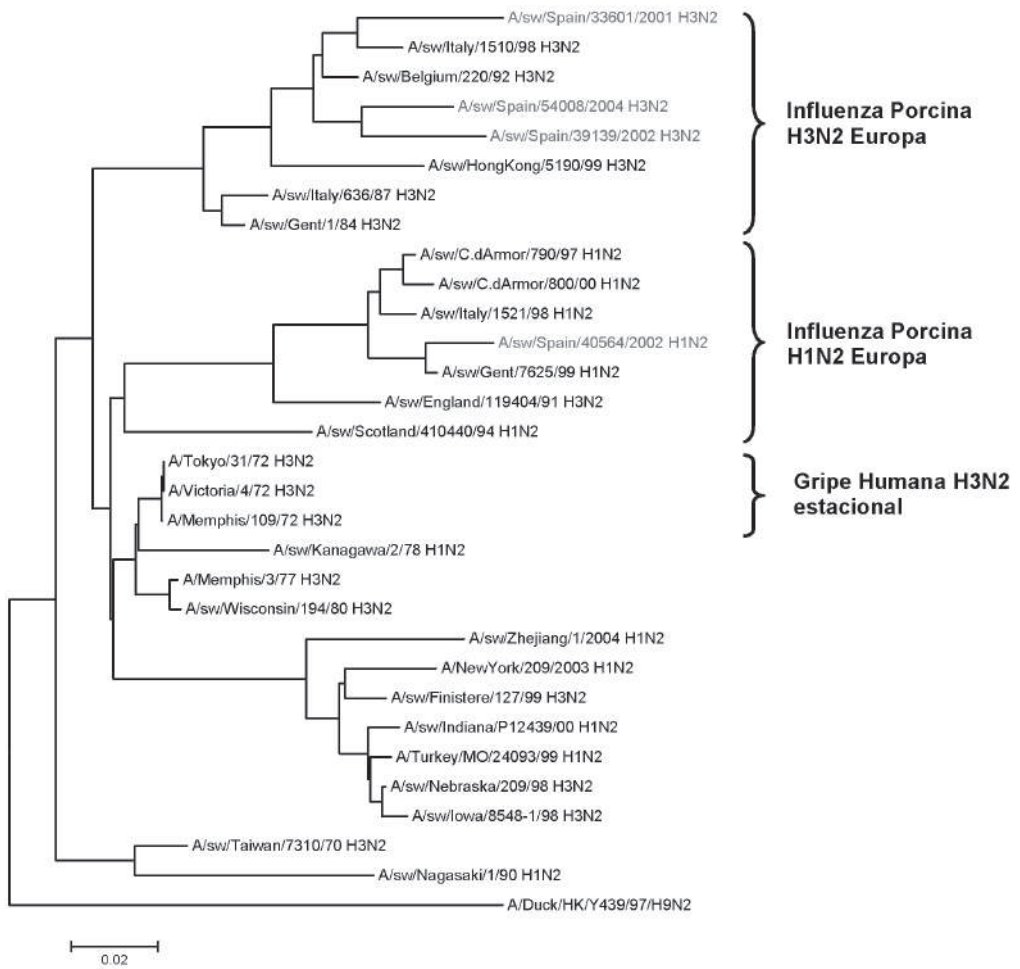
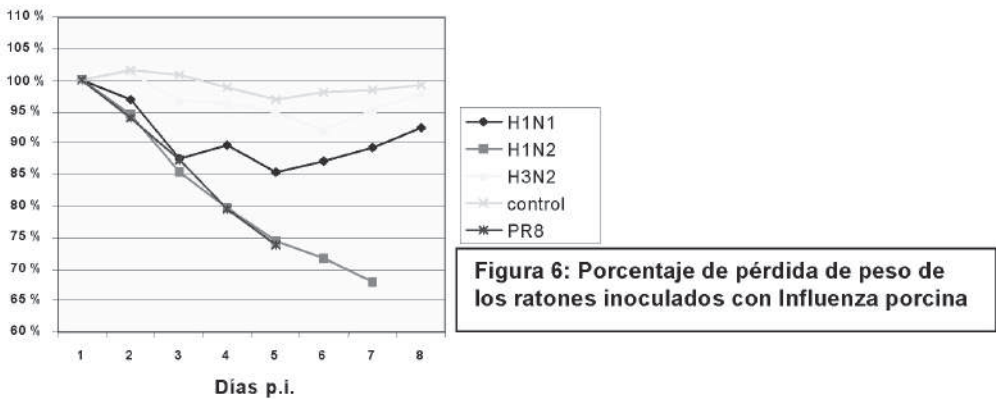


Figura 5: Árbol filogenético de la secuencia de nucleótidos de NA2

## 6. INFECCIÓN DE RATONES BALB/C CON VIRUS DE INFLUENZA PORCINA.

Para los experimentos de inoculación de virus Influenza porcinos en ratones se utilizaron ratones hembra de raza Balb/c de 8 semanas de edad. Todos los experimentos de infección experimental se llevaron a cabo en condiciones de alta seguridad biológica BSL3.

En un primer experimento, se hicieron 5 grupos de ratones (8 ratones/grupo) y cada grupo fue inoculado con 105ufp de cada uno de los subtipos de Influenza Porcina: H1N1, H1N2 y H3N2. Un cuarto grupo fue inoculado con 103 ufp de virus A/Puerto Rico/8/34, cepa adaptada al ratón, y el quinto se utilizó como control. Se observó pérdida de peso en todos los animales infectados entre el 2° y 5° día postinfección (Figura 6 ). Los animales inoculados con H1N2 murieron como consecuencia de la infección, el resto se recuperaron entre el 6° y 7° día.



**Figura 6: Porcentaje de pérdida de peso de los ratones inoculados con Influenza porcina**

Se hizo necropsia de 3 ratones de cada grupo a las 24, 48, 72 y 96 h, cogiendo los pulmones y la tráquea para la extracción de RNA y la RT•PCR (Figura 7) y la titulación viral (Figura 8).

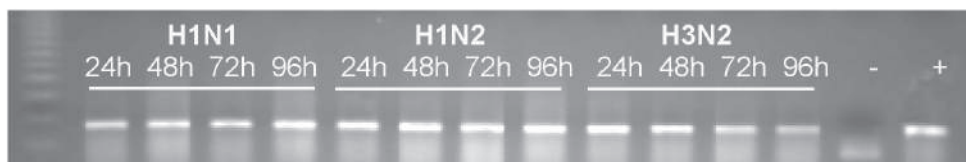
La extracción de RNA de las muestras recogidas se realizó con un método comercial basado en columnas de sílice: Viral RNA Isolation Nucleospin, de Macherey-Nagel, partiendo de 150  $\mu$ l de muestra y resuspendiendo el RNA obtenido tras la extracción en 50  $\mu$ l de agua estéril y libre de RNAsas. A partir del RNA extraído se detectó la presencia del virus por RT-PCR amplificando una región muy conservada de 100 pb del gen de la matriz. La reacción se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ l con el kit de Qiagen de OneStep RT-PCR a una concentración de 400  $\mu$ M de cada dNTP,

0.6  $\mu$ M de cada oligonucleótido, 1  $\mu$ l de Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix y 5U/ reacción de Rnase Inhibitor. El protocolo de RT-PCR llevado a cabo es el siguiente: retrotranscripción durante 30 minutos a 50° C, desnaturalización a 95° C 15 minutos y 40 ciclos con un primer tiempo de desnaturalización de 30 segundos, anillamiento 30 segundos a 59° C y un paso de elongación de 30 segundos a 72° C, el proceso tuvo un paso último de 72° C durante 7 minutos.

El producto amplificado se corrió en un gel de agarosa al 3% y fue visualizado con bromuro de etidio en un transiluminador de luz UV.

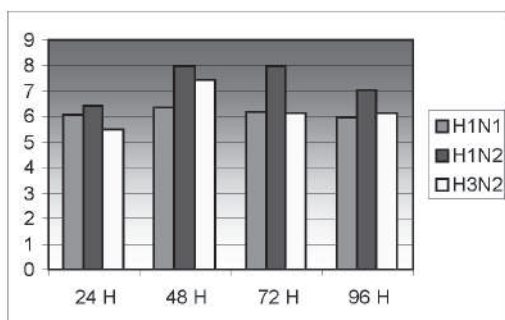
La secuencia de los oligonucleótidos utilizados es la siguiente:

- M-25: 5' AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG 3'
- M-124: 5' TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG 3'



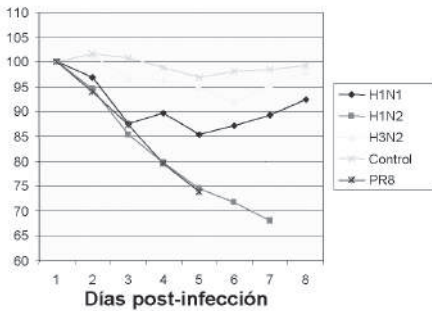
**Figura 7:** RT-PCR de macerado de pulmón tras la infección con IP a diferentes tiempos p.i.

Los resultados de titulación viral en pulmón (Figura 8), muestran que el H1N2 alcanza mayor replicación en tejido pulmonar que el H1N1 y que el H3N2, lo que se corresponde con una mayor patogenicidad en ratón. Además, los títulos mayores se alcanzaron entre las 48-72 h postinfección.



**Figura 8:** Título viral por TCID<sub>50</sub>/100 mg (log) de pulmones de ratón inoculados con 10<sup>5</sup> ufp de cada subtipo de IP a diferentes tiempos postinfección

En un segundo experimento, ratones preinfectados con H1N1 y H3N2 fueron desafiados con 105 ufp de H1N2, los resultados se muestran en la Figura 9: la exposición previa frente a otro subtipo, induce una respuesta protectora parcial frente a la infección con virus H1N2 reflejada en una menos pérdida de peso y mortalidad . La protección no es debida a los anticuerpos frente a la HA ya que no se detectaron anticuerpos reactivos frente a la HA de H1N2 por IHA en el suero de ratones preinfectados con H1N1 y H3N2 (Tabla 3), además la protección parece ser más eficaz cuando la infección previa es con virus H3N2, esto podría deberse a los anticuerpos crosreactivos frente a la NA.

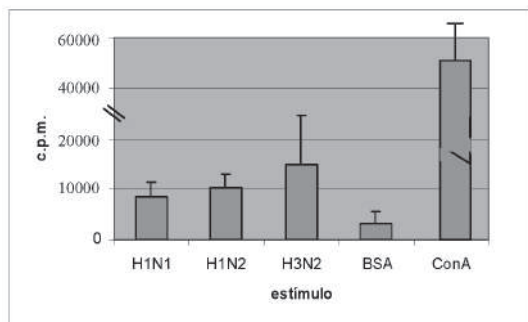


Subtipo	H1N1	H3N2
H1N1	>1280	<10
H1N2	<10	<10
H3N2	<10	>1280

Tabla 3: IHA de ratones preinfectados con H1N1 y H3N2

Figura 9: Porcentaje de pérdida de peso tras inoculación con el virus H1N2 de ratones preinfectados con H1N1 y H3N2

Las proteínas internas de las cepas porcinas tienen una elevada homología, éstas, principalmente la NP y la M están relacionadas con una respuesta inmune de tipo celular que no da lugar a una respuesta inmune protectora, pero podría estar relacionada con la protección inducida por la infección previa con H1N1. En experimentos de linfoproliferación (Figura 10) con esplenocitos de los ratones preinmunizados con H3N2 y desafiados con H1N2 no se observaron diferencias claras tras la estimulación con los tres subtipos lo que indicaría la homología de la inmunidad celular entre los tres subtipos.



**Figura 10: Linfoproliferación de esplenocitos de ratones infectados con H3N2 y estimulados con antígeno viral de los tres subtipos.**

## 7. INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE CERDOS CON VIRUS DE INFLUENZA PORCINA

Se llevó a cabo la infección experimental, bajo condiciones de alta seguridad biológica, de 36 cerdas, de raza Landrace y 6 semanas de edad, con tres subtipos del Virus de la Influenza Porcina (*H1n1*, *H1n2* y *H3n2*) aislados en España.

Los animales, seronegativos frente al virus de la gripe y libres también de otros agentes infecciosos (virus del Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino y *Mycoplasma spp*), fueron mantenidos en cuarentena y sometidos a un tratamiento con antibióticos de amplio espectro.

Se realizaron 3 experimentos independientes, uno para cada subtipo viral, con 12 cerdos por grupo (10 inoculados y 2 controles), y se inoculó a cada animal, por vía intratraqueal,  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de placa (UFP) en 1 ml de PBS de los siguientes virus: A/Swine/Spain/50047/2003 (*H1N1*), A/swine/Spain/40564/2002 (*H1N2*) y A/swine/Spain/54008/2004 (*H3N2*), aislados en cerdos de explotaciones ganaderas españolas y caracterizados antigénica y genéticamente en nuestro laboratorio.

A las 24, 72 horas y 8º día postinfección se sacrificaron dos cerdos y se realizó la necropsia completa tomando muestras de: cornete, tráquea craneal, media y caudal, todos los lóbulos pulmonares, tonsila y nódulos linfoides retrofaríngeo y mediastínico.

Las muestras se fijaron en formol y fueron incluidas en parafina sintética a modo de bloque. Los cortes histológicos, obtenidos a 4-5  $\mu\text{m}$  de grosor, se desparafinaron en xilol, se hidrataron en una serie decreciente de alcoholes y agua, y a continuación se realizaron: la tinción de Hematoxilina-Eosina convencional, el ácido peryódico



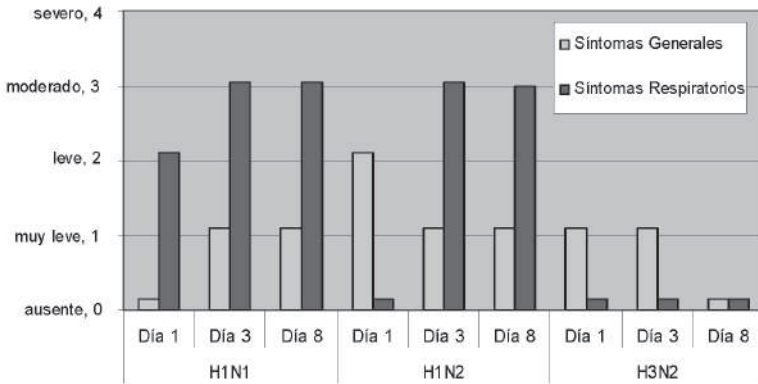
de Schiff (PAS), el tricrómico de Masson y una técnica inmunohistoquímica para determinar la presencia viral en los tejidos estudiados mediante la detección de la nucleoproteína del virus Influenza empleando un anticuerpo primario policlonal, obtenido en conejo, frente a la misma. Finalmente, se deshidrataron primero en una serie creciente de alcoholes, después se bañaron en xilol y se montaron con DPX®.

Diariamente se registró la temperatura rectal y el peso de todos los cerdos del experimento y se valoraron los signos clínicos generales (pérdida de peso, apatía, anorexia, etc.) así como los síntomas respiratorios (disnea, taquipnea, descarga nasal y conjuntivitis).

Además, se valoró macroscópicamente el porcentaje de neumonía de todos los lóbulos pulmonares así como el aumento de tamaño de los linfonódulos asociados al tracto respiratorio.

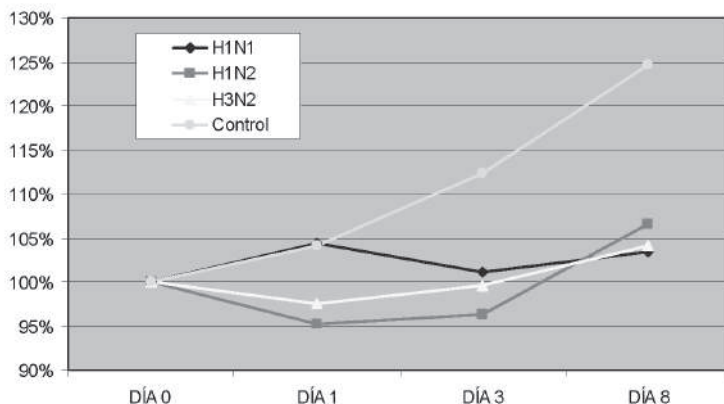
### 7.1 Estudio clínico

El comienzo de la infección fue de carácter agudo, apareciendo los primeros síntomas desde las 24 horas postinoculación. Los signos clínicos mostrados por los animales infectados fueron: anorexia, apatía, disnea leve, en ocasiones respiración abdominal, estornudos y descarga nasal; todos ellos de tipo muy leve a moderado, afectando principalmente a los animales inoculados con H1N1 y H1N2 (Figura 11).



**Figura 11.** Gravedad y evolución en el tiempo de los síntomas generales y respiratorios de los animales infectados de forma experimental con distintos subtipos del Virus de la Influenza Porcina.

Todos los animales sufrieron un retraso en el crecimiento con pérdida de hasta un 5% de peso respecto a los cerdos control, recuperándose entre las 72 horas y el 6° día postinfección (Figura 12).

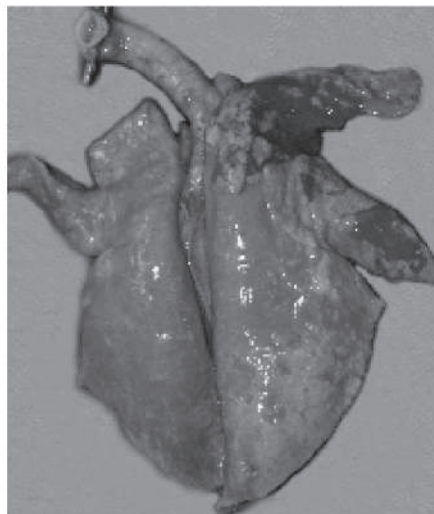


**Figura 12.** Porcentaje de pérdida de peso, respecto de los cerdos control, en animales infectados de forma experimental con distintos subtipos del Virus de la Influenza Porcina.

## 7.2 Estudio macroscópico

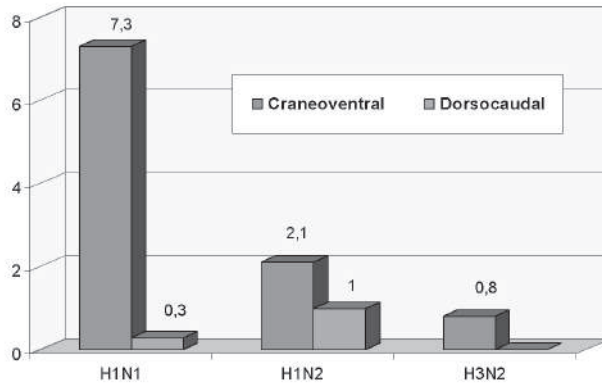
En general, los tres subtipos del virus de la Influenza Porcina (H1N1, H1N2 y H3N2) mostraron un **mismo patrón de lesiones macroscópicas pulmonares**. Se observó una mayor afectación de los lóbulos craneales pulmonares respecto de los caudales, siendo mayor la extensión de las lesiones con el tiempo (encontrándose más neumonía al octavo día de infección) (Figura 15).

Como hallazgo principal en los animales se evidenció una consolidación pulmonar, fundamentalmente en localización **craneoventral** del pulmón (Figura 13).



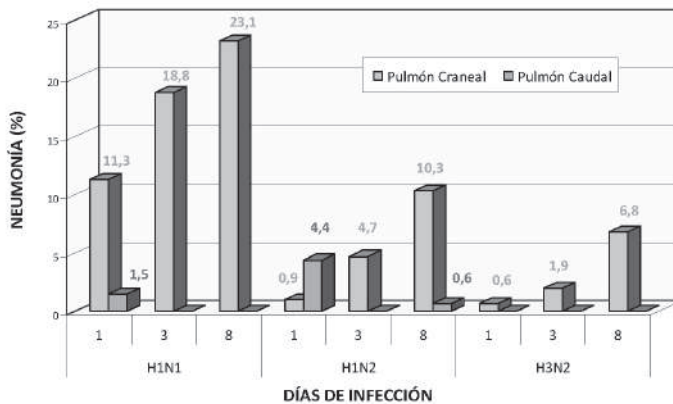
**Figura 13.** Bronconeumonía por H1N1 a las 72 horas post-infección.

El subtipo que mayores alteraciones macroscópicas produjo fue el H1N1, mientras que los animales inoculados con H1N2 y H3N2 presentaron porcentajes de bronconeumonía intermedios o menores que H1N1 respectivamente (Figura 14).



**Figura 14.** *Afectación del pulmón craneal y caudal (%) respecto del total en función del subtipo viral inoculado.*

No obstante, cabe destacar la elevada afectación pulmonar a nivel dorsocaudal en la infección por H1N2 (Figura 14). Así, los animales infectados por H1N2 presentaron una bronconeumonía muy extensa a día 1 en comparación con H1N1, que incluso superaba a la afectación pulmonar observada a nivel craneoventral (Figura 15).



**Figura 15.** *Porcentaje de parénquima pulmonar con neumonía en función del subtipo viral (H1N1, H1N2, H3N2) y del día de infección (días 1, 3 y 8).*

Las lesiones se caracterizaron por ser más congestivas y prominentes (bronconeumonía catarral) en los primeros días de infección (Figura 16), mientras que más firmes, oscuras y deprimidas (bronconeumonía supurativa subaguda) al cronificarse con el tiempo (Figura 17).

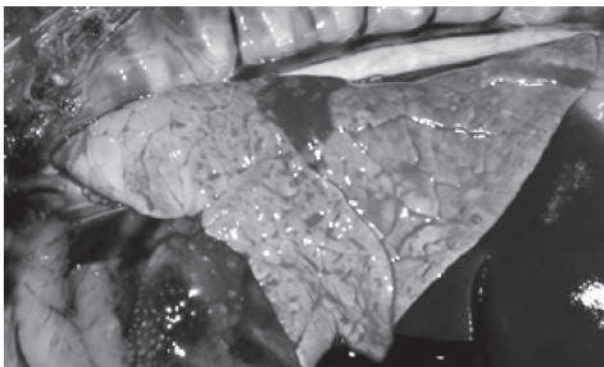


Figura 16. Bronconeumonía catarral por H1N2 a las 24 horas post infección (lesiones congestivas y prominentes).

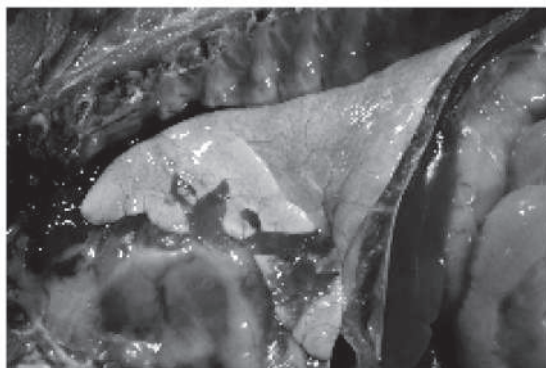


Figura 17. Bronconeumonía supurativa subaguda por H1N1 al 6º día post infección (lesiones oscuras, deprimidas y de consistencia firme).

En cuanto a los nódulos linfoides regionales, concretamente los linfonódulos retrofaríngeo y mediastínico, éstos presentaban linfadenomegalia como lesión macroscópica principal (Figura 18).

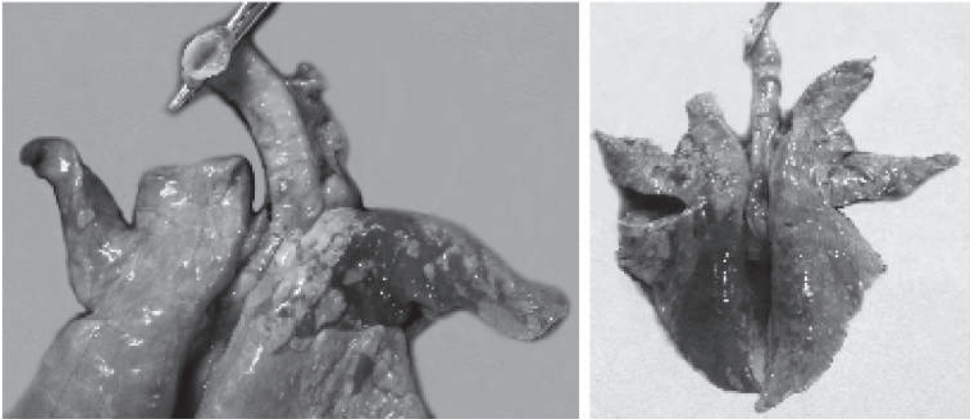
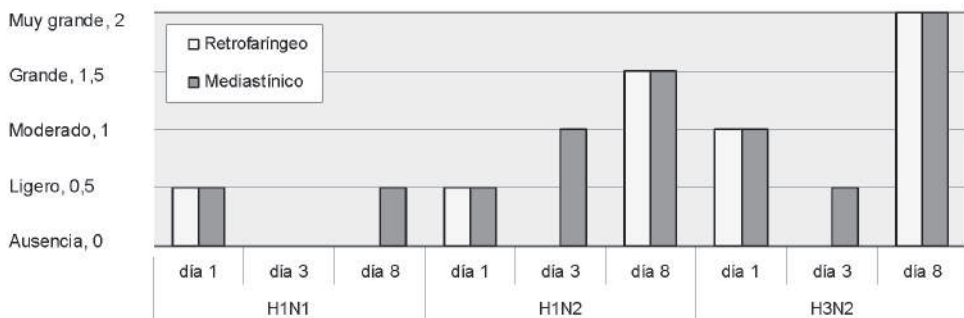


Figura 18. Linfadenomegalia de los nódulos linfoides asociados al aparato respiratorio (linfonódulos bronquial y mediastínico).

El linfonódulo mediastínico se encontraba aumentado de tamaño en todos los animales del estudio durante toda la infección, a excepción del subtipo H1N1 a día 3 postinfección. Sin embargo, en el nódulo linfoide retrofaríngeo sólo se halló un aumento de tamaño en los días 1 y 8 postinfección (únicamente a día 1 en el caso del subtipo H1N1), dado que experimentó una involución a su tamaño normal durante el tercer día de infección en todos los subtipos. Además, esta regresión en el tamaño a día 3 postinfección fue observada en ambos linfonódulos para todos los subtipos (salvo en el nódulo linfoide mediastínico de animales infectados con H1N2) (Figura 19).



**Figura 19.** Aumento de tamaño de los nódulos linfoides retrofaríngeo y mediastínico en función del subtipo inoculado (H1N1, H1N2 y H3N2) y del día de infección (1, 3 y 8).

### 7.3 Estudio histopatológico

En general, todos los subtipos provocaron una traqueítis descamativa, que fue muy leve en el caso del subtipo H3N2, leve en H1N1 y moderada en H1N2 (Figura 20).

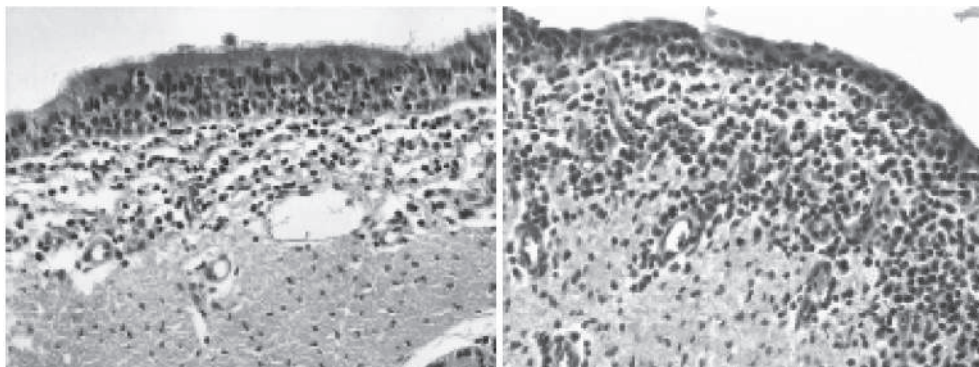
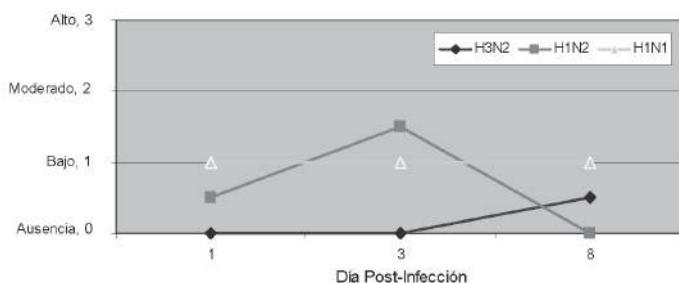


Figura 20. Traqueítis descamativa leve por H1N1 (izda) y moderada por H1N2 (dcha) a las 24 horas post-infección. Técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E), 20x.

Los tres subtipos se caracterizaron por la presencia de edema ligero y **un infiltrado inflamatorio predominantemente de células redondas** (linfocitos, macrófagos y células plasmáticas).

A diferencia del H3N2, los subtipos **H1N1 y H1N2 resultaron ser más lesivos** dado que provocaron amplias zonas de erosión y úlcera a nivel del epitelio traqueal (Figura 21).



**Figura 21.** Grado de erosión y ulceración de la mucosa traqueal en función del subtipo viral y del tiempo.

Sin embargo, el subtipo **H1N2 produjo lesiones ligeramente más graves a nivel traqueal que el H1N1**, pero éstas afectaron a menor número de animales; mientras



que el **H1N1 provocó lesiones algo menos graves** pero constantes en todos los animales del grupo.

A nivel de los cornetes, se observó una rinitis de tipo descamativo de grado variable. Estadísticamente se comprobó que H1N1 producía lesiones significativas de mayor grado agudas que H3N2 ( $p = 0,001$ ) y crónicas que H1N2 ( $p = 0,007$ ). Entre las lesiones halladas, destacaron la erosión o úlcera y la hiperplasia del epitelio (Figura 22). En la infección por H1N1 sobresalía la erosión (grado moderado), en H3N2 la hiperplasia (moderada) y en H1N2 ambos parámetros se encontraron en un grado ligero. Además se vio, independientemente del subtipo valorado, un predominio de células redondas en el infiltrado inflamatorio.

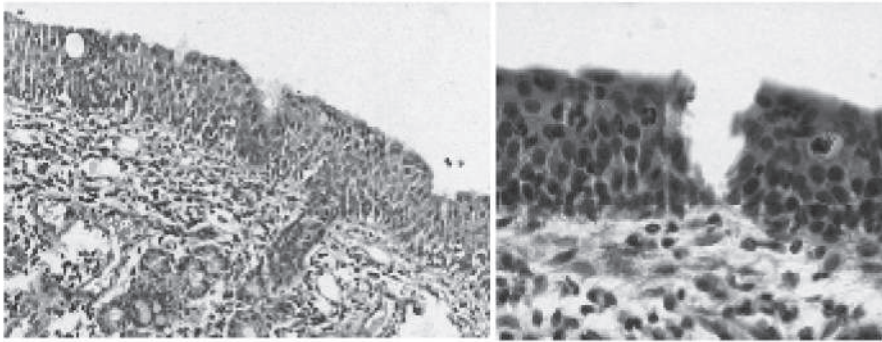


Figura 22. Zonas de hiperplasia (izda, 10 X), erosión y úlcera (dcha, 40 X) de la mucosa de los cornetes de animales inoculados con H1N1 y sacrificados durante la fase aguda de la infección. Técnica de H-E.

A nivel del **tracto respiratorio inferior** se encontraron también diferencias histopatológicas entre los distintos subtipos, pero de carácter sutil. En el caso del subtipo H1N2 los animales presentaron una **alveolitis descamativa leve** tanto en pulmón craneal como caudal, pero de mayor grado que en los subtipos H1N1 y H3N2, donde resultó ser muy leve. En relación con el curso de la infección, en los tres subtipos el grado de descamación resultó ser mayor al 8° día en pulmón craneal. Caudalmente el subtipo H1N2 presentó mayor descamación a día 1 (Figura 23).



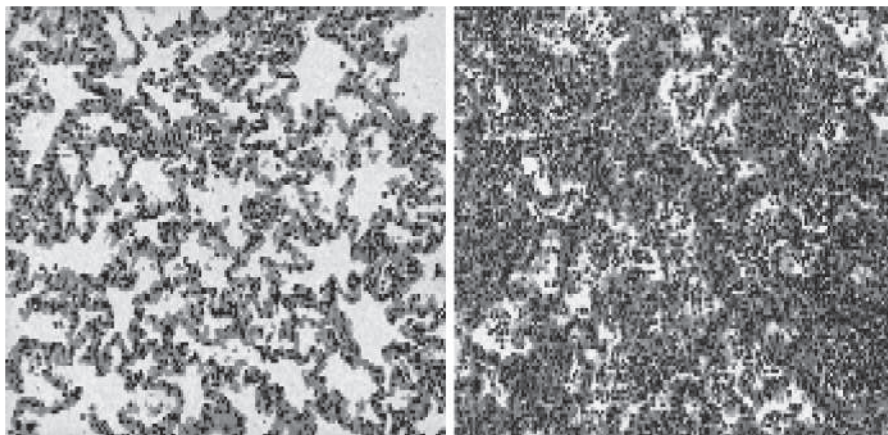


Figura 23. Alveolitis descamativa leve a nivel craneal (izda) y moderada a nivel caudal (dcha) del pulmón en la infección por H1N2 a las 24 h. Técnica de H-E, 10 X.

En general, todos los animales mostraron un infiltrado inflamatorio, predominantemente de linfocitos y macrófagos, que fue considerablemente mayor a nivel craneal del pulmón que caudalmente. El grado de inflamación se valoró a tres niveles y se comparó entre los tres subtipos. A nivel **pericanalicular** (Figura 24) este infiltrado fue significativamente mayor ( $p = 0,008$ ) en el pulmón caudal para H1N2 que H1N1, mientras que cranealmente no se encontraron diferencias entre subtipos.

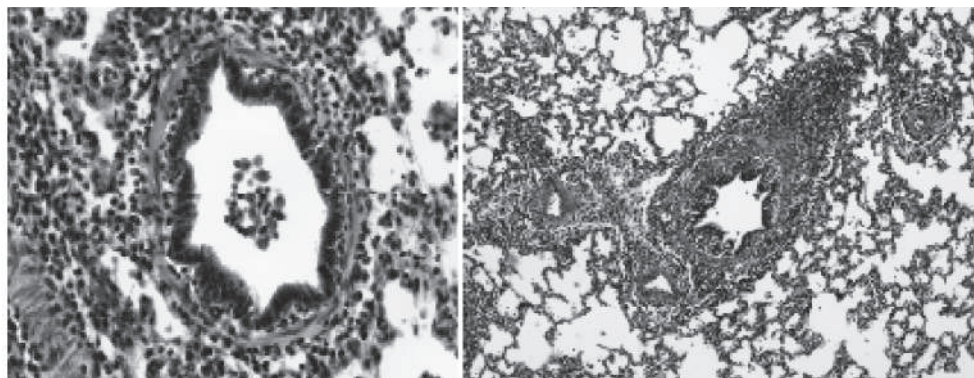


Figura 24. Inflamación crónica pericanalicular por H1N2 (izda, 20 X) y perivascular por H1N1 (dcha, 10 X). Técnica de H-E.

A nivel **perivascular e interalveolar** (Figura 25), el infiltrado de células inflamatorias redondas fue muy similar en pulmón craneal y caudal respectivamente independientemente del subtipo inoculado y del día de infección.

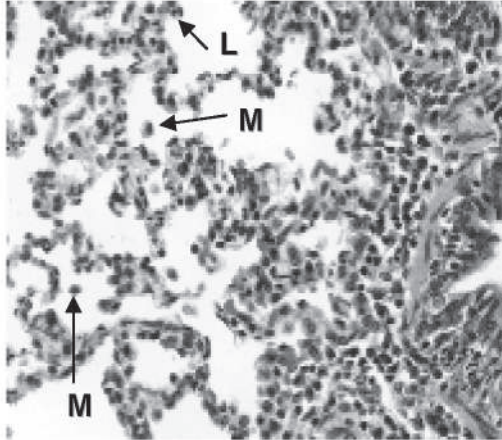


Figura 25. Macrófagos (M) y linfocitos (L) a nivel interalveolar en la infección por el subtipo H1N1. Técnica de H-E, 20 X.

Al determinar la fibrosis pulmonar, se vieron valores similares para H1N1 y H1N2, tanto en zona craneal como caudal, y superiores a los encontrados en H3N2. El **grado de fibrosis intralveolar** (Figura 26) fue mayor para el subtipo H1N1 en todo el pulmón, observándose principalmente hacia el final de la infección. En H1N2 el grado de fibrosis fue inferior que en H1N1, pero sólo a nivel craneal pulmonar, dado que caudalmente se encontraron valores similares. Por otro lado, los animales inoculados con H3N2 no mostraron fibrosis del parénquima pulmonar en ningún momento.

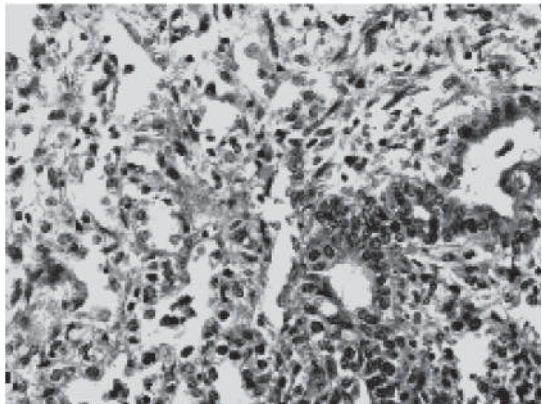


Figura 26. Fibrosis intralveolar por H1N2 en pulmón central. Tricrómico de Masson, 20 X.

A nivel **septal o interalveolar** (Figura 27) se evidenció un grado leve de fibrosis, pero las diferencias encontradas fueron mínimas.

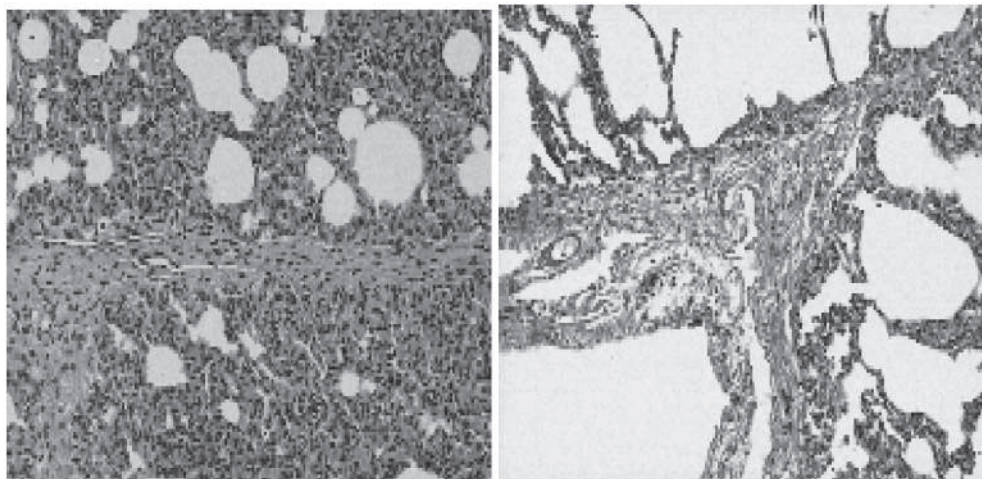


Figura 27. Fibrosis septal por H1N1 en pulmón craneal. Técnica de H-E (izda) y Tricrómico de Masson (dcha), 10 X.

A nivel de los **órganos linfoides** también se encontraron hallazgos histopatológicos de gran interés en la infección por virus Influenza. Los linfonódulos regionales, retrofaríngeo y mediastínico, presentaron lesiones microscópicas de grado variable en función del subtipo viral. En general, los folículos linfoides se encontraban muy activados en los tres subtipos. En los nódulos linfáticos infectados por H1N1 y H1N2 se observó una depleción linfoide (Figura 28) de grado leve a moderado durante toda la infección, siendo ligeramente mayor para H1N1 que para H1N2 (excepto para H1N2 a nivel mediastínico, donde se observó únicamente hacia la fase aguda de la misma).

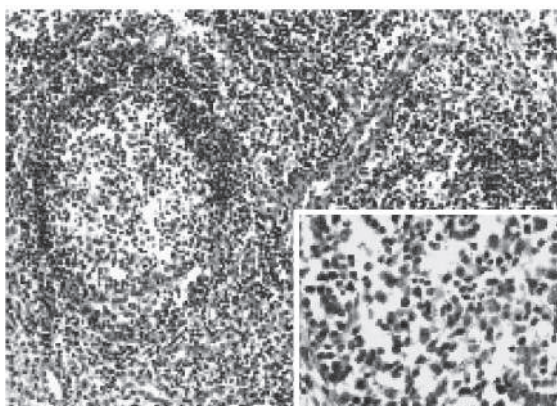


Figura 28. Depleción linfoide del nódulo mediastínico por H1N1. Técnica de H-E, 10 X (izda) y 40 X (dcha).



Además de la depleción, el subtipo H1N1 mostró una moderada histiocitosis sinusal (Figura 29) en el nódulo mediastínico, presente a lo largo de toda la infección, y hemosiderosis de grado medio también durante la misma. Sin embargo, el subtipo H3N2 causó una depleción muy leve en ambos linfonódulos hacia la fase crónica de la infección y se caracterizó por la presencia de edema moderado constante y una moderada proliferación de histiocitos en localización retrofaríngea, sobre todo hacia la fase final del estudio. El subtipo H1N2 presentó valores intermedios entre los otros virus para parámetros tales como el edema a nivel retrofaríngeo, la hemosiderosis, la histiocitosis sinusal y la depleción linfoide anteriormente citada.

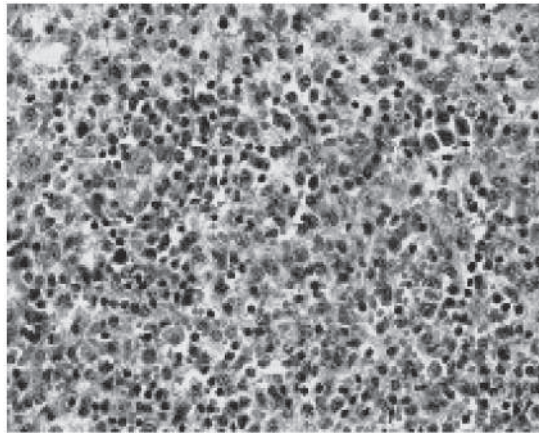


Figura 29. Histiocitosis sinusal del linfonódulo mediastínico por H3N2. Técnica de H-E, 20 X .

La tonsila se encontraba muy reactiva en todos los animales durante toda la infección. Se observó una importante depleción linfoide, pero de bajo grado, como consecuencia de la infección por los virus H1N1 y H3N2 (muy bajo en H1N2).

Todos los animales del experimento mostraron una hiperplasia de la zona cortical del timo durante todo el estudio, a excepción de aquellos inoculados con el virus H1N1. En estos últimos, se observó una atrofia de la zona medular durante la fase aguda de la infección.

#### 7.4. Estudio inmunohistoquímico

Los tres subtipos virales infectaron el **tracto respiratorio superior** de los animales durante la fase aguda de la infección. Las células diana principales fueron las del

**epitelio respiratorio** (Figura 30), aunque también se infectaron, pero en menor grado, los **linfocitos** (Figura 31) que acudieron al lugar de infección como mediadores de la respuesta inflamatoria. La mayor presencia viral se observó en las células epiteliales y linfocitos de la tráquea de los animales infectados con H3N2 y H1N2 respectivamente, y en las células epiteliales, linfocitos y macrófagos de los cornetes nasales de los animales inoculados con H1N2. La presencia de H1N1 en tráquea fue reducida, afectando sólo a unas pocas células epiteliales y no se detectaron antígenos virales en los cornetes de animales infectados con H1N1 y H3N2.

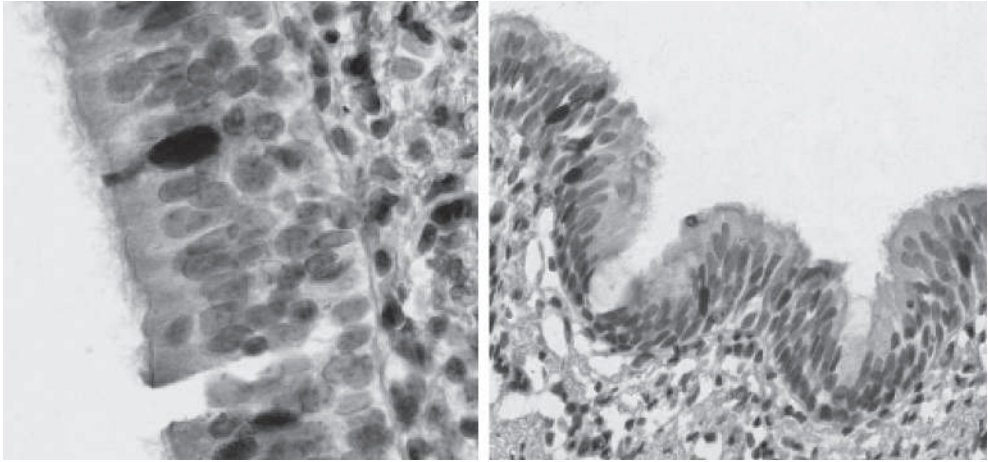


Figura 30. Detección inmunohistoquímica del subtipo H3N2 del virus de la Influenza Porcina en células epiteliales de la tráquea de animales sacrificados a las 24 horas post-infección

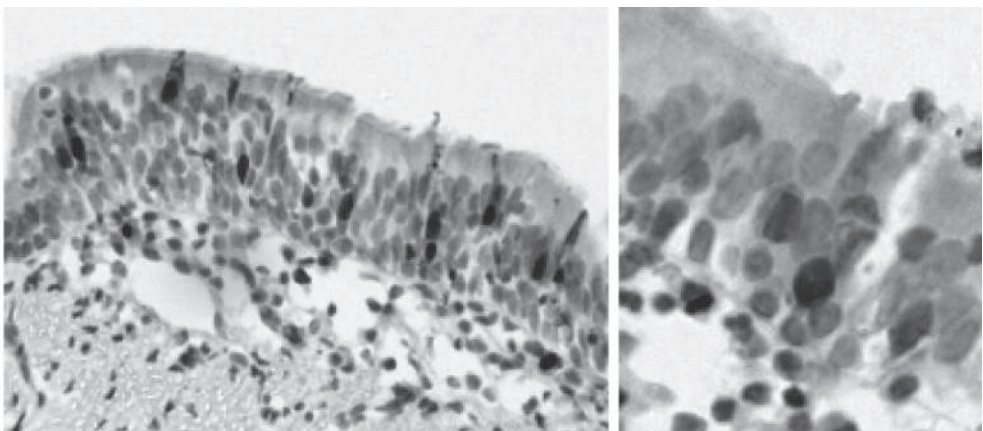


Figura 31. Detección inmunohistoquímica del subtipo H1N1 en células epiteliales bronquiolares, linfocitos y macrófagos del LCD del pulmón de animales sacrificados a las 24 horas post-infección

Además de la tráquea y los cornetes, también se vio afectado el tracto respiratorio inferior de los animales. El epitelio respiratorio pulmonar (bronquio, bronquiolo y alveolo) resultó ser también una de las dianas principales para la replicación viral. Se observó presencia viral en células epiteliales, linfocitos y macrófagos tanto del lóbulo craneal derecho (LCD) como del lóbulo caudal izquierdo (LCdI) del pulmón, aunque con diferencias entre los distintos subtipos.

El subtipo **H1N1 siguió el patrón clásico de infección**, detectándose presencia viral en el LCD a día 1 postinfección y en el LCdI a días 3 y 8 postinfección, pero en menor medida (Figuras 32 y 33).

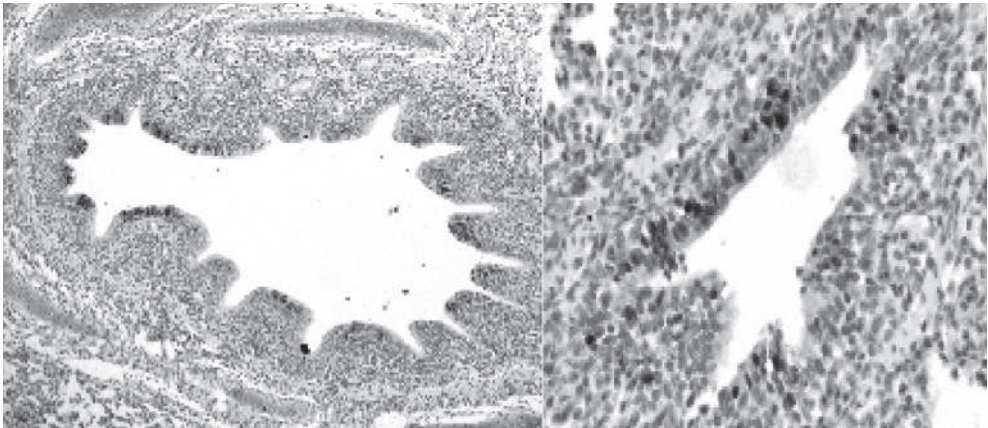


Figura 32. Detección inmunohistoquímica del H1N1 en células epiteliales bronquiolares y bronquiolares, linfocitos y macrófagos del LCD del pulmón de animales sacrificados a las 24 horas post-infección.

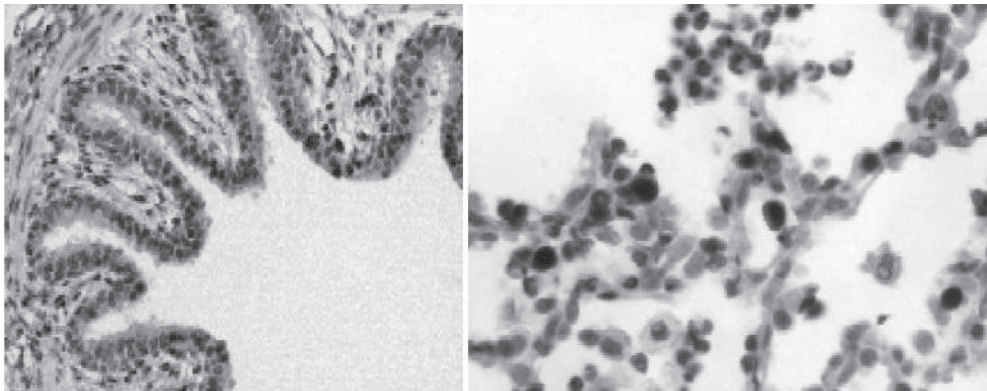


Figura 33. Detección inmunohistoquímica del H1N1 en células epiteliales bronquiolares y bronquiolares del LCdI, del pulmón de animales sacrificados al tercer y octavo día post-infección



El subtipo **H1N2** estuvo presente tanto en pulmón craneal como caudal a días **1 y 3 post-infección**, permaneciendo puntualmente en macrófagos del parénquima pulmonar del lóbulo craneal derecho al 8° día post infección y desapareciendo por completo del lóbulo caudal izquierdo ese mismo día (Figura 34).

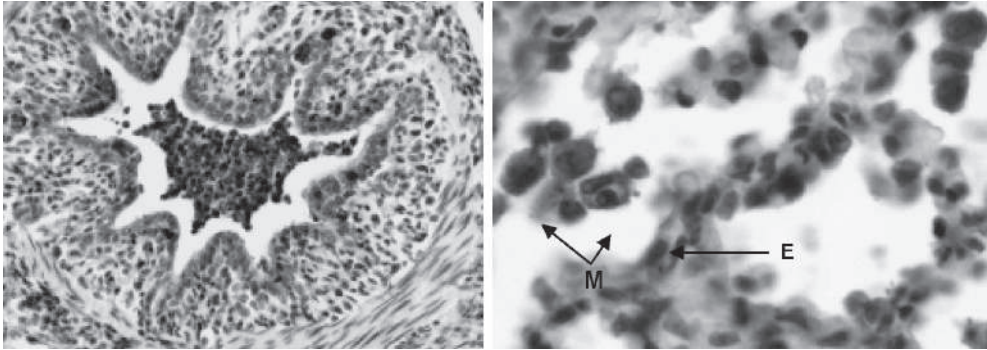


Figura 34. Detección inmunohistoquímica de H1N2 en células epiteliales, linfocitos y macrófagos del pulmón caudal (LCdI) de animales sacrificados 24 horas post-infección (Izda 20 X, dcha 40 X).

A diferencia de estos subtipos, el subtipo H3N2 (Figura 35) se mantuvo en niveles importantes, tanto en pulmón craneal como caudal, hasta el 8° día postinfección, apareciendo en el lóbulo caudal izquierdo hacia el tercer día post-infección.

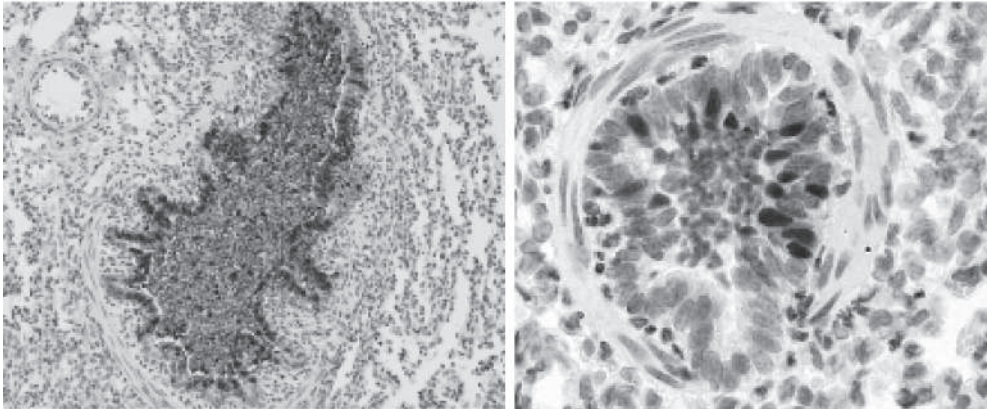


Figura 35. Detección inmunohistoquímica de H3N2 en células epiteliales, linfocitos y macrófagos del pulmón craneal (LCD) de animales sacrificados 24 horas post-infección (Izda 10 X, dcha 40 X).



En cuanto al tejido linfoide, cabe destacar que **no se detectó presencia viral en el linfonódulo mediastínico y la tonsila en el caso del subtipo H1N1**, pero sí en los subtipos restantes. Ambos subtipos, H1N2 y H3N2, estaban presentes en bajo grado en las células epiteliales de la tonsila a las 24 horas de infección, desapareciendo por completo a lo largo de la misma (Figura 36).

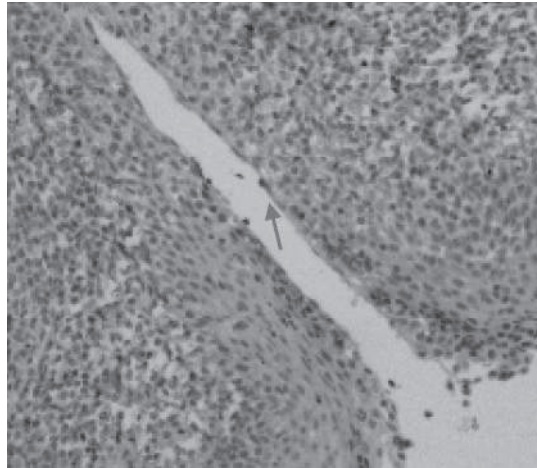


Figura 36. Detección inmunohistoquímica de H1N2 en células epiteliales de la tonsila a las 24 horas post-infección 10 X.

Sin embargo, la presencia viral en el nódulo linfoide mediastínico fue detectable desde las 24 y 72 horas postinfección para el H3N2 y H1N2 respectivamente, manteniéndose durante todo el transcurso de la misma (Figura 37).

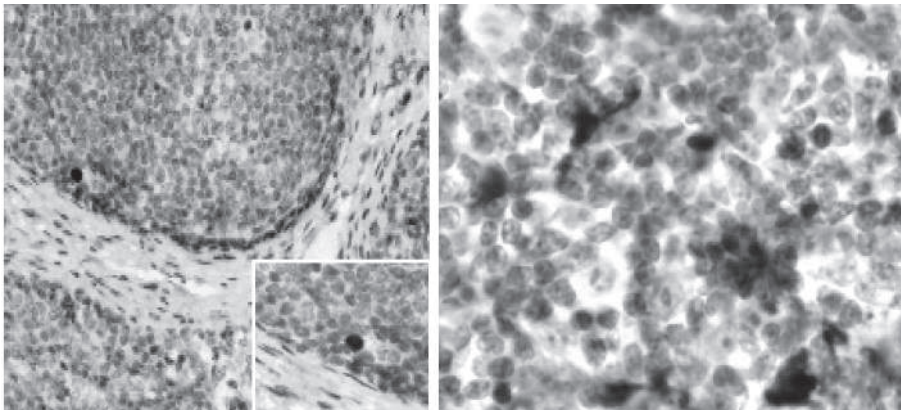
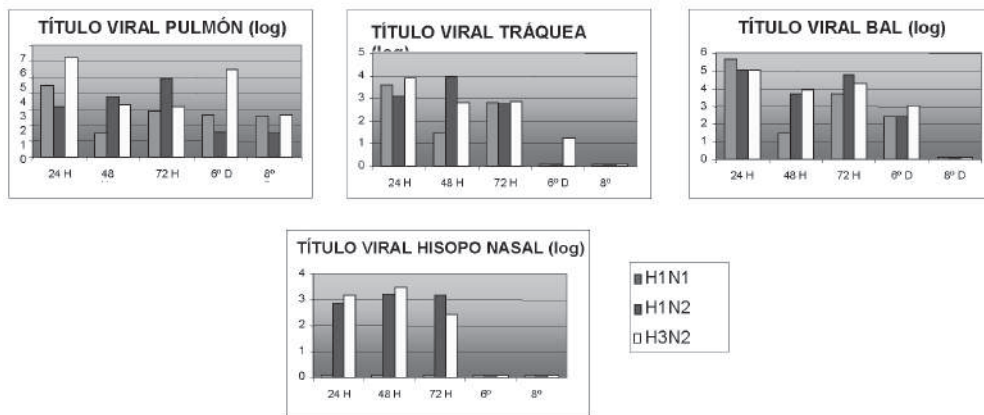
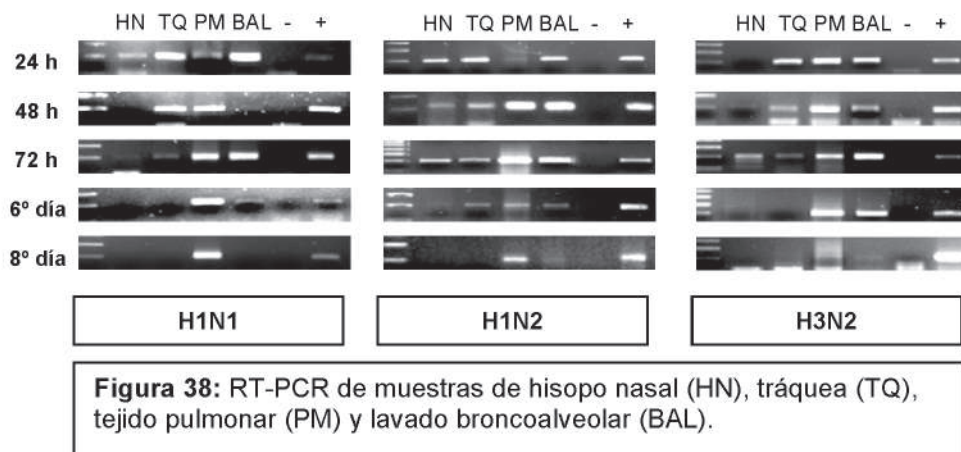


Figura 37. Detección inmunohistoquímica de H1N2 (izda) y H3N2 (dcha) en linfocitos y células dendríticas del nódulo linfoide mediastínico al tercer día post-infección. 40 X.

Para estudiar la presencia de virus en distintas localizaciones del tracto respiratorio se realizaron RT-PCR. En la figura 39 se muestra los resultados de RT•PCR en muestras de tejido pulmonar, tráquea, hisopo nasal y lavado broncoalveolar (BAL). Las muestras que resultaron ser positivas en la RT•PCR se inocularon en células para titulación viral por TCID<sub>50</sub>/100 miligramos (Figura 38).



**Figura 39:** Titulación viral por TCID<sub>50</sub>/100 miligramos de tejido de tráquea y pulmón y por TCID<sub>50</sub>/mililitro de hisopo nasal, y lavado broncoalveolar (BAL).

Los subtipos H3N2 y H1N2 mostraron una gran eliminación vía nasal con elevados títulos en secreciones nasales, lo que les hace altamente transmisibles, por el contrario el H1N1 no se detectó a lo largo del experimento en hisopo nasal mostrando mayor replicación en tráquea y pulmón. En la infección por los tres virus se alcanzaron elevados títulos en pulmón entre las 24•72 horas detectándose incluso a día 8 postinfección.

## DISCUSIÓN

### 1. PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR INFLUENZA PORCINA

El estudio epidemiológico realizado ha mostrado la alta prevalencia de la Influenza porcina en España: el 83% de los sueros analizados por IHA fueron positivos a uno o más subtipos. Por otra parte, la elevada incidencia de dobles y triples infecciones (79% de las granjas positivas) indica una alta tasa de coinfecciones con distintos subtipos lo cual pone de manifiesto la falta de protección cruzada entre ellos. Es interesante indicar que el estudio se ha realizado en cerdos de engorde cuyo ciclo de vida es sólo de alrededor de un año. La existencia de múltiples coinfecciones tiene gran importancia desde el punto de vista epidemiológico ya que se incrementa la posibilidad de generación de nuevas cepas virales por combinación de las existentes.

La prevalencia en España se corresponde con la de otros países europeos como Bélgica, donde un estudio de 1998, mostró que el 100% de las granjas muestreadas eran seropositivas (**Van Reeth 2003**).

### 2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL AISLADO H1N2 A/SWINE/40564/SPAIN/2003

Aunque se han reportado aislados H1N2 principalmente en Norteamérica y Asia, originadas por reagrupamiento génico entre cepas porcinas clásicas H1N1 y cepas porcinas H3N2, el análisis filogenético de la HA y la NA del virus H1N2 A/Swine/40564/Spain/2003 confirma la elevada homología de su HA con aislados humanos H1N1 de los años 80 y la relación de la NA con cepas circulantes porcinas H3N2 coincidiendo con el origen filogenético de la mayoría de aislados H1N2 europeos circulantes actualmente. Aparte del virus H1N2, hemos determinado la secuencia del genoma completo de otros aislados españoles de los subtipos H1N1 y H3N2 que están siendo utilizados en los estudios filogenéticos del virus pandémico H1N1 de 2009 en

cuya composición se encuentran segmentos génicos de virus porcinos de procedencia euroasiática (**Garten R.J. y col., 2009**).

### 3. REACTIVIDAD CRUZADA

Los ensayos de Inhibición de la Hemaglutinación, Inhibición de la Neuraminidasa y de Seroneutralización mostraron que no existe reactividad cruzada entre anticuerpos frente a la HA de virus heterólogos así como entre virus homólogos como es el caso de los subtipos porcinos H1N1 y H1N2. Esto pone de manifiesto su origen filogenético diferente como se ha comentado anteriormente. Por otra parte, las NAs de H1N2 y H3N2 sí mostraron reactividad cruzada relacionándolo igualmente con su origen filogenético. Esta reactividad cruzada entre anticuerpos frente a la NA es de gran importancia dado que, aunque la respuesta inmune protectora está constituida por anticuerpos frente a la HA, estudios recientes en ratón han mostrado que la respuesta inmune frente a la NA puede dar lugar a un cierto grado de protección heterosubtípica (**Sylte, 2007**) con lo que tiene implicaciones en la protección conferida al hospedador preinmunizado con una cepa e infectado posteriormente con otra de NA similar.

Las vacunas actuales frente a gripe porcina sólo incluyen los subtipos H1N1 y H3N2 y no consideran ni la evolución antigénica de estos subtipos ni la aparición más reciente del H1N2. En la población humana las vacunas frente a la gripe son revisadas anualmente debido a la alta variabilidad antigénica de las cepas circulantes y a la aparición de nuevos subtipos como el H1N1 de origen porcino que se ha extendido mundialmente y frente al cual las vacunas existentes no son eficaces. Una de las razones de esa elevada variabilidad antigénica en la gripe humana es la presión inmune a la que se ve sometida el virus, esta presión no es tan manifiesta en la población porcina, la vacunación no es una práctica habitual y el cerdo es un animal de producción de ciclo corto con lo que la evolución del virus en el hospedador es más limitada. Hemos visto por los ensayos de reactividad cruzada que ésta es escasa entre subtipos lo que hace necesario estudiar la eficacia de las vacunas frente a las cepas circulantes actualmente y valorar la incorporación del subtipo H1N2.

### 4. PATOGENICIDAD EN RATÓN

Los resultados obtenidos en la infección experimental con virus de Influenza porcina en ratón mostraron que el subtipo H1N2 fue el más patógeno provocando la

muerte de los ratones infectados. Tras la infección con H1N2 los títulos alcanzados fueron mayores que tras la infección con los otros subtipos lo que se correspondería con una mayor virulencia.

El ratón es un buen modelo para estudiar la infección por virus Influenza porcina así como la inmunidad generada ante la infección con virus heterólogos en ratones preinmunizados valorando la calidad de esta protección en la respuesta tanto humoral como celular. Los anticuerpos frente a la HA son los que neutralizan la infectividad viral, los anticuerpos frente a la NA podrían dar cierta protección frente a la infección entre cepas de NA similar, en experimentos *in vitro* vimos que la reactividad cruzada entre anticuerpos frente a la HA es nula entre virus heterólogos y que existe una reactividad cruzada entre anticuerpos frente a la NA de H1N2 y H3N2 que podría otorgar una cierta protección cruzada, que aunque no impide la infección, sí podría, en cierto modo controlarla. Por otra parte no se observaron diferencias en la inmunidad celular entre los tres subtipos

## 5. PATOGENICIDAD EN CERDO

Los resultados obtenidos han mostrado que los tres subtipos del Virus de la Influenza Porcina (H1N1, H1N2 y H3N2) fueron capaces de inducir en los animales del estudio síntomas y lesiones compatibles con una infección por el virus de la gripe (**Thacker 2001, Landolt 2003, Jung 2005 y Sreta 2009**).

Todos los cerdos sufrieron un retraso en el crecimiento con pérdidas de peso de hasta el 5%, recuperándose entre las 72 horas y el sexto día post-infección, esto se corresponde con lo que sucede en el campo: tras la infección por virus Influenza se produce un retraso en el crecimiento de los animales lo que se traduce en importantes pérdidas económicas.

En nuestro estudio se afectaron en mayor grado los animales inoculados con los subtipos H1N1 y H1N2 que con H3N2, aunque los títulos virales alcanzados en tracto respiratorio fueron similares entre los tres subtipos las lesiones fueron más severas en los animales inoculados con H1N2 y no aparecieron lesiones macroscópicas reseñables en los cerdos inoculados con H3N2.

**A nivel macroscópico** se observó una mayor afectación craneoventral del pulmón, correspondiente con una **bronconeumonía intersticial** más extensa en el caso de los subtipos H1N1 y H1N2 en comparación con H3N2. Estos resultados coinciden con lo descrito por Sreta y col. en 2009, los cuales encontraron mayor lesión pulmonar

en los cerdos infectados con H1N1 respecto a los inoculados con H3N2. Sin embargo, en nuestro estudio pudimos apreciar una **mayor afectación dorsocaudal** del pulmón desde el primer día de infección, anteriormente no documentada en la bibliografía, en los animales inoculados con el subtipo H1N2.

A nivel del tracto respiratorio no se encontraron diferencias en cuanto al tipo de lesiones histológicas observadas en función del subtipo inoculado, pero sí en cuanto a la severidad de las mismas, siendo más lesivos los subtipos H1N2 y H1N1 que el subtipo H3N2, en los que sobresalían la erosión y la úlcera sobre la hiperplasia epitelial.

El estudio inmunohistoquímico demostró el tropismo específico de los tres subtipos del Virus de la Influenza Porcina por el **epitelio respiratorio**. También se observó una inmunotinción positiva en células mononucleares: **linfocitos y macrófagos**. La mayor presencia viral detectada a nivel del tracto respiratorio superior se correspondió con el subtipo H1N2 (seguido del H3N2), encontrándose incluso a nivel de los cornetes nasales de los animales hasta el tercer día de infección, ésto se corresponde con mayores títulos virales alcanzados en hisopo nasal y tráquea en los animales inoculados con H1N2 y H3N2, lo que indicaría una mayor transmisibilidad frente al subtipo H1N1. En general, en los cerdos inoculados con el subtipo H3N2 se observó el mayor grado de presencia viral en relación con el tiempo de infección.

Por otra parte, la mayor presencia viral en pulmón tras la inoculación con H3N2 no se corresponde con una mayor gravedad de las lesiones, este hecho unido a la mayor linfadenopatía asociada a las lesiones por H3N2 y a una depleción linfoide más marcada en los subtipos H1N1 y H1N2, indica que en la patogenia de la infección influyen tanto factores del propio virus, como factores del hospedador, concretamente relacionados con la respuesta inmune. Tal y como está descrito en gripe humana, la gravedad de las lesiones se encuentra muy asociada a una exacerbada respuesta inflamatoria del hospedador, por tanto, para comprender el curso y la severidad de la infección gripal, es necesario estudiar, no sólo los factores de virulencia del virus, sino también los mecanismos de respuesta inmune e inflamatoria del hospedador.

## CONCLUSIONES

1. Mediante el análisis de 1500 sueros por IHA se ha mostrado la elevada prevalencia de Influenza porcina en la cabaña porcina en España: 83% de los sueros analizados fueron positivos a uno o más subtipos

2. Existe una alta tasa de coinfecciones por diferentes subtipos lo que indicaría una ausencia de protección cruzada frente a infecciones posteriores por subtipos diferentes
3. El análisis filogenético de la HA y NA del virus H1N2 A/Swine/40564/Spain/2003 muestra la elevada homología de su HA con aislados humanos H1N1 de los años 80 y la relación de la NA con cepas circulantes porcinas H3N2, como ocurre con la mayoría de los aislados H1N2 europeos.
4. Los datos de secuencias genéticas de los virus descritos en este estudio fueron depositados en las bases de datos internacionales y han servido para determinar la genealogía del virus H1N1 humano responsable de la pandemia actual: la NA de las cepas porcinas H1N1 españolas tiene una elevada homología con la cepa H1N1 humana, lo que indica el origen porcino de la misma.
5. No existe reactividad cruzada entre anticuerpos frente a la HA de virus heterólogos ni entre virus homólogos como el caso de H1N1 y H1N2.
6. Los subtipos H1N2 y H3N2 sí mostraron reactividad cruzada en los ensayos de Inhibición de la Neuraminidasa lo que confirma su origen filogenético común.
7. El subtipo más patógeno en ratón fue el H1N2 provocando la muerte de los ratones infectados y alcanzando mayores títulos en tejido pulmonar.
8. Existe una cierta protección cruzada en el modelo ratón entre los subtipos H1N2 y H3N2 que podría estar relacionada con los anticuerpos generados frente a la NA viral
9. En cerdos los títulos virales alcanzados en el tracto respiratorio fueron similares en los tres subtipos aunque los animales infectados con H1N2 presentaron lesiones histopatológicas más severas en pulmón y tráquea que los animales inoculados con H3N2 lo que podría relacionarse con una diferente respuesta inflamatoria del hospedador.
10. La detección viral en el tracto respiratorio y el tejido linfoide asociado de animales infectados de forma experimental con virus Influenza resultó ser variable en función del subtipo inoculado y del tiempo de infección.
11. A nivel del tracto respiratorio superior (tráquea y cornetes), el subtipo H1N2 provocó las lesiones histopatológicas más severas (descamación), hecho posiblemente relacionado con la acción directa del mismo, al ser detectado en un



grado alto en las células epiteliales y linfocitos del mismo; y, por otro lado, con la respuesta inflamatoria desencadenada en el hospedador.

12. A nivel pulmonar se observó una alta presencia viral en los cerdos inoculados con el subtipo H3N2. Sin embargo, las lesiones histopatológicas encontradas fueron menos graves que las descritas para los subtipos H1N2 y H1N1 respectivamente y de carácter reversible (ausencia de fibrosis intralveolar).
13. El subtipo H1N2 provocó lesiones respiratorias importantes en pulmón caudal desde el primer día de infección, hallazgo que pone de manifiesto la potencial virulencia del subtipo.
14. La presencia viral en nódulos linfáticos y tonsila, junto con las alteraciones histológicas observadas (depleción linfoide e histiocitosis sinusal), ponen de manifiesto, una vez más, el importante y equilibrado papel que juega la respuesta inmune en el desarrollo de lesión y la necesidad de estudiarla en profundidad.
15. Estas diferencias en la severidad del cuadro clínico y de las lesiones, podrían deberse a una diferente respuesta inflamatoria del hospedador como se ha puesto de manifiesto en la gripe humana.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abusugra IA, Linné T, Klingeborn B. The provenance of the Swedish swine influenza H1N1 virus of 1983. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1987 Oct;34(8):566-72
2. Adiego Sancho; B, Omeñaca Terés, M., Martínez Cuenca, S., Rodrigo Val1., P, Sánchez Villanueva, P., Casas, I., Pozo, F., Pérez Breña, P. Human case of swine Influenza A (H1N1), Aragón, Spain, November 2008. *Eurosurveillance*. 2009; Vol . 14 · Issue 7.
3. Barigazzi G., Donatelli, I. Swine Influenza in Italy. *Vet. Res. Communicat*. 2003; 27 (Suppl 1): 93-99.
4. Brown IH, Manvell RJ, Alexander DJ, Chakraverty P, Hinshaw VS, Webster RG. Swine influenza outbreaks in England due to a new H1N1 virus. *Vet Rec*. 1993 May 1;132(18):461-2
5. Brown I.H. 2004. Los Virus A de la Influenza en los cerdos de Europa. En: *Enfermedades Víricas Emergentes del Cerdo* (edición española). Morilla A, Yoon KJ y Zimmerman J.J. (eds). Gráfica IN-Multiméica S.A., Barcelona (España), pags. 37-46.
6. Brown IH, Done SH, Spencer YI, Cooley WA, Harris PA, Alexander DJ. Pathogenicity of a swine influenza H1N1 virus antigenically distinguishable from classical and European strains. *Vet Rec*. 1993 Jun 12; 132 (24): 598-602
7. Brown, I.H., Chakraverty, P., Harris, P.A., Alexander, D.J. Disease outbreaks in pigs in Great Britain due to an Influenza A virus of H1N2 subtype. *Vet Rec* 1995; 136: 328-9
8. Brown, I. H., Harris, P. A., McCauley, J. W. Alexander, D.J. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. *Journal of General Virology*. 1998; 79: 2947-2955.
9. Brown, I.H. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinary Microbiology*. 2000;74: 29-46.

10. Campitelli, L., Donatelli, I., Foni, E., Castrucci, M.R., Fabiani, C., Kawaoka, Y., Krauss, S., Webster, R.G. Continued Evolution of H1N1 and H3N2 Influenza Viruses in pigs in Italy. *Virology*. 1997; 232: 310-318.
11. Castrucci, M., Donatelli, I., Sidoli, L., Barigazzi, G., Kawaoka, Y., Webster, R. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in italian pigs. *Virology*. 1993; 193: 503-506.
12. Chambers TM, Hinshaw VS, Kawaoka Y, Easterday BC, Webster RG. Influenza viral infection of swine in the United States 1988-1989. *Arch Virol*. 1991; 116 (1-4): 261-5.
13. Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickl, J., Palese, P., Henklein, P., Bennis, J.R., Yewdell, J.W. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature Medicine*. 2001; 7(12): 1306•1312.
14. Choi, Y.K., Goyal, S.M., Joo, H.S. Phylogenetic analysis of H1N2 isolates of Influenza A virus from pigs in the United States. *Virus Research*. 2002; 87: 173-179.
15. Choi, Y.K., Lee, J.H., Erickson, G., Goyal, S.M., Joo, H.S., Webster, R.G., Webby, R.J. H3N2 Influenza Virus Transmission from Swine to Turkeys, United States. *Emerging Infectious Diseases*. 2004; 10 (12): 2156-2160.
16. Choi, Y.K., Nguyen, T.D., Ozaki, H., Webby, R.J., Puthavathana, P., Buranathal, C., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Hanh, N.T. Ma, S.K., Hui, P.Y., Guan, Y., Peiris, J.S., Webster, R.G. Studies of H5N1 Influenza Virus Infection of Pigs by Using Viruses Isolated in Vietnam and Thailand in 2004. *Journal of Virology*. 2005; 79 (16): 10821-10825.
17. Coleman, J.R. The PB1-F2 protein of Influenza A virus: increasing pathogenicity by disrupting alveolar macrophages. *Virology Journal*. 2007; 4:9.
18. Dea S., Bilodeau R., Sauvageau R., Montpetit C., Martineau G.P. Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest*. 1992; 4:380-392.
19. De Jong, J.C., van Nieuwstadt, A.P., Kimman, T.G., Loeffen, W.L. Bestebroer, T.M., Bijlsma, K. Verweij, C., Osterhaus, A.D., Claas, E.C. Antigenic drift in swine influenza H3 haemagglutinins with implications for vaccination policy. *Vaccine*. 1999; 17: 1321-1328.
20. De Jong, J.C., Heinen, P.P., Loeffen, W.L., van Nieuwstadt, A.P., Claas, E.C.J., Bestebroer, T.M., Bijlsma, K., Verweij, C., Osterhaus, A.D., Rimmelzwaan, G.F., Fouchier, R.A.M., Kimman, T.G. Antigenic and molecular heterogeneity in recent swine influenza A (H1N1) virus isolates with possible implications for vaccination policy. *Vaccine*. 2001; 19: 4452-4464.
21. Drolet, R., Larochelle, R., Morin, M., Delisle, D., Magar, R. Detection Rates of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, Porcine Circovirus Type 2, and Swine Influenza Virus in Porcine Proliferative and Necrotizing Pneumonia. *Vet. Pathol*. 2003; 40: 143-148.
22. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, Sessions WM, Xu X, Skepner E, Deyde V, Okomo-Adhiambo M, Gubareva L, Barnes J, Smith CB, Emery SL, Hillman MJ, Rivailler P, Smagala J, de Graaf M, Burke DF, Fouchier RA, Pappas C, Alpuche-Aranda CM, López-Gatell H, Olivera H, López I, Myers CA, Faix D, Blair PJ, Yu C, Keene KM, Dotson PD Jr, Boxrud D, Sambol AR, Abid SH, St George K, Bannerman T, Moore AL, Stringer DJ, Blevins P, Demmler-Harrison GJ, Ginsberg M, Kriner P, Waterman S, Smole S, Guevara HF, Belongia EA, Clark PA, Beatrice ST, Donis R, Katz J, Finelli L, Bridges CB, Shaw M, Jernigan DB, Uyeki TM, Smith DJ, Klimov AI, Cox NJ. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 2009 Jul 10;325(5937):197-201.
23. García-Sastre, A. Inhibition of Interferon-Mediated Antiviral Responses by Influenza A Viruses and Other Negative-Strand RNA Viruses. *Virology*. 2001; 269: 375-384.
24. Gaydos, J.C., Top, Jr, F.H., Hodder, R.A., Russell, P.K. Swine Influenza A Outbreak, Fort Dix, New Jersey, 1976. *Emerging Infectious Diseases*. 2006; 12(1): 23-28.
25. Gorman OT, Bean WJ, Kawaoka Y, Donatelli I, Guo YJ, Webster RG. Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. *J Virol*. 1991 Jul;65(7): 3704-14

26. Gourreau, J.M., Kaiser, C., Valette, M., Douglas, A.R., Labie, J., Aymard, M. Isolation of two H1N2 Influenza viruses from swine in France. *Archives of Virology*.1994; 135: 365-382.
27. Grau-Roma, Llorenç, Segalés, J. Detection of porcine reproductive and respiratory síndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's syndrome in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Vet. Microbiology*. 2007; 119 (2-4): 144-151
28. Gray GC, McCarthy T, Capuano AW, Setterquist SF, Olsen CW, Alavanja MC. Swine workers and swine influenza virus infections. *Emerg Infect Dis*. 2007 Dec; 13 (12): 1871-8
29. Gregory, V., Bennett, M., Thomas, Y., Kaiser, J.L., Matter, W.H., Hay, A., Lin, Y. P. Human infection by a swine influenza A (H1N1) virus in Switzerland. *Arch Virology*. 2003; 148: 793-802.
30. Hinshaw VS, Bean WJ Jr, Webster RG, Easterday BC. The prevalence of influenza viruses in swine and the antigenic and genetic relatedness of influenza viruses from man and swine. *Virology*. 1978 Jan; 84 (1): 51-62.
31. Haesebrouck F, Biron P, Pensaert MB, Leunen J. Epizootics of respiratory tract disease in swine in Belgium due to H3N2 influenza virus and experimental reproduction of disease. *Am J Vet Res*. 1985 Sep; 46 (9): 1926-8.
32. Haesebrouck F, Pensaert MB. Effect of intratracheal challenge of fattening pigs previously immunised with an inactivated influenza H1N1 vaccine. *Vet Microbiol*. 1986 Mar;11(3):239-49
33. Heinen PP, van Nieuwstadt AP, Pol JM, de Boer-Luijtz EA, van Oirschot JT, Bianchi AT. Systemic and mucosal isotype-specific antibody responses in pigs to experimental influenza virus infection. *Viral Immunol*. 2000;13(2):237-8
34. Heinen, P.P., de Boer-Luijtz E.A., Bianchi, A.T.J. Respiratory and systemic humoral and cellular immune responses of pigs to a heterosubtypic Influenza A virus infection. *Journal of General Virology*. 2001; 82: 2697-2707.
35. Heinen, P.P., Van Nieuwstadt, A.P., De Boer-Luijtz, E.A., Bianchi, A.T. Analysis of the quality of protection induced by a porcine influenza A vaccine to challenge with an H3N2 virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 82: 39-56
36. Ito, T., Nelson, J., Couceiro, S.S., Kelm, S., Baum, L.G., Krauss, S., Castrucci, M.R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J.C., Webster, R.G., Kawaoka, Y. Molecular Basis for the Generation in Pigs of Influenza A Viruses with Pandemic Potential. *Journal of Virology*. 1998; 72 (9): 7367-7373.
37. Ito, T., Kawaoka, Y. Host range barrier of influenza A viruses. *Veterinary Microb*. 2000; 74: 71-75.
38. Jewell N.A., Vaghefi N., Mertz S.E., Akter P., Stokes Peebles Jr. R., Bakaletz L.O., Durbin R.K., Flaño E., and Durbin J.E. Differential Type I Interferon Induction by Respiratory Syncytial Virus and Influenza A Virus In Vivo *J Virol*. 2007 Sep; 81 (18): 9790-800.
39. Joo H. M., He Y., and Sangster M. Y. Broad dispersion and lung localization of virus-specific memory B cells induced by influenza pneumonia. *PNAS*. 2008; 105(9): 3485-3490
40. Jung, K., Ha, Y., Chae, C. Pathogenesis of swine Influenza virus subtype H1N2 infections in pigs. *J. Comp. Path*. 2005; 132: 179-184.
41. Jung, T., Choi, C. Chae, C. Localization of Swine Influenza Virus in Naturally Infected Pigs. *Vet. Pathology*. 2002; 39: 10-16.
42. Kanegae Y, Sugita S, Shortridge KF, Yoshioka Y, Nerome K. Origin and evolutionary pathways of the H1 hemagglutinin gene of avian, swine and human influenza viruses: cocirculation of two distinct lineages of swine virus. *Arch Virol*. 1994; 13 4(1-2): 17-28
43. Karasin, A., Landgraf, J., Swenson, S., Erickson, G., Goyal, S., Woodruff, M., Scherba, G., Anderson, G., Olsen C. W. Genetic characterization of H1N2 Influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40 (3): 1073-1079.
44. Karasin, A.I., Brown, I.H., Carman, S., Olsen, C.W. Isolation and Characterization of H4N6 Avian Influenza Viruses from Pigs with Pneumonia in Canada. *Journal of Virology*. 2000; 74(19): 9322-9327.

45. Karasin, A.I., Schutten, M.M., Cooper, L.A., Smith, C.B., Subbarao, K., Anderson, G.A., Carman, S., Olsen, C. W. Genetic characterization of H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977-1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. *Virus Res.* 2000; 68: 71-85.
46. Kendal A.P., Goldfield M., Noble G.R., y col.. Identification and pulmonary antigenic analysis of swine Influenza-like viruses isolated during an Influenza outbreak at Fort Dix, New Jersey. *J. Infectious Diseases.* 1977; 136:S381-S385.
47. Kendall P. Myers, Christopher W. Olsen, Sharon F. Setterquist, Ana W. Capuano, Kelley J. Donham, Eileen L. Thacker, James A. Merchant and Gregory C. Gray. Are Swine Workers in the United States at Increased Risk of Infection with Zoonotic Influenza Virus? *Clin. Infect. Dis.* 2006; 42(1): 14-20.
48. Kida H, Ito T, Yasuda J, Shimizu Y, Itakura C, Shortridge KF, Kawaoka Y, Webster RG. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J Gen Virol.* 1994 Sep; 75 ( Pt 9): 2183-8
49. Kreijtz, J.H.C.M., Bodewes, R., Van Amerongen, G., Kuiken, T., Fouchier, R.A.M., Osterhaus, A.D., Rimmelzwaan, G.F. Primary influenza A virus infection induces cross-protective immunity against a lethal infection with a heterosubtypic virus strain in mice. *Vaccine.* 2007; 25:612-620.
50. Kundin WD. Hong Kong A-2 influenza virus infection among swine during a human epidemic in Taiwan. *Nature.* 1970 Nov 28;228(5274):857
51. Landolt, G.A., Karasin, A., Phillips, L., Olsen C.W. Comparison of the Pathogenesis of Two Genetically Different H3N2 Influenza A Viruses in Pigs. *J. of Clin. Microb.* 2003; 41 (5): 1936-1941.
52. Lani L. Vincent, Bruce H. Janke, Prem S. Paul, Patrick G. Halbur. A monoclonal-antibody-based immunohistochemical method for the detection of swine influenza virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1997; 9:191-195.
53. Lanza I, Brown IH, Paton DJ. Pathogenicity of concurrent infection of pigs with porcine respiratory coronavirus and swine influenza virus. *Res Vet Sci.* 1992 Nov; 53 (3): 309-14
54. Larsen, D.L., Karasin, A.I., Zuckermann, F., Olsen, C.W. Systemic and mucosal responses to H1N1 influenza virus infection in pigs. *Veterinary Microbiology.* 2000; 74: 117-131.
55. Li HY, Yu KZ, Yang HL, Xin XG, Chen JY, y col.. Isolation and characterization of H5N1 and H9N2 influenza viruses from pigs in China. *Chin J Prev Vet Med.* 2004; 26: 1-6.
56. Maldonado, J., Van Reeth, K., Riera, P., Sitjà M., Saubi, N., Espuña, E. Artigas, E. Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 influenza A viruses in densely populated pig areas in Spain. *Veterinary Journal.* 2006; 172 (2): 377-381.
57. Marozin, S., Gregory, V., Cameron, K., Bennett, M., Valette, M., Aymard, M., Foni, E., Barigazzi, G., Lin, Y., Hay, A. Antigenic and genetic diversity among swine Influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. *Journal of General Virology.* 2002; 83: 735-745.
58. Matrosovich, M.N., Matrosovich, T.Y., Gray, T., Roberts, N.A., Klenk, H.D. Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. *Journal of Virology.* 2004; 78 (22): 12665-12667.
59. Matrosovich, M.N., Matrosovich, T.Y., Gray, T., Roberts, N.A., Klenk, H.D. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *PNAS.* 2004; 101: 4620-4624.
60. Matrosovich, Tuzikov, A., Bovin, N., Gambaryan, A., Klimov, A., Castrucci, M.R., Donatelli, I. Kawaoka, Y. Early Alterations of the Receptor-Binding Properties of H1, H2, and H3 Avian Influenza Virus Hemagglutinins after Their Introduction into Mammals. *J. of Virology.* 2000; 74 (18): 8502-8512.
61. Nardelli L, Pascucci S, Gualandi GL, Loda P. Outbreaks of classical swine influenza in Italy in 1976. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1978 Dec; 25 (10): 853-7.

62. O'Neill, R.E., Talon J., Palese, P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteínas. *The EMBO Journal*. 1998; 17 (288-296).
63. Olsen C.W., Brown I.A., Easterday B.C., and Van Reeth K. 1999. Swine Influenza. In: *Diseases of swine* (8th edition). Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ (eds). Iowa State University Press, Ames, pp 277-290.
64. Olsen CW, Carey S, Hinshaw L, Karasin AI. Virologic and serologic surveillance for human, swine and avian influenza virus infections among pigs in the north-central United States. *Arch Virol*. 2000; 145 (7): 1399-419.
65. Olsen, C.W. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. *Virus Res*. 2002; 85: 199-210.
66. Olsen, C.W., Karasin, A., Erickson, G. Characterization of a swine-like reassortant H1N2 influenza virus isolated from a wild duck in the United States. *Virus Research*. 2003; 93: 115-121.
67. Olsen C.W. 2004. Aparición de Nuevas Cepas de Virus de la Influenza Porcina en Norteamérica. En: *Enfermedades Víricas Emergentes del Cerdo* (edición española). Morilla A, Yoon KJ y Zimmerman J.J. (eds). Gráfica IN-Multimédica S.A., Barcelona (España), pags. 47-54.
68. Ottis K, Sidoli L, Bachmann PA, Webster RG, Kaplan MM. Human influenza A viruses in pigs: isolation of a H3N2 strain antigenically related to A/England/42/72 and evidence for continuous circulation of human viruses in the pig population. *Arch Virol*. 1982; 73 (2): 103-8
69. Parvin JD, Moscona A, Pan WT, Leider JM, Palese P. Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1. *J Virol*. 1986 Aug; 59 (2): 377-83
70. Reid AH, Fanning TG, Hultin JV, Taubenberger JK. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Feb 16; 96 (4): 1651-6.
71. Reid AH, Fanning TG, Janczewski TA, Taubenberger JK. Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus neuraminidase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 6; 97 (12): 6785-90.
72. Richt JA, Lager KM, Janke BH, Woods RD, Webster RG, Webby RJ. Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine influenza viruses cocirculating in the United States. *J Clin Microbiol*. 2003 Jul; 41 (7): 3198-205.
73. Rimmelzwaan, G.F., De Jong, J.C., Bestebroer, T.M., Van Loon, A.M., Claas, E.C.J., Fouchier, R.A.M., Osterhaus, A.D.M.E. Antigenic and genetic characterization of Swine Influenza A (H1N1) Viruses isolated from pneumonia patients in the Netherlands. *Virology* 2001; 282: 301-306.
74. Sabrina L. Swenson, Lani L. Vincent, Brandi M. Lute, Bruce H. Janke, Kelly F. Lechtenberg, John G. Landgraf, Beverly J. Schmitt, David R. Kinker, Janis K. McMillen. A comparison of diagnostic assays for the detection of type A swine influenza virus from nasal swabs and lungs. *J. Vet. Diagn. Invest*. 2001; 13:36-42.
75. Salvatore M, y col.: Effects of influenza A virus NS1 protein on protein expression: the NS1 protein enhances translation and is not required for shutoff of host protein synthesis. *J Virol* 2002, 76 (3): 1206-12
76. Seo S.H., Webby R., Webster R.G. No apoptotic deaths and different levels of inductions of inflammatory cytokines in alveolar macrophages infected with influenza viruses. *Virology* 2004; 329: 270-279.
77. Schrader, C., Süß, J. Molecular Epidemiology of porcine H3N2 influenza A viruses isolated in Germany between 1982 and 2001. *Intervirology*. 2004; 47: 72-77.
78. Shope RE. The etiology of Swine Influenza. *Science*. 1931 Feb 20; 73 (1886): 214-215
79. Shope RE. The epidemiology of the origin and perpetuation of a new disease. *Perspect Biol Med*. 1964; 7: 263-78
80. Smith,G.J., Vijaykrishna,D., Bahl, J., Lycett, S.J., Worobey, M., Pybus, O.G., Ma, S.K., Cheung, Ch. L., Raghvani, J., Bhatt, S., Peiris J.S.M., Guan,Y., and Rambaut, A. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*; 2009 Jun25;459 (7250):1122-5.



81. Suzuki, Y., Ito, T., Suzuki, T., Holland, R.E., Chambers, T.M., Kiso, M., Ishida, H., Kawaoka, Y. Sialic acid species as a determinant of the host range of Influenza A viruses. *Journal of Virology*. 2000; 74 (24): 11825-11831.
82. Sylte, M.J., Hubby, B., Suárez, D.L. Influenza neuraminidase antibodies provide partial protection for chickens against high pathogenic avian influenza infection. *Vaccine*. 2007; 25 (19): 3763-3772. 268
83. Taubenberger JK, Reid AH, Krafft AE, Bijwaard KE, Fanning TG. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science*. 1997 Mar 21;275(5307):1793-6.
84. Taubenberger JK, Reid AH, Fanning TG. The 1918 influenza virus: A killer comes into view. *Virology*. 2000 Sep 1;274(2):241-5. Review.
85. Thomas, P.G., Keating, R., Hulse-Post, D.J. and Doherty, P.C. Cell-mediated Protection in Influenza Infection. *Emerging Infectious Diseases*. 2006; 12 (1): 48-54.
86. Tu J, Zhou H, Jiang T, Li C, Zhang A, Guo X, Zou W, Chen H, Jin M. Isolation and molecular characterization of equine H3N8 influenza viruses from pigs in China. *Arch Virol*. 2009; 154:887-890.
87. Tumová B, Mensík J, Stumpa A, Fedová D, Pospíšil Z. Serological evidence and isolation of a virus closely related to the human A/Hong Kong/68 (H3N2) strain in swine populations in Czechoslovakia in 1969-1972. *Zentralbl Veterinarmed B*. 1976
88. Urman Hk, Underdahl Nr, Young Ga. Comparative histopathology of experimental swine influenza and virus pneumonia of pigs in disease-free, antibody-devoid pigs. *Am J Vet Res*. 1958 Oct; 19 (73): 913-7.
89. Van Reeth, K., Labarque, G., Nauwynck, H., Pensaert, M. Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Research in Veterinary Science*. 1999; 67 (1): 47-52.
90. Van Reeth, K. Citokynes in the pathogenesis of Influenza. *Veterinary Microbiology*. 2000; 74:109-116.
91. Van Reeth, K., Van Gucht, S., Pensaert, M. Correlations between Lung Proinflammatory Cytokine Levels, Virus Replication, and Disease after Swine Influenza Virus Challenge of Vaccination-Immune Pigs. *Viral Immunology*. 2002; 15 (4): 583-594.
92. Van Reeth, K., Gregory, V., Hay, A., Pensaert, M. Protection against a European H1N2 swine influenza virus in pigs previously infected with H1N1 and/or H3N2 subtypes. *Vaccine*. 2003; 21:1375-1381.
93. Van Reeth, K., Van Gucht, S., Pensaert, M. Investigations of the efficacy of European H1N1-and H3N2-based swine influenza vaccines against the novel H1N2 subtype. *Vet. Record*. 2003; 153: 9-13.
94. Van Reeth, K., Brown, I., Essen, S., Pensaert, M. Genetic relationships, serological cross-reaction and cross-protection between H1N2 and other influenza A virus subtypes endemic in European pigs. *Virus Research*. 2004; 103: 115-124.
95. Van Reeth, K., Labarque, G., Pensaert, M. Serological Profiles after Consecutive Experimental Infections of Pigs with European H1N1, H3N2, and H1N2 Swine Influenza Viruses. *Viral Immunol*. 2006; 19,3:373-382
96. Van Reeth K. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Vet. Res*. 2007; 38: 243-260.
97. Webby, R.J., Rossow, K., Erickson, G., Sims, Y., Webster, R. Multiple lineages of antigenically and genetically diverse influenza A virus co-circulate in the United States swine population. *Virus Research*. 2004; 103:67-73
98. Vincent AL, Lager KM, Ma W, Lekcharoensuk P, Gramer MR, Loiacono C, Richt JA. Evaluation of hemagglutinin subtype 1 swine influenza viruses from the United States. *Vet Microbiol*. 2006 Dec 20; 118 (3-4): 212-22

99. Yoon KJ. y Janke B.H. 2004. Influenza Porcina: etiología, epidemiología y diagnóstico. En: *Enfermedades Víricas Emergentes del Cerdo* (edición española). Morilla A, Yoon KJ y Zimmerman J.J. (eds). Gráfica IN-Multimédica S.A., Barcelona (España), pags. 29-36.
100. Zamarin D., García-Sastre, A., Xiao, X., Wang, R., Palese, P. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* 2005, 1(1):e4.
101. Zhou, N., Senne, D.A., Landgraf, J.S., Swenson, S.L., Erickson, G., Rossow, K., Liu, L., Yoon, K.J., Krauss, S., Webster, R.G. Genetic reassortment of avian, swine, and human Influenza A viruses in american pigs. *Journal of Virology*. 1999; 73 (10): 8851-8856.
102. WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. WHO (World Health Organization) Global Influenza Programme. 103. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE (World Organization for Animal Health) Chapter 2.8.8. Swine Influenza



# OLOR SEXUAL EN LA CARNE DE PORCINO CASTRADO INMUNOLÓGICAMENTE. NECESIDAD DE SU EVALUACIÓN SENSORIAL LIGADA A LOS FACTORES GENÉTICOS QUE DETERMINAN SU PERCEPCIÓN

GASPAR ROS BERRUEZO<sup>1</sup>

La *castración física* de los lechones para eliminar el olor sexual se ha convertido en un procedimiento estándar en la industria porcina a nivel mundial. Los factores que influyen en la realización de la *castración física* varían entre mercados. En Europa, el interés creciente en lo concerniente al modo en que se crían los animales ha potenciado los aspectos relacionados con el **bienestar animal** asociados a esta forma de castración y, consecuentemente, ha incrementado la presión de los legisladores para introducir controles.

## ACCIONES DE PRESIÓN PARA SUPRIMIR LA CASTRACIÓN FÍSICA

En contra de las motivaciones de marketing está la presión referente a **bienestar animal** experimentada en algunos mercados. La presión respecto al **bienestar animal** ha existido durante algún tiempo en Reino Unido y Escandinavia, y se está incrementando en Dinamarca, Holanda y Alemania, e incluso está siendo más prominente en países del sur de Europa como España: “pudiera haber presión de los diversos organismos responsables del **bienestar animal** en todos los países europeos para estandarizar prácticas bajo la legislación de la Unión Europea y cesar la *castración física*”. No existe duda de que la *castración física* induce dolor y angustia a los lechones. Estudios científicos creíbles han medido este hecho de diversas maneras, como cambios en la tasa cardíaca, actividad cerebral, y liberación de hormonas relacionadas

---

<sup>1</sup> Catedrático de Nutrición y Bromatología, Universidad de Murcia  
Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Veterinaria de Andalucía Oriental  
gros@um.es

con el estrés. Los procedimientos físicos están también asociados con un nivel, aunque bajo, de pérdidas relacionadas con inflamación crónica e infección.

## PRESIÓN A TODOS LOS NIVELES

Mientras que la dedicación del consumidor medio para mejorar el **bienestar animal** puede no ser excesivamente robusta, la presión desde organizaciones influyentes y grupos de presión es considerable. La Federación de Veterinarios Europeos (FVE), por ejemplo, ha publicado un informe que constata que el uso de la *castración física* necesita ser reevaluado debido a las implicaciones que tiene en el bienestar animal, y que es necesaria la búsqueda de alternativas prácticas y éticas para el control del olor sexual.

La Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (en inglés, EFSA) -una agencia de la Comisión Europea con responsabilidad en la valoración de los aditivos en pienso en la UE- ha emergido también como un organismo en contra de la *castración física*. De hecho, en la actualidad está buscando una posible supresión de la castración de lechones que se lleve a cabo sin intervención veterinaria o anestesia.

No existe duda de que el juicio del **bienestar animal** es altamente subjetivo y depende mucho de los códigos nacionales e individuales de moralidad. Las actitudes y la legislación varían ampliamente en todo el mundo e incluso dentro de Europa. En un extremo está el Reino Unido, donde la *castración física* no está permitida en granjas que son miembros de determinadas asociaciones como la de los Cerdos Británicos Asegurados-Esquemas Asegurados de Calidad. Sobre el 80% de los productores son miembros y por ello, la mayoría de los cerdos machos se venden enteros, incluso aunque la *castración física* sea legal.

## POSIBLES ALTERNATIVAS

Las posibles alternativas podrían incluir:

- el uso de semen sexado para producir toda una descendencia de hembras,
- manipulación de la dieta,
- menores pesos al sacrificio,
- selección genética para machos de bajo olor sexual y
- *la castración inmunológica.*

“El semen sexado ha mostrado ser prometedor, pero esta alternativa ha estado presente desde hace ya una década o más. Por ello pudiera no llegar a ser una realidad comercial dentro de la próxima década”.

Señala que la reducción de la presencia de sustancias involucradas en el olor sexual en la carne por manipulación de la dieta ha parecido, ocasionalmente, prometedora. En particular la manipulación de la fermentación en el intestino grueso puede ofrecer un modo potencial de reducir los niveles de **escatol**. Sin embargo, existe poca posibilidad de reducir la **androstenona** de esta manera.

En la actualidad, esta siendo investigada la selección genética frente a los componentes de olor sexual, pero esto pudiera significar la eliminación de características que son ligadas al andrógeno, como la eficiencia y el magro, que son beneficiosas en la producción porcina.

La alternativa a la *castración física* que, de acuerdo con es más prometedora es la castración inmunológica, que utiliza el propio sistema inmune del animal para inhibir la función normal de los testículos. La castración inmunológica ofrece un potencial enorme ya que permite el crecimiento de machos enteros hasta el estado final de crecimiento y todo ello sin riesgo de olor sexual. Beneficios adicionales son la mejora de la ingesta de pienso y crecimiento, la reducción de luchas entre animales y de su actividad sexual, y el incremento en la grasa intramuscular.

## VACUNAS PARA LA CASTRACIÓN INMUNOLÓGICA

Para la castración inmunológica existen vacunas que permite la castración de los cerdos machos a través de la creación de anticuerpos contra la GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) a través del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal. No obstante, además de conseguir los efectos deseados y acorde con la castración quirúrgica, sus ventajas no son el ahorro el tiempo de castración de lechones y las pérdidas por este manejo, con importantes **mejoras en los resultados productivos**.

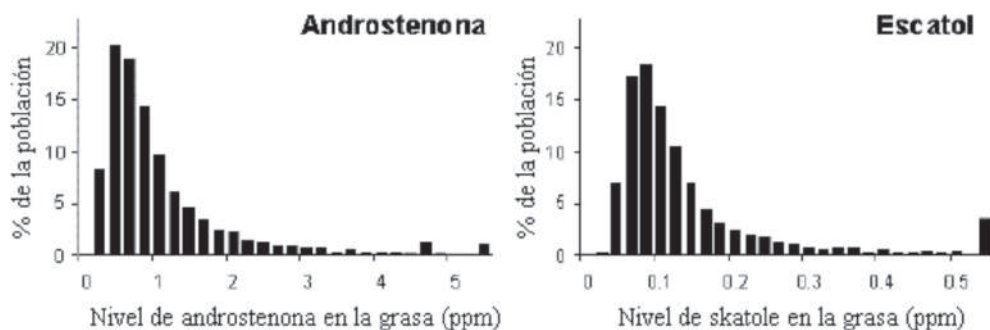
## EL ANÁLISIS SENSORIAL APLICADO A LA EVALUACIÓN DE LOS CARACTERES SEXUALES DE LA CARNE

### Concentraciones de androstenona y escatol.

La concentración de estos compuestos en la grasa son muy variables entre animales. En estudios realizados en 4293 **machos enteros** criados en 6 países europeos

se puede apreciar que los niveles de *androstenona* van entre 0 y 5,5 ppm aproximadamente, siendo la mayoría (74%) con valores entre 0,2 y 2,0 ppm (Walstra et al., 1999). En hembras (225) la concentración en grasa presenta valores inferiores a 0,2 ppm y (el 98% inferior a 0,1 ppm).

Los niveles de *escatol* fluctúan entre 0 y 0,55 ppm, alcanzando un 69% de la población niveles entre 0,05 y 0,2 ppm. El 100% de las hembras analizadas en el mismo estudio presentaron menos de 0,2 ppm, la mayoría (85%) menos de 0,01 ppm y 36% menos de 0,05 ppm (BONNEAU y SQUIRES, 2000).



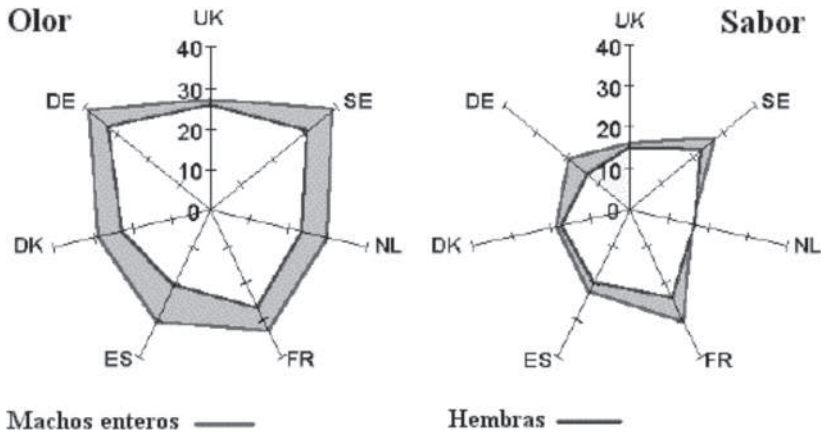
Distribución de los niveles de androstenona y escatol en 4293 cerdos no castrados, criados en 6 países europeos. Adaptado de Walstra et al. (1999), citado BONNEAU y SQUIRES (2000).

### Respuesta de los consumidores a la carne de machos enteros.

Por la gran variabilidad en los hábitos alimentarios de los consumidores, la aceptabilidad de la carne de machos enteros puede variar mucho entre estudios (DIJKSTERHUIS et al. 2000).

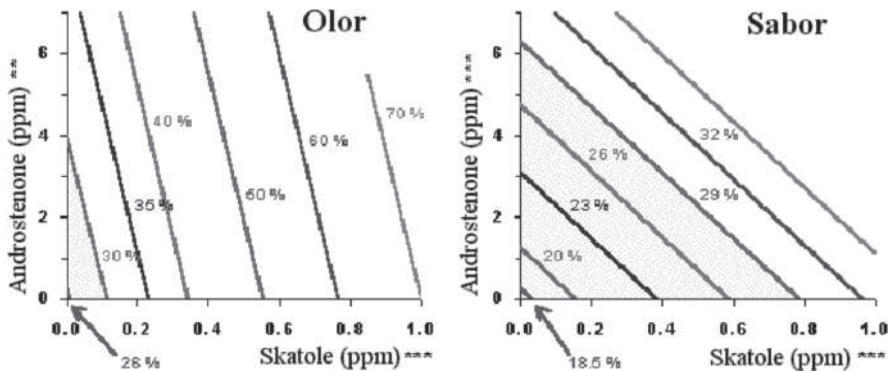
Los resultados de un estudio internacional sobre la aceptabilidad de los consumidores (Bonneau et al., 2000) muestran que en general que :

- la insatisfacción es mayor a la carne de machos enteros que de las hembras basados en el **olor** (6,5% de los consumidores) y en segundo lugar en el **sabor** (3%).
- La menor diferencia entre carne de machos enteros y hembras se encontró en el Reino Unido tanto en el olor como el sabor, este ultimo (el sabor) compartido con Dinamarca y Holanda).



Proporción de consumidores insatisfechos con el olor y sabor de carne de machos enteros en comparación a la de hembras. UK: Reino Unido; SE: Suecia, NL: Holanda; FR: Francia; ES: España; DK: Dinamarca; DE: Alemania. La superficie amarilla representa la diferencia entre la carne de macho entero y de hembra.

En cuanto a la **contribución de la andostenoma y el escatol a los problemas de olor sexual** señalar que el escatol contribuye más que la andostenona a los problemas de olor sexual de machos enteros (mayor proporción de consumidores insatisfechos). En cuanto al sabor, estos tuvieron respuesta similares y aditivas.



Curvas de isorespuesta para porcentaje de consumidores insatisfechos con el olor (26-70%) y sabor (18,5-35%) según los niveles de escatol y androstenona en carne de machos enteros.

\*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001. Adaptado de Matthews et al. (2000), citado por BONNEAU y SQUIRES (2000). MATTHEWS et al. (2001)

Dentro del **olor sexual**, el escatol es responsable principal ya que es percibido por el 99% de los consumidores, frente a la **androstenona**, solo percibido por un grupo reducido de la población. Se ha sospechado durante mucho tiempo que la capacidad de percibir el olor de la androstenona es determinada genéticamente, lo que se ha identificado recientemente (Keller y col., 2007) y se ha asociado principalmente a variaciones genéticas para un **receptor olfatorio específico llamado OR7D4**. Este es un único gen que explica en gran parte por qué las personas perciben el olor de la androstenona de manera tan diferente. Los investigadores identificaron dos mutaciones, llamadas polimorfismos de un único nucleótido, a lo largo del gen, que daban lugar a dos variantes del receptor olfatorio: RT y WM, que difieren en dos aminoácidos. Dos mutaciones adicionales en algunos de los participantes influyeron sobre su sensibilidad a la androstenona.

El proyecto consiste en la realización de pruebas de evaluación sensorial en carne de cerdo castrado física frente al del cerdo castrado inmunológicamente y la cerda, mediante el análisis descriptivo cuantitativo para obtener perfiles sensoriales. Para ello, mediante la actuación de jueces entrenados o catadores se aprecian, identifican y miden características de una determinada propiedad sensorial del producto.

Para la realización de estos análisis se empleará un vocabulario que describe los atributos sensoriales específicos para el olor sexual diferenciando entre sus componentes. Además se relacionará con otros atributos para ver la interferencia del atributo general de olor (sabor) sexual sobre la calidad de la carne, basada en textura, (se emplean términos como cohesividad, dureza, gomosidad, adhesividad, masticabilidad, etc.), sabor (se emplean términos como astringente, metálico, especiado, rancio, etc...) la definición de la aparición, incluye la evaluación del color (intensidad y tono), brillo y opacidad, y el aroma, que está íntimamente relacionado con el sabor, y componen el flavor del alimento.

Es de gran importancia conocer la relación que existe entre estos factores con procesado tecnológico o culinario o condiciones de almacenamiento que modificaciones en el perfil sensorial a olor sexual de las carnes.

## BIBLIOGRAFIA

- Evaluación sensorial de los alimentos. M. Ureña, M. D'Arrigo. Edi-agraria.  
 La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. A. Anzaldúa. Ed. Acribia S.A.  
 Experimental Food Science. Penfield, Campbell. Academic Press.  
 Food Technology. Nov. 74, vol. 28 n° 11. Nov. 73, vol. 27 n° 11. nov. 93, vol. 47 n° 11.

Journal of Food Science, may-june 1987, vol. 52 n° 3.

BABOL, J., SQUIRES, E. y LUNDSTRÖM, K. 1999. Relationship between metabolism of androstene and skatole in intact male pigs. *Journal of Animal Science*. 77: 84–92.

BONNEAU, M. y SQUIRES, E. 2000. Use of entire males for pig production. In: I Conferência Virtual Internacional sobre Qualidade de Carne Suína. 16 de novembro a 16 de dezembro de 2000.

Keller, A., Hanyi Zhuang, H., Qiuyi Chi, Q., Vosshall L. & Hiroaki Matsunami H. Genetic variation in a human odorant receptor alters odour perception. *Nature* **449**, 468-472 (27 September 2007).





# EL TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A MUCOSAS COMO BLANCO DEL VIRUS DE LA DIARREA VÍRICA BOVINA: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

M. PEDRERA<sup>1\*</sup>, P.J. SÁNCHEZ CORDÓN<sup>1</sup>, M.A. RISALDE<sup>1</sup>, V. MOLINA<sup>1</sup>, E. RUIZ-VILLAMOR<sup>2</sup>, F. ROMERO-PALOMO<sup>1</sup>, J.C. GÓMEZ-VILLAMANDOS<sup>1</sup>

## RESUMEN

Las tonsilas, al igual que otros tejidos linfoides asociados a mucosas como las placas de Peyer del intestino delgado, debido a su localización, se presentan como la puerta de entrada de numerosos agentes patógenos, y por sus características estructurales e inmunológicas, protegen los tractos respiratorios y digestivos de los antígenos que son constantemente inhalados e ingeridos. En los bovinos, distintos agentes patógenos replican en las tonsilas en las primeras fases de la infección, destacando virus como el de la diarrea vírica bovina (vDVB). En rumiantes jóvenes, las placas de Peyer ileales son responsables de la generación de la mayoría de células B, habiéndose especulado con su posible papel como órgano linfoides primario ya que, al igual que ocurre con el timo, también involuciona a edades jóvenes. El tejido linfoides asociado a mucosas se presenta como el principal lugar de replicación del vDVB, siendo además la localización en la que se producen las lesiones más importantes en el transcurso de esta enfermedad, dando lugar a una intensa depleción linfoides que se traduce, a nivel sistémico, en una marcada leucopenia. Por este motivo y con el fin de profundizar en los mecanismos patogénicos del vDVB, es necesario estudiar y comprender en profundidad tanto la estructura como las funciones inmunológicas de estos tejidos linfoides.

---

<sup>1</sup> Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Edificio Sanidad Animal, Campus de Rabanales, 14014, Córdoba, España.

<sup>2</sup> Laboratorio Central de Veterinaria de Santa Fe, Camino del Jau s/n, 18320, Santa Fe, Granada, España

\* E-mail: v72pemam@uco.es

## INTRODUCCIÓN

El virus de la Diarrea vírica bovina (vDVB) (perteneciente a la familia *Flaviviridae* junto a otros pestivirus como el virus de la peste porcina clásica y el virus de la enfermedad de la frontera), es responsable de causar una amplia variedad de formas clínicas que causan cuantiosas pérdidas económicas en la cabaña bovina. Según su efecto sobre ciertos cultivos celulares, las cepas del vDVB se dividen en dos biotipos: no-citopáticas (NCP), que no causan efecto citopático y cepas citopáticas (CP), que inducen muerte celular por apoptosis en estos cultivos (1). Las cepas NCP son las que producen las formas más frecuentes de DVB, dando lugar a formas clínicas leves que pasan desapercibidas en la mayoría de las ocasiones, caracterizadas por un corto período febril y leucopenia transitoria. Sin embargo, en la mayoría de los órganos linfoides se produce una importante depleción linfoide causada por apoptosis, afectando de forma grave al tejido linfoide asociado a las mucosas, provocando así un estado de inmunosupresión a nivel local (2, 3, 4).

Dado que el tejido linfoides asociado a mucosas se presenta como el principal lugar de replicación del vDVB, así como la localización orgánica donde se producen las lesiones más importantes y las principales reacciones inmunológicas (con repercusiones sistémicas) en el transcurso de esta enfermedad, el conocimiento pormenorizado de las estructuras que componen éste tejido linfoide y sus funciones inmunológicas frente a agentes patógenos, se presenta como fundamental a la hora de profundizar en el conocimiento de los mecanismos patogénicos del vDVB y de la respuesta del sistema inmune local.

## TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A MUCOSAS

Las mucosas son un lugar importante de entrada de microorganismos, ya que constituyen una barrera entre el medio externo y el interno. **El tejido linfoide asociado a mucosas (TLAM)**, forma parte del sistema inmune aunque con cierta independencia del sistema sistémico. Está formado por agrupaciones de tejido linfoide que, según su localización, se denominan **tejido linfoide asociado a bronquios (TLAB)** y **tejido linfoide asociado a intestino (TLAI)**. El TLAB está formado por todo el tejido linfoide localizado en las mucosas respiratorias, desde las fosas nasales hasta los pulmones, incluyendo tonsilas, folículos linfoides y nódulos linfáticos. El TLAI está formado por todo el tejido linfoide que se encuentra en las paredes intestinales (placas de Peyer, folículos linfoides aislados) y los nódulos linfáticos de esta localización.

## 1. TONSILAS

Dentro del grupo de órganos linfoides secundarios relacionados con la inmunidad de las mucosas, y en concreto, formando parte del TLAB se encuentran integradas las **tonsilas** (5,6). Se localizan en la transición entre el tracto respiratorio y el digestivo, participando en los procesos de reconocimiento y excreción de organismos extraños (6). Existen evidencias de que las tonsilas en los rumiantes poseen estructuras y funciones similares a las de los humanos (7,8), estando localizadas estratégicamente en la entrada de la faringe, donde los microorganismos patógenos pueden ser captados por las células M e inducir una respuesta inmune (9). Se encuentran formando un anillo de tejido linfoides en la pared faríngea, denominado “anillo de Waldeyer” en honor al primer científico que lo describió (10). Las tonsilas son puerta de entrada de numerosos agentes bacterianos y protegen los tractos respiratorios y digestivos de los antígenos que son constantemente inhalados e ingeridos. Por su localización desempeñan un papel fundamental en la defensa inmunológica frente a estos agentes infecciosos, estando de forma continua expuesta a estímulos antigénicos que provocan una hiperplasia funcional del tejido linfoides, lo que provoca un aumento en el número de linfocitos B y una inflamación fisiológica (11), siendo lugares fundamentales de producción de IgA local y zonas inductoras de la inmunidad, y constituyendo una fuente de células inmunocompetentes para otras áreas de las vías respiratorias altas (9).

En bovino distintos agentes patógenos replican en las células epiteliales de la tonsila durante las primeras fases de la infección, destacando virus como el de la diarrea vírica bovina (vDVB), herpesvirus bovino tipo 1 o el virus sincitial respiratorio bovino, siendo también puerta de entrada de agentes bacterianos como *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovis* y *Haemophilus somnus* (12,13,14,15).

La superficie de la tonsila puede ser relativamente lisa (**tonsilas planas**) o puede poseer profundas invaginaciones, denominadas criptas tonsilares, permitiendo así una alta concentración de tejido linfoides en un área determinada (**tonsilas foliculares**) (16,17). La tonsila de los bovinos se localiza en la mucosa orofaríngea y nasofaríngea, siendo las tonsilas que se encuentran en el paladar blando de pequeño tamaño. Las tonsilas localizadas en la orofaringe se denominan **tonsilas palatinas y linguales**, mientras que las de la nasofaringe se denominan **tonsilas faríngeas y tubulares** (6), presentándose como agregados de nódulos linfáticos solitarios o como agrupaciones de nódulos y tejido linfoides difuso localizados en el tejido conectivo subyacente, parcialmente encapsuladas, que protegen la entrada de la orofaringe (18,19). Las **tonsilas palatinas** son de tipo folicular y se sitúan bilateralmente en el velo del paladar, mientras que la **tonsila faríngea** es única y sin criptas (20). La **tonsila lingual**

de los bovinos involucre con la edad (17) localizándose a nivel de la raíz de la lengua, caudalmente a las papilas valladas y rostralmente a la epiglotis, entre los arcos palatoglosos (21). Contiene varios nódulos linfoides tonsilares, tanto primarios como secundarios, que se encuentran organizados alrededor de criptas epiteliales o tonsilares, visibles macroscópicamente en la superficie lingual y que se disponen más o menos alineadas en dirección rostrolateral (6,22).

Durante las primeras semanas de vida, las tonsilas no están completamente desarrolladas y no se diferencian bien las áreas T de las áreas B dependientes, alcanzando su completo desarrollo en torno a los dos meses de vida, estando condicionada su maduración con la estimulación antigénica postnatal (9). Esto puede explicar, en parte, la alta incidencia de enfermedades infecciosas durante los primeros meses de vida.

### **1.1. Características estructurales y funcionales de la tonsila**

Dependiendo de su localización, la tonsila está revestida por un epitelio estratificado plano (escamoso) queratinizado (orofaringe) o pseudoestratificado cilíndrico ciliado (nasofaringe). Bajo este epitelio se dispone abundante tejido conectivo laxo, tejido adiposo, glándulas salivares y fibras de musculatura estriada. En el tejido conectivo subepitelial que constituye la lámina propia, están presentes grandes acumulaciones de tejido linfoide, organizados alrededor de criptas. Estos agregados linfoides están constituidos por nódulos linfoides primarios y secundarios, entre los que se dispone tejido linfoide difuso. Muchos de estos nódulos linfoides no aparecen asociados a criptas y se encuentran encapsulados por una delgada capa de tejido conectivo que los delimita del tejido adiposo y de las glándulas salivares (6,17).

#### *1.1.1. Epitelio*

El epitelio estratificado escamoso forma una estructura reticular singular en las criptas, constituyendo un epitelio reticular infiltrado por numerosos linfocitos, especializado en funciones de presentación de antígeno. El resto del epitelio apenas se infiltra por linfocitos y su función es la protección de la superficies mucosas (7), destacando la existencia de numerosos desmosomas en la superficie de las células epiteliales y bucles de tonofilamentos en su citoplasma (2,3,23).

Destaca además la presencia de células dendríticas (CD) o células de Langerhans entre las células epiteliales. Las CD son las células presentadoras de antígeno (CPA) más eficientes, formando una extensa red interdigitante en los tejidos linfoides que

facilita la captación de los antígenos y permite la interacción entre las células. Su localización estratégica en los lugares de entrada de los agentes patógenos, les permite ser una de las primeras células en tomar contacto con ellos. En estas localizaciones madurarán, y desde aquí migrarán a los tejidos linfoides para presentar estos antígenos procesados a los linfocitos T, promoviendo así una respuesta inmune efectiva (24). Presentan poca capacidad fagocítica (25), siendo capaces de expresar el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II en su superficie (26).

La naturaleza reticular del epitelio de las criptas no está predeterminada, sino que dicha característica es posterior a la infiltración de linfocitos, los cuales causan la separación de las células epiteliales y la aparición de conductos intraepiteliales (7). Los canales intraepiteliales están en contacto con los tejidos adyacentes a través de discontinuidades de la membrana basal. Estas discontinuidades o poros son muy numerosos y poseen un diámetro que varía de 0,5 a 20  $\mu\text{m}$ , a través de los cuales los macrófagos, linfocitos y otras células libres pueden migrar libremente hacia el tejido linfoide subyacente (8,27,28,29).

El epitelio tonsilar suele estar infiltrado en grado variable de linfocitos, leucocitos polimorfonucleares y macrófagos. Esta infiltración es particularmente marcada en las tonsilas de la orofaringe. La mayor parte de las células localizadas entre las células epiteliales son linfocitos, los cuales presentan núcleos grandes y eucromáticos rodeados por anillos de citoplasma con pocas organelas. Estos linfocitos son principalmente T, siendo escasa la presencia de linfocitos B. Destaca el alto número de linfocitos T  $\gamma\delta$  en esta localización, especialmente en los animales más jóvenes, que constituyen una primera línea de defensa contra los patógenos (9,11). Además, existe un moderado número de linfocitos T CD8+ y T CD4+, con predominio de los primeros. El elevado número de linfocitos T  $\gamma\delta$  y linfocitos T CD8+ en esta localización confiere una inmunidad celular temprana en las primeras semanas de vida hasta que las tonsilas alcancen su completa madurez inmunológica (9). El epitelio también se encuentra infiltrado de células NK y algunos leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (30,31). Asimismo, en las partes más profundas del epitelio se observan células plasmáticas, con un núcleo característico en el que la heterocromatina se dispone a modo de "rueda de carro", presentando numerosas cisternas de retículo endoplásmico rugoso. También se observan macrófagos de perfiles ampulosos, con núcleos irregulares o reniformes, abundante citoplasma con grandes mitocondrias, complejo de Golgi prominente, cisternas de retículo endoplásmico rugoso, centríolos, fagolisosomas y numerosas vesículas (32,33).

A los linfocitos y otros leucocitos que alcanzan la luz de las tonsilas se les denomina corpúsculos salivares. Cuando no son eliminados de las criptas por la secreción

de las glándulas salivares circundantes, estas células junto con microorganismos superficiales y las células epiteliales exfoliadas, pueden obstruir las criptas y originar una inflamación. Fuera de la cápsula de la tonsila existen numerosas glándulas pequeñas asociadas a la mucosa tonsilar, cuyos conductos se abren a la superficie, así como en las criptas, ayudando sus secreciones a lavar el detritus acumulado (5,34).

Asimismo, se han descrito células epiteliales especializadas con características ultraestructurales similares a la células M de la mucosa intestinal. Estas células presentan en su superficie apical unas microvellosidades gruesas y cortas junto a unos pocos desmosomas que las unen a las células escamosas. El núcleo de las células epiteliales especializadas se muestra redondeado, con cromatina difusa y un nucléolo prominente (7). Estas células son ricas en vacuolas citoplasmáticas, poseen escasos lisosomas y juegan un importante papel como células transportadoras de sustancias antigénicas a los linfocitos, mostrando una endocitosis activa transcelular (26), desempeñando además importantes funciones como células presentadoras de antígenos (9).

### 1.1.2. *Estroma*

El estroma de la tonsila, como el de cualquier otro órgano linforreticular, está constituido por tabiques de tejido conjuntivo que se localizan subyacentes al epitelio tonsilar. En el tejido conjuntivo se localizan además células plasmáticas rodeando a los folículos linfoides y una corona de pequeños linfocitos adyacentes al epitelio (35). La tonsila está separada del tejido adyacente por una cápsula de tejido conjuntivo denso (34).

Estos tabiques están formados por fibroblastos, fibras de colágeno y fibras elásticas. Las fibras de colágeno se continúan hacia el interior de los folículos linfoides y áreas linfoides difusas con una red de fibras reticulares, de 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, argirófilas, birrefringentes y compuestas por colágeno tipo III. En íntima asociación con estas fibras se encuentran las células reticulares, que sintetizan y constituyen, junto a las fibras reticulares, el armazón conjuntivo en el que se alojan las estructuras linfoides (36). Estas fibras están completamente rodeadas por los procesos citoplasmáticos de las células reticulares, por medio de los cuales establecen contactos unas con otras (37).

La morfología de las células reticulares varía de ovoide a estrellada, presentando un núcleo alargado e indentado y un espacio perinuclear dilatado que se continúa con un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado, numerosos polirribosomas libres, un complejo de Golgi muy evidente y numerosas mitocondrias (38). Además,



estas células se caracterizan por contener en su citoplasma gran cantidad de filamentos intermedios de unos 10 nm de diámetro, constituido de vimentina, así como bandas de filamentos finos de unos 5 nm similares a la actina localizados en la base de las prolongaciones (36).

### 1.1.3. Estructuras linfoides

Entre las estructuras linfoides de la tonsila podemos distinguir por un lado los folículos linfoides, compuestos principalmente por linfocitos B, y por otro el tejido linfoide difuso, constituido por linfocitos T (39).

Los **folículos linfoides** son agrupaciones circunscritas y compactas de linfocitos, principalmente B, rodeadas de zonas extranodulares o interfoliculares de **tejido linfoide difuso**, donde son abundantes los linfocitos T, que están asociadas íntimamente al epitelio (6,40). En los bovinos, al igual que en humanos y en el cerdo, los folículos linfoides de las tonsilas son más ricos en linfocitos B que en los nódulos linfáticos periféricos (11).

Los folículos linfoides son similares a los de otros órganos linfoides secundarios. Presentan un **centro germinal** (CG) pálido, de localización central, rodeado de una zona periférica denominada "manto" constituida de linfocitos de pequeño tamaño que se encuentran densamente empaquetados. Los folículos linfoides primarios carecen de CG y están constituidos de abundantes linfocitos de pequeño tamaño que se corresponden con los linfocitos del manto de los folículos secundarios. Así, los CG son estructuras ovoides constituidas por un acumulo esférico de células que forman una red en la que participan células dendríticas foliculares (CDF) unidas a fibras reticulares, pálidamente teñidas y cubiertas por un entramado de pequeños linfocitos. También entre este entramado hay algunas CD, pero estas se localizan principalmente en áreas interfoliculares (26). Una cápsula constituida por algunas capas de células reticulares aplanadas rodean al centro germinal. En su forma totalmente desarrollada aparecen como una masa esférica con un **polo oscuro** densamente poblado, constituido por linfoblastos, linfocitos grandes y medianos, células en transición de la serie linfoide y macrófagos cargados con restos de linfocitos fagocitados (macrófagos de cuerpo tingible). El **polo claro**, constituido por el mismo tipo de células, muestra menor densidad celular (41).

Los CG presentan una polaridad morfológica muy definida. El manto se presenta como una banda más ancha sobre la región clara, y se va adelgazando gradualmente hacia el polo oscuro. Esta zona se encuentra orientada hacia el epitelio y en ella abun-

dan los linfocitos T (6), mientras que la zona oscura se encuentra en el polo opuesto. Esta polarización no se observa cuando el plano de un corte histológico pasa a través de un centro germinativo en dirección perpendicular a su eje de simetría, apareciendo este entramado de linfocitos como una envoltura circular de grosor uniforme rodeando al CG (11,42).

En los CG se distribuye una gran cantidad de linfocitos B, muchos de los cuales se encuentran expresando IgM en su superficie (9), mientras que otros se encuentran diseminados en las zonas interfoliculares y en el epitelio (11). En los CG también se pueden encontrar linfocitos T CD4+ (especialmente en la zona clara) y escasos linfocitos T CD8+ (9).

La arquitectura de los folículos linfoides y las reacciones de los CG va a depender de la presencia de las CDF, una población especializada de CPA que se encuentran en los folículos (principalmente en la zona clara de los centros germinales) de las áreas B de los ganglios linfáticos, del bazo y de los tejidos linfoides de las mucosas (43,44). La transición entre la región clara y la oscura es gradual. Los linfoblastos y linfocitos van cediendo su puesto a los linfocitos pequeños, descendiendo el número de macrófagos. Además, en los CG existen numerosas células plasmáticas maduras. Los centros germinativos pasan a través de una serie de cambios evolutivos y al final involucionan y desaparecen (40). Asimismo, en el seno del folículo linfoide se pueden observar imágenes de linfocitos en apoptosis, que posteriormente pueden ser fagocitados por los macrófagos (45).

La zona que se encuentra entre los folículos linfoides con gran cantidad de linfocitos T y venas postcapilares corresponde a la denominada **región interfolicular**, a través de la cual circulan los linfocitos para penetrar en el parénquima tonsilar. Son áreas constituidas principalmente por células T, con presencia de abundantes linfocitos T CD4+ y un número variable de CD8+, linfocitos estos últimos que se incrementan en estas localizaciones con la edad y la mayor exposición a antígenos de los animales (46). En estas áreas destaca también la presencia de células dendríticas o interdigitantes y células reticulares (47,48).

## 2. TEJIDO LINFOIDE ASOCIADO A MUCOSA INTESTINAL: LAS PLACAS DE PEYER

El **TLAI** representa la defensa inmunológica activa de la mucosa intestinal y posee la habilidad de inducir o suprimir la respuesta inmune periférica. Esto es posible gracias a la producción de inmunoglobulinas (Ig)-A en la lámina propia de las mu-

cosas, que actúan bloqueando la adhesión, neutralizando y/o excluyendo antígenos víricos (49,50). En la mucosa del aparato digestivo de los rumiantes jóvenes existen agregaciones de células linfoides que se encuentran de forma aislada a lo largo del tracto intestinal o formando agregados linfoides organizados a nivel del yeyuno e íleon, constituyendo las placas de Peyer (PP) (51,52,53).

Existen dos tipos de PP en el intestino delgado de rumiantes. Por un lado se encuentran las PP yeyunales (PPye), pequeñas y dispersas placas linfoides con grandes áreas interfoliculares entre ellas, que son comparables con las que presentan humanos y ratones de laboratorio. Por otro lado se encuentran las PP ileales (PPil), constituidas por un extenso y continuo agregado linfoide formado por folículos grandes y alargados que se extiende cranealmente desde la unión ileocecal (52,54), llegando a medir en rumiantes jóvenes y cerdos hasta 2 mts. Las primeras persisten en los animales adultos, constituyendo un lugar muy eficiente para la inducción de las respuestas inmunes locales en la mucosa intestinal (55), mientras que las PPil involucionan a edades jóvenes (52,56), al igual que ocurre con el timo. En los rumiantes, así como en cerdos, perros, caballos y humanos, estas PPil representan un 80-90% del total del tejido de las PP (56). Se ha especulado con el posible papel de las PPil como tejido linfoide primario en rumiantes y cerdos, siendo responsables de la generación de la mayoría de células B y equiparándolas a la bolsa de Fabricio en las aves (52,54,57). La impermeabilidad de la placenta bovina y el desarrollo prenatal de las PPil, sugieren la presencia de factores intrínsecos que podrían iniciar la linfopoyesis dentro de los folículos. Se ha demostrado que las PPil y las células epiteliales asociadas a folículos aparecen y se desarrollan en el feto entre el 5° y 6° mes de gestación, madurando justo antes del nacimiento y fijando un sistema de defensa local contra sustancias nocivas y microorganismos del ambiente extrauterino (58).

### **2.1. Características estructurales y funcionales de las placas de peyer**

Las placas de Peyer están formadas por cuatro zonas bien diferenciadas destacando los folículos linfoides, localizados en la submucosa y rodeados individualmente por una cápsula de tejido conectivo, el epitelio, la lámina propia y las áreas interfoliculares. Los folículos se extienden como un cuello de botella o corona hacia la muscular de la mucosa para formar una región en cúpula o áreas dome bajo el epitelio intestinal. Estas áreas están formadas por un entramado de fibras reticulares de origen mesenquimal, linfocitos T (normalmente CD4+), linfocitos B de los cuales la mayoría son IgM+ y en menor medida IgA+ (25-50% menos), macrófagos y células dendríticas (59). Estas células dendríticas captan y procesan antígenos lumenales de

manera similar a las células de Langerhans de la piel, presentando estos antígenos a los linfocitos T CD4+ presentes en el epitelio que se activan y migran a la región interfolicular (60). En la zona de la cúpula, la mucosa está modificada, no presentando vellosidades, ni criptas, ni células caliciformes (61).

### 2.1.1. Epitelio

El epitelio que recubre las PP se denomina epitelio asociado a los folículos o epitelio de la dome, rico en linfocitos T CD4+ y CD8+, especializado en permitir el transporte transepitelial de macromoléculas. En los humanos y rumiantes la mayoría de los linfocitos intraepiteliales son linfocitos CD8+, así como en el cerdo (77%). En los rumiantes, junto a una mayoría de CD8+ también se localizan numerosos linfocitos T  $\gamma\delta$  intraepiteliales (62). Mientras que en ratones aproximadamente el 50% expresan la forma  $\gamma\delta$  del receptor de linfocitos T, en los humanos sólo el 10 % de los linfocitos intraepiteliales son  $\gamma\delta$ . En este epitelio, la función transportadora está mediada por las células membranosas o células M, localizadas entre los enterocitos. Estas células poseen un elevado contenido en lisosomas y en la superficie libre presentan pliegues o prolongaciones citoplasmáticas, pero no microvellosidades. En el polo basal de las células M no existe membrana basal, mostrando invaginaciones citoplasmáticas a modo de compartimentos en los que se localizan linfocitos y macrófagos. Estas células atrapan y transportan antígenos desde la luz intestinal hacia el tejido linfoide subyacente, el cual responde produciendo IgA, iniciándose así una respuesta inmune tanto en la mucosa intestinal como a nivel sistémico (61). Mientras que el epitelio asociado a los folículos sobre las PPye de rumiantes se corresponde morfológicamente con el de las PP de otros mamíferos, las PPil están desprovistas de las típicas células M. La función transportadora a este nivel la lleva a cabo una población homogénea de células epiteliales especializadas que son capaces de internalizar material procedente de la luz (52).

### 2.1.2. Lámina propia

La lámina propia, situada bajo el epitelio intestinal está constituida por tejido conectivo laxo en el que se encuentran linfocitos T, la mayoría CD4+ activados, así como escasos CD8+ y  $\gamma\delta$  (62). Es probable que los linfocitos T reconozcan inicialmente los antígenos en los nódulos mesentéricos y luego se dirijan a la lámina propia. También aquí se encuentran abundantes linfocitos B activados y células plasmáticas que secretan principalmente IgA (alrededor del 80%) que es liberada a la luz, macrófagos,

células dendríticas, eosinófilos y mastocitos. La **IgA** juega un importante papel en la respuesta inmune de las mucosas. Su configuración la hace muy efectiva frente a diferentes antígenos bacterianos, mediante un proceso denominado “citotoxicidad celular mediada por anticuerpos”, ya que la IgA no es bactericida. Presenta gran capacidad para la neutralización de algunos virus, incluso dentro de las células epiteliales (63), siendo la única inmunoglobulina capaz de poder actuar dentro de una célula. Pero su principal actividad en la defensa de las mucosas es la de evitar la adherencia de bacterias y virus a la superficie del epitelio, ya que puede unirse al antígeno en la luz intestinal evitando la adherencia de éstos (64,65).

### 2.1.3. Áreas interfoliculares

En el íleon, los folículos están densamente empaquetados y entre ellos se encuentran las áreas interfoliculares, que próximas a la mucosa presentan forma triangular. Son áreas constituidas principalmente por células T, con presencia de abundantes CD4+ (57), células B IgM+ (66), células interdigitantes y reticulares de origen mesenquimal que están estrechamente asociadas con abundantes fibras reticulares (48). Las células interdigitantes (CID) son una población de CD que se encuentran abrazando a los linfocitos T, y su función es la de procesar y presentar antígenos a los linfocitos T colaboradores y activarlos (67,68). Las células reticulares o “fibroblastos reticulares” tienen el mismo origen mesenquimal y presentan las mismas características morfológicas que las células reticulares del bazo. Sintetizan las fibras reticulares, constituidas por colágeno tipo III, que forman, junto a las células reticulares, el armazón de muchos órganos (36). Estas fibras están completamente rodeadas por los procesos citoplasmáticos de las células reticulares, por medio de los cuales establecen contactos unas con otras (37). Otras moléculas que forman la matriz extracelular junto a las fibras reticulares son la elastina, la laminina, la vimentina y la fibronectina (69). La morfología de estas células varía de ovalada a estrellada, con núcleo alargado e indentado que presenta un espacio perinuclear dilatado, un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado, numerosos polirribosomas libres, un complejo de Golgi muy evidente, un número importante de mitocondrias, vesículas en fila india (70) y abundantes filamentos intermedios (36), mostrando evidencias de intensa actividad secretora pero escasa actividad fagocítica. Formando también parte de las áreas interfoliculares se encuentra una compleja red de senos linfáticos, los cuales conectan con vasos linfáticos que drenan de las vellosidades intestinales, así como con sinusoides adyacentes. Desde aquí emergen finos vasos linfáticos los cuales se unen a nivel de la serosa para formar los vasos linfáticos eferentes que llevan la linfa a los nódulos linfáticos mesentéricos.

#### 2.1.4. *Folículos linfoides*

Los folículos están constituidos mayoritariamente por células B, muchas de las cuales se encuentran expresando IgM en su superficie existiendo además, aunque en menor número, linfocitos T CD4+ y algunos CD8+ (66), junto a macrófagos de cuerpo tingible y células plasmáticas (5). Entre ellos existe una red estromal de células con morfología estrellada identificadas como CDF. Constituyendo parte del armazón existe también un número variable de células y fibras reticulares, siendo su densidad menor que en las áreas T interfoliculares. En el centro de los folículos y extendiéndose hacia las domes también existe un número variable de linfocitos B IgA+.

Varios estudios demuestran que las PPil de los rumiantes son el principal lugar de producción de células B periféricas, ya que si se eliminan quirúrgicamente en etapas tempranas del desarrollo, el animal sufre un déficit de células B que se mantiene durante largo tiempo (71). Durante la vida fetal, la expansión de las células B es independiente de la presencia de antígenos (72), pero tras el nacimiento la presencia de antígenos en la luz intestinal es fundamental para estimular el desarrollo de las PP (56,73). Por otro lado, los linfocitos T no son esenciales en el desarrollo de las células B en las PP, como lo demuestra el hecho de que no haya cambios en el desarrollo de las PPil en corderos sometidos a una timectomía fetal (73).

Existen diferencias en la arquitectura de las PPil de los rumiantes y las de otros mamíferos. Así, la corteza de los folículos en las PPil de los rumiantes es equivalente a la zona oscura de los CG de los folículos linfoides secundarios presentes en las otras PP (incluidas las PPy de rumiantes), ya que aquí es donde se localizan las células B en proliferación, siendo escasa la presencia de CDF (54,57,74,75). Estos linfocitos B presentan una elevada predisposición a sufrir apoptosis a la vez que presentan un alto grado de proliferación (43). Esta progenie de linfocitos B, que no poseen capacidad de división, migra hacia el interior de los folículos donde existen abundantes CDF, que llevarán a cabo la presentación del antígeno, y donde tendrán lugar los procesos de selección de los linfocitos B. Sólo los linfocitos B que presentan una alta afinidad son seleccionados para vivir, expresando altos niveles de la proteína anti-apoptótica bcl-2, mientras que los restantes mueren por apoptosis (43,76). Posteriormente, estas células seleccionadas migran fuera del CG y se convierten en células secretoras de anticuerpos o células de memoria. En esta zona medular se localizan abundantes CDF, células B en reposo y algunos linfocitos T CD4+, encontrándose también los antígenos presentes en los CG en forma soluble (43).

Es fundamental conocer qué papel desempeñan estas células en el mantenimiento de la homeostasis y el microambiente folicular, especialmente las CDF, ya que

intervienen de manera importante en la patogenia de muchas enfermedades, siendo células blanco de virus como el de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (77), el virus Epstein-Barr (78), el herpesvirus bovino tipo1 (79) y el virus de la diarrea vírica bovina (66,80,81). Además, se presentan como una de las principales células donde se acumula el agente responsable de las encefalopatías espongiiformes transmisibles (82,83).

En los tejidos linfoides secundarios, por tanto también en las tonsilas, la arquitectura de los folículos linfoides y las reacciones de los CG va a depender de la presencia de las CDF. Existe una dependencia entre los linfocitos B y las CDF para su supervivencia (84,85), desempeñando las CDF un importante papel ya que favorecen la proliferación de células B, proceso en el que también juegan un importante papel los linfocitos T a través de la liberación de ciertas citoquinas como la IL-2 (86,87,88). Para el correcto mantenimiento de la homeostasis folicular es necesario además, la presencia del factor trófico de las células B, cuya fuente principal son las células del estroma folicular, principalmente las CDF (44), las cuales se muestran resistentes a la radiación (89).

Las CDF y las células reticulares de los folículos linfoides primarios, así como de la zona clara de los CG, son las células que principalmente sintetizan el mediador químico CXCL13 (69,90). También es sintetizado, aunque en menor medida, por macrófagos, células dendríticas y células T foliculares (44). EL CXCL13 (antes conocida como BLC, *B-lymphocyte chemoattractant*) es una citoquina crítica en la migración de las células B vírgenes al interior y concretamente a la zona clara de los CG, formando la polarización característica de los folículos (69,91). Induce la expresión de linfotoxina por las células B incrementando a su vez la expresión de CXCL13 en la zona clara de los CG, quedando por determinar cómo influyen sobre la proliferación o la maduración celular (69). Su receptor (CXCR5) lo expresan mayoritariamente las células B maduras, pero también algunas células T activadas y de memoria, siendo el nivel de expresión indicativo de la cantidad de CXCL13 que existe en una zona (69).

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa a través del proyecto AGR2010-4671. Pedro José Sánchez Cordón es beneficiario de un contrato dentro del "Programa Ramón y Cajal" del Ministerio de Ciencia e Innovación, (España).



## BIBLIOGRAFÍA

1. Pedrera M, Risalde MA, Romero-Trejejo JL, Da Silva Alexandre A, Núñez A, Ruiz-Villamor E, Gómez-Villamandos JC, Sánchez Cordón PJ. (2007). Diarrea vírica bovina: etiología, formas clínicas, distribución del virus y patogenia. En: Anales. Ed. Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental. 20(1):135-158.
2. Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Neill JD (2003a). Distribution of viral antigen and development of lesions after experimental infection of calves with a BVDV 2 strain of low virulence. *J Vet Diagn Invest* 15:221-32.
3. Liebler-Tenorio EM, Ridpath JF, Nelly JD (2003b). Lesions and tissue distribution of viral antigen in severe acute versus subclinical acute infection with BVDV2. *Biologicals* 31: 119-22.
4. Pedrera M, Sánchez-Cordón PJ, Romero-Trejejo JL, Risalde MA, Greiser-Wilke I, Núñez A, Gómez-Villamandos JC (2009). Morphological Changes and Viral Distribution in the Ileum of Colostrum-Deprived Calves Inoculated with Noncytopathic Bovine Viral Diarrhea Virus Genotype-1. *J Comp Pathol* 141:52-62.
5. Fawcett DW (1995). El sistema inmunitario. Tratado de Histología. Ed. 12, pp. 471-75. Interamericana, McGraw-Hill.
6. Cocquyt G, Simoens P, Muylle S, Van den Broeck W (2007). Anatomical and histological aspects of the bovine lingual tonsil. *Res Vet Sci.* 84(2):166-73.
7. Howie AJ (1980). Scanning and transmission electron microscopy on the epithelium of human palatine tonsils. *J Pathol.* 130(2):91-8.
8. Inaga K, Tsujita T (1988). The structure of the human tonsillar basement membrane. *Jap. J. Tonsil.* 27: 7-11.
9. Manesse M, Delverdier M, Abella-Bourges N, Sautet J, Cabanié P, Schelcher F (1998). An immunohistochemical study of bovine palatine and pharyngeal tonsils at 21, 60 and 300 days of age. *Anat Histol Embryol.* 27(3):179-85.
10. Winkelmann A. (2007). Wilhelm von Waldeyer-Hartz (1836-1921): an anatomist who left his mark. *Clin Anat.* 20(3):231-4.
11. Rebelatto MC, Mead C, HogenEsch H (2000). Lymphocyte populations and adhesion molecule expression in bovine tonsils. *Vet Immunol Immunopathol.* Jan 31;73(1):15-29.
12. Walz PH, Steficek BA, Baker JC, Kaiser L, Bell TG (1999). Effect of experimentally induced bovine virus diarrhoea virus infection on platelet function in calves. *Am J Vet Res* 60: 1396-401.
13. Fulton RW, Purdy CW, Confer AW, Saliki JT, Loan RW, Briggs RE and Burge LJ (2000). Bovine viral diarrhoea infections in feeder calves with respiratory disease: Interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res* 64: 151-9.
14. Fulton RW, Ridpath JF, Saliki JT, Briggs RE, Confer AW, Burge LJ, Purdy CW, Loan RW, Duff GC, Payton ME (2002). Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1b: predominant BVDV subtype in calves with respiratory disease. *Can J Vet Res* 66: 181-90.
15. Confer AW, Fulton RW, Step DL, Johnson BJ, Ridpath JF (2005). Viral antigen distribution in the respiratory tract of cattle persistently infected with bovine viral diarrhoea virus subtype 2a. *Vet Pathol* 42(2):192-9.
16. Plopper CG, Adams DR (1984). Respiratory System. In: Textbook of Veterinary Histology. Dellmann HD y Brown EM. Lea & Febiger ed. 3ª, Philadelphia 185-208.
17. Kato K, Sawada Y (2008). Distribution of the lingual tonsils of cattle designated as specified risk materials. *J Vet Med Sci.* (3):251-4.
18. Narita M, Inui S, Shimizu Y (1984). Tonsillar changes in pigs given pseudorabies (Aujeszky's disease) virus. *Am J Vet Res.* 45(2):247-51.
19. Narita M, Imada T, Haritani M, Kawamura H (1989). Immunohistologic study of pulmonary and lymphatic tissues from gnotobiotic pigs inoculated with ara-T-resistant strain of pseudorabies virus. *Am J Vet Res.* 50(11):1940-5.

20. Domínguez J, Rueda A (1991). Células y órganos del sistema inmune. *Inmunología (I)*. Porci. pp. 9-24.
21. Barone R. (1997). Pharynx et Oesophage. In: Barone R (Ed) *Anatomie Comparée des Mammifères Domestiques, Tome troisième: Splanchnologie*. Editions Vigot, París pp. 249-90.
22. Manesse M, Sautet J, Delverdier M, Schelcher F, Espinasse J, Cabanie P (1995). Anneau de Waldeyer des bovins: anatomie topographique et microscopique de tonsilles. *Revue de Médecine vétérinaire* 146, 749-56.
23. Marshall DJ, Moxley RA, Kelling CL (1996). Distribution of virus and viral antigen in specific pathogen-free calves following inoculation with noncytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Vet Pathol* 33:311-8.
24. MacPherson GG, Liu LM (1999). Dendritic cells and Langerhans cells in the uptake of mucosal antigens. *Curr Top Microbiol Immunol* 236:33-53.
25. Lasser A (1982). The Mononuclear System. *Prog in Pathol* 108-24.
26. Tang X, Hori S, Osamura RY, Tsutsumi Y (1995). Reticular crypt epithelium and intra-epithelial lymphoid cells in the hyperplastic human palatine tonsil: an immunohistochemical analysis. *Pathol Int.* 45(1):34-44.
27. Kawaguchi E (1967). [Ultrastructure of human palatine tonsil. I. Electron microscopic studies on tonsillar mucous epithelium]. *Sapporo Igaku Zasshi.* (2):144-65.
28. Higashikawa T, Ohtani O, Masuda Y (1990). Ultrastructures of the epithelial basement membrane and the subepithelial capillaries in rabbit palatine tonsil. *Arch. Histol. Cytol.* 53: 31-39.
29. Kawabata A, Nakagaki K, Yoshida M, Shirota K (2008). Histopathological comparison of pulmonary artery lesions between raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) and domestic dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. *J Vet Med Sci.* (3):301-3.
30. Carrasco L, Gómez-Villamandos JC, Bautista MJ, Sierra MA (1997). Órganos del sistema inmune. *Porci*, 40: 13-33.
31. Frink S, Grummer B, Pohlenz JF, Liebler-Tenorio EM (2002). Changes in distribution and numbers of CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in lymphoid tissues and intestinal mucosa in the early phase of experimentally induced early onset mucosal disease in cattle. *J Vet Med B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 49, 476-83.
32. Terasaki M, Loew L, Lippincott-Schwartz J, Zaal K (2001). Fluorescent staining of subcellular organelles: ER, Golgi complex, and mitochondria. *Curr Protoc Cell Biol.* Chapter 4: Unit 4.4.
33. De Matteis MA, Luini A (2008). Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(4):273-84.
34. Nicander L, Brown EM, Dellman HD, Landsverk T (1994 ). Órganos linfáticos. En *Histología Veterinaria*. Ed. 2. De. Acribia, pp. 141-48, Zaragoza.
35. Sánchez-Vizcaíno JM (2004). Curso de introducción a la inmunología porcina. 2ª Edición. <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca013.htm>.
36. Tablin F, Weiss L (1983) The equine spleen: an electron microscopic analysis. *Am J Anat* 166: 393-416.
37. Yoshida T, Takaya K (1992). The enveloping of intercellular collagenous fibrils by reticular cell processes in postnatal development of rat lymph nodes. *Arch Histol Cytol* 55:351-9.
38. Burke JS, Simon GT (1970). Electron microscopy of the spleen. I. Anatomy and microcirculation. *Am J Pathol.* Jan;58(1):127-55.
39. Quiding-Järbrink M, Granström G, Nordström I, Holmgren J, Czerkinsky C (1995). Induction of compartmentalized B-cell responses in human tonsils. *Infec. Immunity.* 63: 853-57.
40. Raviola E (1995). Sistema inmunitario. *El Tratado de Histología*. Fawcett, D.W. Bloom-Fawcett. Ed. 3. pp. 455-78. Interamericana-Mc Graw-Hill, Madrid.
41. Binns RM, Pabst R (1994). Lymphoid tissue structure and lymphocyte trafficking in the pig. *Vet Immunol Immunopathol.* 43(1-3):79-87.

42. Chen LL, Adams JC, Steinman RM (1978a). Anatomy of germinal centers in mouse spleen, with especial reference to "follicular dendritic cells". *J Cell Biol* 77:148-64.
43. Liu Y, Arpin C (1997). Germinal center development. *Immunological Reviews* 156: 111-26.
44. Allen CDC, Cyster JG (2008). Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: Phenotype and function. *Seminars in Immunology* Feb;20(1):14-25.
45. Plum J, Van Cauemberge P, De Smedt M (1988). Analysis of activation markers on tonsillar T lymphocyte. *Acta otolaryngol.* 416: 45-55.
46. Schuh JC, Oliphant LW (1992). Development and immunophenotyping of the pharyngeal tonsil (adenoid) in cattle. *J Comp Pathol.* 106(3):229-41.
47. Dellmann HD (1964). [On the structure of the vascular organ of the terminal lamina in poultry]. *Anat Anz.* 31;115:174-83.
48. Halleraker M, Landsverk T, Nicander L (1990). Organization of ruminant Peyer's patches as seen with enzyme histochemical markers of stromal and accessory cells. *Vet Immunol Immunopathol* 26: 93-104.
49. McNabb P, Tomasi T (1981). Host defense mechanisms at mucosal surfaces. *Ann Rev Microbiol* 35: 477-96.
50. Clough ER, Cebra JJ (1983). Interrelationship of primed B cells with the potential for IgE and/or IgA expression. *Molecular Immunol* 20:903-915.
51. Aleksandersen M, Nicander L, Landsverk T (1991). Ontogeny, distribution and structure of aggregated lymphoid follicles in the large intestine of sheep. *Dev Comp Immunol* 15: 413-422.
52. Landsverk T, Halleraker M, Aleksandersen M, McClure S, Hein W, Nicander L (1991). The intestinal habitat for organized lymphoid tissues in ruminants; comparative aspects of structure, function and development. *Vet Immunol Immunopathol* 28: 1-16.
53. Hein WR (1999). Organization of mucosal lymphoid tissue. *Curr Top Microbiol Immunol* 236: 1-15.
54. Griebel PJ, Hein WR (1996). Expanding the role of Peyer's patches in B-cell ontogeny. *Immunol Today* 17:30-39.
55. Mutwiri G, Watts T, Lew L, Beskorwayne T, Papp Z, Baca-Estrada ME, Griebel P (1999). Ileal and jejunal Peyer's patches play distinct roles in mucosal immunity of sheep. *Immunology.* 97(3): 455-61.
56. Reynolds JD, Morris B (1983). The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and post-natal sheep. *Eur J Immunol* 13: 627-635.
57. Yasuda M, Tanaka S, Arakawa H, Taura Y, Yokomizo Y, Ekino S (2002). A comparative study of gut-associated lymphoid tissue in calf and chicken. *Anat Rec* 266(4):207-217.
58. Beyaz F, Aşti RN (2004). Development of ileal Peyer's patches and follicle associated epithelium in bovine foetuses. *Anat Histol Embryol* 33(3):172-9.
59. Ramis Salva A (1988). Estudio histoquímico del sistema inmunitario del cerdo. Tesis Doctoral. Universidad Autonoma de Barcelona.
60. MacPherson GG, Jenkins CD, Stein MJ, Edwards C (1995). Endotoxin-mediated dendritic cell release from the intestine. Characterization of released dendritic cells and TNF dependence. *J Immunol* 154(3):1317-22.
61. Owen RL (1999). Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches—a personal and historical perspective. *Semin Immunol* 11: 157-63.
62. Liebler EM, Pohlenz JF, Moennig V (1996). Lymphocyte subpopulations in gut-associated lymphoid tissue of cattle with experimental mucosal disease. *Adv Exp Med Biol* 371B:825-7.
63. Dimmock NJ (1984) Mechanisms of neutralization of animal viruses. *J Gen Virol* 65: 1065-1070.
64. Husband AJ, Gowands JL (1978). The origin and antigen-dependent distribution of IgA-containing cells in the intestine. *J Exp Med* 148: 1146-60.

65. Tizard IR (1998). *Inmunología Veterinaria*. 5 Ed McGraw-Hill. Interamericana Madrid.
66. Liebler EM, Küsters C, Pohlenz JF (1995). Experimental mucosal disease in cattle: changes of lymphocyte subpopulations in Peyer's patches and in lymphoid nodules of large intestine. *Vet Immunol Immunopathol* 48: 233-48.
67. Balfour BM, Drexhage HA, Kamperdijk EWA, Hoefsmit EC (1981). Antigen-presenting cells, including Langerhans cells, veiled cells and interdigitating cells. In: *Microenvironments in Haematopoietic and Lymphoid Differentiation*. pp 281-301. Ed J Whelan, Pitman Medical, London, Ciba Foundation Symposium 84.
68. Roitt I, Brostoff J, Male D (1998). *Inmunología* 4ª Ed. Harcourt Brace, Madrid.
69. Cyster JG, Ansel KM, Reif K, Eklund EH, Hyman PL, Tang HL, Luther SA, Ngo VN (2000). Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev*. 176:181-93. Review.
70. Bautista MJ, Carrasco L, Pérez J, Chacón M de Lara, Hervas J, Sierra MA (1994). Estudio comparativo del bazo en los diferentes mamíferos domésticos. *An Vet (Murcia)* 9-10: 83-97.
71. Gerber HA, Morris B, Trevella W (1986). The role of gut-associated lymphoid tissues in the generation of immunoglobulin-bearing lymphocytes in sheep. *Aust J Exp Biol Med Sci* 64:201-13.
72. Reynolds JD, Morris B (1984). The effect of antigen on the development of Peyer's patches in sheep. *Eur J Immunol* 14(1):1-6.
73. Reynaud CA, Garcia C, Hein WR, Weill JC (1995). Hypermutation generating the sheep immunoglobulin repertoire is an antigen-independent process. *Cell* 80(1):115-25.
74. Liebler-Tenorio EM, Pohlenz JF (1997). Experimental mucosal disease of cattle: altered cell proliferation in lymphoid tissues and intestinal epithelium. *J. Comp. Pathol.* 117, 339-50.
75. Yasuda M, Taura Y, Yokomizo Y, Ekino S (1998). A comparative study of germinal center: fowls and mammals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 21(3):179-89.
76. Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P (1999). The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol (Berl)* 200:1-18. Review.
77. Smith BA, Gartner S, Liu Y, Perelson AS, Stilianakis NI, Keele BF, Kerkering TM, Ferreira-Gonzalez A, Szakal AK, Tew JG, Burton GF (2001). Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells. *J Immunol Jan* 1;166(1):690-6.
78. Lindhout E, Lakeman A, Mevissen ML, De Groot C (1994). Functionally active Epstein-Barr virus-transformed follicular dendritic cell-like cell lines. *J Exp Med.* 179(4):1173-84.
79. Winkler MT, Doster A, Jones C (2000). Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *J Virol.* 74(11):5337-46.
80. Brusckke CJ, Haghparast A, Hoek A, Rutten VP, Wentink GH, van Rijn PA, van Oirschot JT (1998a). The immune response of cattle, persistently infected with noncytopathic BVDV, after superinfection with antigenically semi-homologous cytopathic BVDV. *Vet Immunol Immunopathol.* 62(1):37-50.
81. Teichmann U, Liebler-Tenorio EM, Pohlenz JF (2000). Ultra-structural changes in follicles of small-intestinal aggregated lymphoid nodules in early and advanced phases of experimentally induced mucosal diseases in calves. *Am J Vet Res.* 61:174-82.
82. Bruce ME, Brown KL, Mabbott NA, Farquhar CF, Jeffrey M (2000). Follicular dendritic cells in TSE pathogenesis. *Immunol Today* 21: 442-46.
83. Montrasio F, Frigg R, Glatzel M, Klein MA, Mackay F, Aguzzi A (2000). Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* 288: 1257-59.
84. MacLennan IC (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12:117-39.
85. Yoshida K, van den Berg TK, Dijkstra CD (1994). The functional state of follicular dendritic cells in severe combined immunodeficient (SCID) mice: role of the lymphocytes. *Eur J Immunol* 24(2):464-8.
86. Clark EA, Grabstein KH, Shu GL (1992). Cultured human follicular dendritic cells. Growth characteristics and interactions with B lymphocytes. *J Immunol* 148(11):3327-35.

87. Burton GF, Conrad DH, Szakal AK, Tew JG (1993). Follicular dendritic cells and B cell costimulation. *J Immunol* 150(1):31-8.
88. Grouard G, de Bouteiller O, Barthelemy C, Lebecque S, Banchereau J, Liu YJ (1995). Regulation of human B cell activation by follicular dendritic cell and T cell signals. *Curr Top Microbiol Immunol* 201:105-17.
89. Tew JG, Wu J, Qin D, Helm S, Burton GF, Szakal AK (1997). Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol Rev.* 156:39-52. Review.
90. Ansel KM, Harris RB, Cyster JG (2002). CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity* 16(1):67-76.
91. Allen CD, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, Cyster JG (2004). Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 5 (9): 943-52.

# LENGUA AZUL: VACUNAS, INMUNOMODULADORES E INMUNIDAD PROTECTORA

P.J. SÁNCHEZ CORDÓN<sup>1\*</sup>, M. PEDRERA<sup>1</sup>, B. RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ<sup>2</sup>, E. RUIZ-VILLAMOR<sup>3</sup>, M.A. RISALDE<sup>1</sup>, V. MOLINA<sup>1</sup>, L.M. GAYOSSO<sup>1</sup>, J. M. SÁNCHEZ-VIZCAÍNO<sup>2</sup>, J.C. GÓMEZ-VILLAMANDOS<sup>1</sup>

## RESUMEN

La Lengua Azul, está producida por un virus ARN del género *Orbivirus* (familia *Reoviridae*), considerado como el virus prototipo de este género, del que se conocen al menos 24 serotipos diferentes, no todos patógenos, entre los que no existe inmunidad cruzada, lo que dificulta las estrategias de vacunación. En las dos últimas décadas, y más recientemente desde el verano de 2006, esta enfermedad ha provocado importantes pérdidas económicas, no sólo en las zonas de Europa periódicamente afectadas como los países de la cuenca Mediterránea, sino prácticamente en toda Europa. Los planes de vacunación puestos en marcha por las autoridades sanitarias, han revelado la existencia de reacciones adversas, así como la falta de protección de las vacunas en un elevado porcentaje de casos. En este trabajo pretendemos poner de manifiesto la importancia de conocer los mecanismos inmunológicos que se desarrollan tanto en animales infectados como en animales vacunados. Los mecanismos de acción de cada uno de estos serotipos varían completamente dependiendo de la especie y de la raza afectada. Hasta la fecha son escasos los trabajos *in vivo* que hayan centrado sus esfuerzos en una caracterización pormenorizada de los mecanismos patogénicos y de

---

<sup>1</sup> Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Edificio Sanidad Animal, Campus de Rabanales, 14014, Córdoba, España.

<sup>2</sup> Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Avda Puerta de Hierro s/n 28040 Madrid, España.

<sup>3</sup> Laboratorio Central de Veterinaria de Santa Fe, Camino del Jau s/n, 18320, Santa Fe, Granada, España

\* E-mail: an2sacop@uco.es

la respuesta inmune de cada uno de los serotipos patógenos en las principales especies afectadas por la enfermedad. Sólo con el conocimiento de los mecanismos de acción del virus y con el estudio de los mecanismos que controlan y modulan la respuesta inmune podremos desarrollar herramientas (nuevos adyuvantes, aplicación de inmunomoduladores, etc) que nos permitan mejorar las vacunas existentes, reduciendo las reacciones adversas que producen y potenciando su protección.

## INTRODUCCIÓN

La incursión del virus de la Lengua Azul (vLA) en la Europa Mediterránea inicialmente y en el norte de Europa a partir de 2006, ha provocado un considerable impacto económico negativo, tanto por las pérdidas económicas directas derivadas de la mortalidad de los animales y de la reducción de la productividad de las explotaciones afectadas, como por la prohibición total del transporte de animales entre regiones infectadas y no infectadas. Previamente a los brotes aparecidos en Europa, algunos estudios estimaban las pérdidas económicas causadas por esta enfermedad entorno a unos 3 billones de dólares por año (1). Con el objetivo de limitar las pérdidas directas, de minimizar al máximo la circulación del vLA y de permitir el movimiento seguro de animales, las autoridades sanitarias de los países europeos afectados emprendieron la vacunación de la cabaña ganadera susceptible de la enfermedad acorde con sus políticas nacionales individuales, la distribución geográfica de los serotipos del vLA existentes y la disponibilidad de vacunas apropiadas (2).

En España, inicialmente la vacunación (con vacunas vivas modificadas, las únicas disponibles comercialmente en ese momento), sólo se aplicó a ovejas de las Islas Baleares (2001-2003) (2). Sin embargo, a consecuencia de los brotes de Lengua Azul (LA) detectados en el sureste de la Península Ibérica, desde el año 2003 se aplicó un Programa Nacional de Vigilancia y Control de la Enfermedad basado en estudios serológicos y entomológicos aleatorios. Esta vigilancia se reforzó mediante la vacunación de las especies susceptibles que pertenecían a las zonas restringidas y limítrofes de la enfermedad (3). Finalmente, en el año 2008 se establecieron los cuatro ejes principales de actuación del Programa de Control y Erradicación: vacunación obligatoria de los animales de las especies sensibles, vigilancia serológica, vigilancia entomológica e inspecciones clínicas en ganado ovino en todo el territorio español.

Las vacunas desarrolladas y aplicadas actualmente en la Unión Europea son **vacunas inactivadas**, las cuales muestran un elevado grado de seguridad y eficacia. Estas vacunas están desarrolladas a partir de virus genéticamente inerte, lo que im-



pide su replicación en los animales vacunados, así como la aparición de viremia, la recombinación de virus vacunal y de campo, la transmisión de virus por el vector y los posibles efectos teratógenos del virus en animales gestantes. Este tipo de vacunas confieren una intensa inmunidad protectora específica de serotipo de larga duración, requiriendo normalmente de la aplicación de dos dosis vacunales (2,4); actualmente también existen vacunas inactivadas bivalentes (5). Sin embargo, la diferenciación entre animales infectados y vacunados (DIVA), aunque parece teóricamente posible, aún no se ha conseguido con este tipo de vacunas, lo que condiciona el movimiento de animales. Entre las desventajas potenciales de estas vacunas destacan: (I) su elevado costo de producción; (II) la gran cantidad de antígeno necesaria para la vacunación; (III) la necesidad de inmunizaciones de refuerzo, ya que generalmente estas vacunas inactivadas inducen una inmunidad relativamente transitoria. Aunque estas vacunas son caras de producir y su uso es limitado, constituyen la mejor opción disponible en función de su eficacia/seguridad, si bien sólo están disponibles frente a algunos serotipos (6).

#### POSIBLES REACCIONES ADVERSAS DERIVADAS DE LA VACUNACIÓN FRENTE AL VLA

En distintas reuniones y foros científicos celebrados recientemente (*XXI Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria y XXVII Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, 2009*), se expusieron y discutieron una serie de aspectos relacionados con la vacunación de ovejas frente a los distintos serotipos del vLA incluidos en los programas de control y erradicación de la enfermedad. Dichos foros constataron, desde un punto de vista científico, un hecho que gran parte del sector ovino venía denunciando, y que estaba relacionado con la aparición de un **síndrome neurológico** asociado a una reacción adversa frente a las vacunas empleadas (serotipos 1 y 8 del vLA), que aparecía entre 4-6 días después de la vacunación en animales que habían recibido más de una dosis de vacuna. Este síndrome neurológico se caracterizó por la presencia de convulsiones, incoordinación, pedaleo, opistótonos, pérdida de visión (sin afectación del globo ocular), nistagmo, bruxismo e hipersalivación. Algunos de los animales que se recuperaban mantenían, durante algunos días, cierto grado de desorientación y apatía. Entre las lesiones encontradas destacó la presencia de una meningoencefalitis aguda, con presencia de manguitos perivasculares constituidos por neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y plasmocitos; además se observaron cambios vasculares (hiperemia, edemas y hemorragias) (7). En cuanto al porcentaje de incidencia no existe consenso. Así, mientras que el sector farmacéutico maneja cifras de

una incidencia casi insignificante (4 reacciones adversas/100000 dosis aplicadas en ovejas) (8), otras fuentes indican una incidencia mucho mayor con afectación de un elevado número de explotaciones (7).

Igualmente, numerosos rebaños ovinos repartidos por toda la geografía nacional, se han visto afectados por un **síndrome caquetizante crónico**. La sintomatología aparecía entre 7 y 60 días después de la administración de la última dosis de vacuna, normalmente en animales que habían recibido varias dosis. El cuadro clínico se caracterizó por presentar trastornos de tipo nervioso (inquietud, movimientos constantes de los animales encerrados, mordiscos a la lana de otras ovejas), pérdida de peso sin anorexia, disminución de la producción láctea y una fase final con ataxia, falta de respuesta a estímulos, postración sin convulsiones o pataleos y muerte. El mal aspecto de la lana, junto a la caquexia, hizo que los animales presentaran una mala condición corporal. Sin embargo, la ingesta de los animales afectados lejos de disminuir se mantuvo o incluso aumentó. Los animales tan sólo presentaron una atrofia serosa de la grasa y microscópicamente no se observaron lesiones de relevancia en el sistema nervioso central ni en ninguna otra localización (9). En cuanto a las cifras de incidencia, de nuevo no existe un acuerdo. Algunos trabajos señalan la afectación tanto de animales jóvenes como de adultos, llegándose a alcanzar una morbilidad de hasta el 80% y una alta mortalidad, especialmente a medida que avanzó el proceso (9). Datos procedentes de la industria farmacéutica señalaron que, pese a existir una baja incidencia (17 reacciones adversas/ 100000 dosis aplicadas en ovejas), se produjo una alta mortalidad que alcanzó hasta el 18.5% (8).

A la vista de estos resultados, parece obvio que estas reacciones adversas estuvieron relacionadas espacial y temporalmente con los procedimientos vacunales. Sin embargo, se desconocen los mecanismos que inducen dichas reacciones. Además, estamos ante dos reacciones adversas totalmente diferentes. Así, mientras que el síndrome neurológico es un proceso agudo de cierto componente alérgico, en síndrome caquetizante crónico se manifiesta de manera insidiosa, desconociéndose por completo cuales son los mecanismos que interaccionan en su instauración.

Trabajos experimentales llevados a cabo (en ovino y vacuno) en condiciones de laboratorio controladas, previamente a la aplicación de las vacunas inactivadas en campo, pusieron de manifiesto su seguridad. Este tipo de vacunas no indujeron reacciones sistémicas relacionadas con la vacunación (fiebre, pérdida de peso, disfunciones reproductivas, etc), si bien algunas indujeron reacciones locales transitorias en el lugar de inoculación de importancia variable (media o moderada), con diferente frecuencia (de inusual a común), alteraciones que normalmente desaparecieron an-

tes de los 3 días tras su aplicación, y que sólo en algunos casos aislados persistieron durante 1-2 semanas (2).

## ASPECTOS GENERALES Y HETEROGENEIDAD DEL VLA

La Lengua Azul (LA) es una enfermedad infecciosa no contagiosa de distribución mundial, que afecta tanto a rumiantes domésticos como salvajes con importantes diferencias según las especies afectadas y que se incluye en la antigua lista A de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE). Está producida por un virus ARN del género *Orbivirus* (familia *Reoviridae*), considerado como el virus prototipo de este género, del que se conocen al menos 24 serotipos diferentes, no todos patógenos, entre los que no existe inmunidad cruzada, lo que dificulta las estrategias de vacunación (10,11). Un nuevo serotipo, que sería el número 25, ha sido identificado recientemente (12,13). Hasta el momento, en Europa se han detectado los serotipos 1, 2, 4, 6, 8, 9, 15, 16, así como el posible nuevo serotipo 25 (14).

El virus de la Lengua Azul (vLA) se presenta como el modelo a seguir en el estudio de los *Orbivirus*, mostrando una importante capacidad de difusión y virulencia. A pesar de la gran variabilidad mostrada por las especies de virus del género *Orbivirus*, todos ellos muestran una serie de características comunes: (I) Cápside icosaédrica con dos capas de proteínas en la que se encuentran las proteínas estructurales VP2 y VP5, proteínas mayores de la capa externa que se pierde en la etapa inicial del proceso de infección, mientras que VP3 y VP7 son las principales proteínas de la capa interna, donde se localizan también las proteínas estructurales menores VP1, VP4 y VP6. Además de estas proteínas estructurales existen otras proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS3 y NS3A) que parecen participar en la replicación, maduración y salida del virus de la célula infectada; (II) El genoma del vLA está compuesto por 10 segmentos de ARN bicatenario empaquetados dentro de la cápside (15,16). Las proteínas VP3 y VP7, están altamente conservada en todos los *Orbivirus* (17,18), expresando determinantes antigénicos específicos de grupo (19).

Sin embargo, existen variaciones considerables entre cepas de campo del vLA, incluso entre las pertenecientes al mismo serotipo, lo que pone de relieve diferencias en las secuencias de nucleótidos de cada uno de los segmentos del ARN bicatenario del genoma del virus (20,21). La heterogeneidad entre las cepas de campo ocurre como consecuencia tanto de la deriva genética como del cambio genético, el último como resultado de la redistribución de los genes víricos durante infecciones mixtas en cualquiera de los hospedadores vertebrados e invertebrados del vLA (22). La

variación en la secuencia individual de genes ocurre a través de complejos procesos de deriva genética durante pasos alternos del virus en sus hospedadores rumiantes e invertebrados (23).

Por tanto, a la hora de afrontar el estudio de la LA, deberíamos considerar a cada uno de los serotipos patógenos que participan en la instauración de la enfermedad como agentes etiológicos independientes, capaces de inducir cuadros clínicos, lesiones, cambios inflamatorios y respuestas inmunológicas distintas unos de otros. Además, los mecanismos de acción de cada uno de estos serotipos varían completamente dependiendo de la especie (vacuno, ovino, caprino, rumiantes de vida silvestre) y de la raza afectada. Si hacemos una combinación de estas variantes, podremos comprobar que nuestros conocimientos sobre la enfermedad son limitados. Hasta la fecha son escasos los trabajos *in vivo* que hayan centrado sus esfuerzos en una caracterización pormenorizada de los **mecanismos patogénicos** (células blanco, mecanismos de difusión del virus, órganos de replicación y acantonamiento del virus, causas de los cambios vasculares) y de la **respuesta inmune** de cada uno de los serotipos patógenos en las principales especies afectadas por la enfermedad (evolución y papel de las distintas poblaciones celulares inmunocompetentes, mediadores químicos, proteínas de fase aguda, anticuerpos). Sólo con el conocimiento de los mecanismos de acción del virus y con el estudio de los mecanismos que controlan y modulan la respuesta inmune podremos desarrollar herramientas (nuevos adyuvantes, aplicación de inmunomoduladores) que nos permitan mejorar la vacunas existentes, reduciendo las reacciones adversas que producen y potenciando su protección.

## INMUNIDAD PROTECTORA FRENTE AL VLA

Tanto los mecanismos efectores de la respuesta inmune celular como humoral parecen capaces de proteger a las ovejas frente a la infección del vLA y a la enfermedad. Así, mientras que la **respuesta humoral** confiere una protección específica de serotipo, la **inmunidad celular** confiere protección heterotípica.

Estudios de transferencia pasiva de suero han demostrado que los **anticuerpos específicos** frente al vLA pueden conferir protección específica frente a un serotipo, sugiriendo un papel *in vivo* para la neutralización viral mediada por anticuerpos, cuyos mecanismos son desconocidos hasta la fecha pese a los intentos de demostrar, tanto en bovino como en ovino, una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o del complemento (24,25,26). Las proteínas externas del vLA VP2 y VP5 son las únicas capaces de inducir anticuerpos neutralizantes, siendo la VP2 la proteína mayor

involucrada en la especificidad de serotipo (27,28). Dependiendo de los serotipos, los anticuerpos pueden proteger frente a la infección de un número limitado de otros serotipos, mecanismo relacionado con la similitud de secuencias de la proteína VP2 (29). Los anticuerpos neutralizantes específicos de tipo frente a la VP2 y la VP7 persisten durante toda la vida del animal, mientras que los anticuerpos específicos de grupo frente a la VP7 persisten sólo durante 6-18 meses (30). Por tanto, los rumiantes infectados de manera natural con un serotipo del vLA muestran una inmunidad sólida de por vida al serotipo homólogo pero parcial o inexistente frente a otros serotipos heterólogos. Aunque las vacunas inactivadas inducen una rápida respuesta inmune, se han descrito niveles de seroconversión variables dependiendo de la raza de oveja inmunizada (31,32). Por tanto, dado que el nivel de anticuerpos neutralizantes provocado por la VP2 varía enormemente entre distintas especies de ovejas, la inclusión de los antígenos de ambas proteínas (VP2 y VP5) deberían tenerse en cuenta a la hora de desarrollar vacunas.

Distintos trabajos han constatado que, tras la vacunación, el nivel de anticuerpos neutralizantes no siempre se correlaciona con el grado de protección de los animales; además algunas vacunas inactivadas son capaces de conferir protección en ausencia de niveles detectables de anticuerpos neutralizantes. Se pone así en evidencia el papel de la **respuesta inmune celular** en la protección de los animales. Parece que la inmunidad mediada por células frente a la infección por el vLA en ovino es protectora y, de hecho, parece ser menos específica de serotipo que la respuesta humoral (24). Las ovejas que se recuperan de una infección por un VLA virulento muestran protección parcial cuando se enfrentan a un serotipo virulento heterólogo y protección completa si se infectan de nuevo, a pesar de la ausencia completa de anticuerpos neutralizantes demostrables, frente a los virus de la segunda y tercera infección (33).

Parece ser que son los linfocitos T CD4+ los efectores inmunes involucrados en la protección, aunque su contribución funcional directa aún no ha sido esclarecida. La respuesta de los linfocitos T citotóxicos (CD4+) frente a los antígenos de las proteínas VP2 y VP5 confiere protección homóloga frente a un serotipo particular, mientras que la respuesta de los linfocitos T citotóxicos frente a la proteína NS1 y las proteínas internas del núcleo inducen protección heteróloga (34,35). Sin embargo, la contribución funcional directa de estas células aún no ha sido esclarecida, y una vez más, los trabajos *in vivo* que profundizan sobre el papel de la respuesta inmune protectora (humoral y celular) en el transcurso de la LA son escasos.

## PERSPECTIVAS FUTURAS APLICABLES AL DESARROLLO DE VACUNAS: INMUNOMODULADORES Y CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES.

La vacunación, junto a la restricción de movimientos son los pilares básicos en el control de la LA. “*El Comité Europeo para el Control de la Eficacia, Seguridad y Calidad de los Productos Médicos Veterinarios*”, establece que la efectividad de las vacunas se determina principalmente en base a datos clínicos, virológicos e inmunológicos. Así, la capacidad de inmunización de una vacuna se evalúa mediante el análisis de la respuesta de anticuerpos después de cada inmunización, empleando para ello distintas técnicas (ELISA, seroneutralización). Además, los niveles de viremia tras la inoculación del virus en animales vacunados se considera como la forma más efectiva de determinar la eficacia de la inmunidad inducida por las vacunas, empleando para ello técnicas específicas como RT-PCR a tiempo real o aislamiento del virus (2). En resumen, la ausencia de signos clínicos locales o sistémicos, que exista una buena respuesta de anticuerpos específicos frente al virus y la ausencia de viremia, son los pilares básicos que determinan la eficacia de una vacuna, no profundizando en el estudio de otros parámetros inmunológicos fundamentales (evolución de mediadores químicos, respuesta inmune celular, etc).

Junto a las **vacunas inactivadas**, cuyas características básicas ya ha sido descritas, en la lucha contra la LA se dispone de otro tipo de vacunas como las **vacunas vivas atenuadas**, de gran eficacia inmunológica, pero actualmente en desuso debido a su bajo perfil de seguridad, pudiendo provocar efectos teratógenos, así como transmisión del virus vacunal a animales no vacunados. Otras vacunas a destacar son las **VLP (virus-like particles)**, complejos de proteínas estructurales (VP2, VP5, VP7) carentes de material genético (por tanto no replicativas) que se ensamblan formando estructuras semejantes al virus auténtico. Son muy seguras, permiten diferenciar animales vacunados de infectados (DIVA) y pueden proteger frente a distintos serotipos, por lo que serán las vacunas del futuro. Actualmente, su modo y coste de fabricación no las hacen viables para su comercialización (2,4,6).

Para la inactivación del vLA se emplean diferentes agentes químicos y radiaciones (formaldehído, beta-propiolactona, irradiación gamma, etc.). Asimismo, las vacunas inactivadas incluyen diferentes adyuvantes, destacando los excipientes acuosos (hidróxido de aluminio + saponinas) empleados en las vacunas desarrolladas para su aplicación en Europa por distintos laboratorios (4). La protección específica de serotipo que confieren estas vacunas, parece relacionarse con el papel clave que desempeña la proteína estructural VP2 en la inmunidad protectora mediada por células T y B. Sin embargo, como ya hemos indicado, no se conocen los mecanismos básicos que operan en los animales vacunados para conferirles protección, siendo muy escasos los estudios realizados.

Las **citoquinas** juegan un papel central en la naturaleza y regulación de la inmunidad protectora (36), así como en otros aspectos relacionados con la vacunación como el tráfico de células presentadoras de antígeno (CPA) entre el sitio de vacunación y los tejidos linfoides secundarios locales (37), sirviendo como adyuvantes efectivos, en distintos tipos de vacunas, de la respuesta celular y humoral frente a una amplia variedad de antígenos. Esta actividad adyuvante se traduce en una disminución de la diseminación de ciertos virus, así como en un incremento de los títulos de anticuerpos específicos y de la repuesta inmune protectora directa frente a ciertos antígenos (38).

Las citoquinas son polipéptidos cuya actividad funcional se basa en su elevada afinidad de interacción con receptores específicos localizados sobre poblaciones de células blanco. Esta interacción depende tanto de la secuencia primaria de aminoácidos como de la estructura terciaria de la citoquina en cuestión, de modo que una alteración tanto de la secuencia de aminoácidos como de la estructura terciaria puede tener consecuencias en la actividad de las citoquinas que, generalmente, se muestran bastante estables (38). Además, al contrario que otros adyuvantes que provocan dolor, inflamación y daño tisular en el lugar de inoculación, además de reacciones sistémicas como fiebre y retención en las canales de sustancias tóxicas (39), las citoquinas se presentan como adyuvantes menos agresivos. Gracias a la clonación de un gran número de citoquinas ovinas (la mayoría expresadas como proteínas recombinantes), y gracias a su estabilidad, seguridad y coste asequible, cada vez ha sido más frecuente su uso como adyuvantes en distintas estrategias de vacunación, donde se han demostrado los beneficios de su uso. Sin embargo, los mecanismos de protección permanecen sin aclarar. Para que el potencial de dichas moléculas sea optimizado se hace necesario, por tanto, conocer en profundidad dichos mecanismos inmunitarios efectores tanto en animales enfermos como vacunados. Dichos principios son aplicables al desarrollo de nuevas vacunas frente a los distintos serotipos del vLA. Así, una vez que se haya establecido el papel de ciertas citoquinas específicas en la respuesta del hospedador (ovejas, cabras, vacas y rumiantes salvajes) frente a un patógeno específico (distintos serotipos del vLA), será posible el diseño de terapias protectoras frente a dichos serotipos basadas en el empleo de citoquinas, o bien medidas preventivas para limitar el daño tisular inmunomediado.

Además, una vez que se establezca, *in vivo*, si la repuesta inmune protectora frente a los principales serotipos del vLA que pueden afectar a nuestra cabaña ganadera se debe al predominio de una respuesta inmune celular (Th1 en la que participan principalmente el IFN $\gamma$ , la IL-2 y la IL-12) o humoral (favorecida por la respuesta inmune celular Th2 en la que predomina la producción de IL-4 e IL-10), así como el papel de las distintas citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) en las lesiones y reacciones tanto de tipo local (edemas, hemorragias, necrosis musculares) como sistémico (fiebre, leucopenia, trombocito-



penia, alteración de los factores de coagulación), el uso selectivo de ciertas citoquinas podrá favorecer el incremento de la eficiencia de las vacunas aplicadas, objetivos que deben ser propuestos en los proyectos de investigación encaminados en esta línea.

Las **células dendríticas (CDs)** desempeñan un papel crucial en la generación de una respuesta inmune protectora tanto en enfermedades infecciosas como en procesos tumorales. Estas células son el blanco de diferentes virus, que las utilizan como mecanismo de difusión orgánica dado el potencial migratorio que poseen. Sin embargo, las CDs también cuentan con receptores que identifican proteínas o ácido nucleico vírico que les permiten iniciar una respuesta inmune innata antivírica (40), esencial para limitar la diseminación de ciertos virus. Además, las CDs producen citoquinas inflamatorias e IFNs en respuesta a la acción de los virus (41,42).

Dependiendo de la expresión de diferentes marcadores en su superficie, podemos distinguir distintas subpoblaciones de CDs, tanto circulantes en sangre y linfa como residentes en tejidos, las cuales se localizan a nivel intersticial, epitelial y en la piel. Así, las células dendríticas convencionales se dividen, a su vez, en células dendríticas inmaduras o indiferenciadas, células dendríticas mieloides y células dendríticas plasmocitoides (también conocidas como linfoides), las cuales se muestran como las principales productoras de IFN tipo I frente a virus (43). Tanto el fenotipo como la función de las CDs están regulados por un conjunto de mediadores solubles (citoquinas) que pueden igualmente promover la inmunidad o favorecer un estado de tolerancia. La principal función de las CDs radica en llevar a cabo “procesos de presentación de antígenos (propios o exógenos)”, desempeñando un papel fundamental de unión entre la respuesta inmune innata y adaptativa. Originadas en la médula ósea, las CDs inmaduras circulantes penetran en los tejidos en respuesta a citoquinas quimiotácticas inflamatorias. Al entrar en contacto con el antígeno extraño, las CDs sufren una serie de cambios morfológicos, así como una modificación de los receptores de superficie. Tras la captación y procesamiento del antígeno, las CDs migran a los nódulos linfáticos regionales, donde presentan el antígeno procesado a los linfocitos T, que generarán distintos tipos de respuestas (efectora, memoria, tolerancia) (44). Una vez finalizada la expresión de antígeno, estas células entran en apoptosis, posiblemente con el fin de regular una disminución de la intensidad de la respuesta inmune desarrollada (45). Así, en presencia de citoquinas antiinflamatorias (p.e. IL-10), las CDs permanecen inmaduras (con ausencia de expresión de moléculas coestimuladoras), dando lugar a una tolerancia inmunológica mediante la no activación de linfocitos T. Sin embargo, en presencia de citoquinas proinflamatorias (p.e. IL-1, TNF, IL-12), las CDs maduran y expresan ciertas moléculas coestimuladoras que provocarán la activación de las células T y la inducción de inmunidad (46).

Por tanto, el conocimiento de las señales (especialmente citoquinas) necesarias para convertir una CDs en células presentadoras de antígeno capaces de inducir una respuesta

de células T apropiada, se considera un eje primordial para el desarrollo de nuevas vacunas frente al vLA. Se tienen pocos datos acerca de cómo la infección de las CDs por el vLA afecta a sus funciones y, en consecuencia, a la respuesta inmune, siendo necesario establecer una correlación entre los perfiles de citoquinas inducidos durante la infección y su relación con la estimulación o no de estas células. Este aspecto de la patogenia del vLA resulta crucial si se pretende potenciar, de forma eficiente, una respuesta inmune protectora mediante la aplicación de nuevos inmunomoduladores en la vacunas.

Tanto las células dendríticas foliculares como reticulares de distintos órganos linfoides en ovejas y cabras han mostrado signos de infección *in vivo* durante infecciones por el vLA (47). Trabajos *in vitro* recientes han demostrado que las células dendríticas convencionales (CDs) son células blanco primarias del vLA y que éstas contribuyen a la diseminación primaria del virus desde la piel a los nódulos linfáticos regionales. Dicho transporte tiene lugar justo antes de la aparición de la viremia y de los signos clínicos. En los nódulos linfáticos regionales, las CDs sufren la replicación de distintos serotipos del vLA. Además, parece que el virus favorece la llegada masiva de CDs desde la piel a los nódulos. Sin embargo, las funciones de las CDs no parecen verse afectadas. El vLA parece inducir en las CDs un incremento de moléculas de superficie coestimuladoras (CD80 y CD86) y la síntesis de citoquinas involucradas en la respuesta inflamatoria e inmune (IL-12, IL-1 $\beta$  e IL-6), aunque contribuyendo en mucha menor medida a la instauración de procesos inflamatorios que las células endoteliales. Además, las CDs infectadas parecen capaces de estimular la proliferación de los linfocitos T CD4 y CD8, así como la producción de IFN $\gamma$  e IL-10. Todo ello pone de manifiesto una adaptación óptima del virus a estas células, lo que permitirá su diseminación primaria (48).

Trabajos *in vitro* demostraron, en ovino, que las células dendríticas aferentes de los nódulos linfoides, las cuales tienen su origen en las células dendríticas migratorias de la dermis, prolongaron su vida tras la administración de Factor estimulador de colonias recombinante ovino (rOvGM-CSF) y TNF $\alpha$  recombinante ovino (rOvTNF $\alpha$ ) de forma conjunta, siendo mayor el efecto que con la administración única de rOvTNF $\alpha$  (38,46).

Por tanto, la generación de una respuesta inmune efectiva se basa en una organización especializada de los órganos linfoides secundarios, apoyada en una red tridimensional de **células estromales y fibras reticulares**, la cual interactúa de una forma dinámica. Así, estas células estromales aportan importantes indicadores funcionales, como quimoquinas y citoquinas, con influencia sobre el medio ambiente y la supervivencia de las células inmunes. Esta red estromal está constituida por las células reticulares (CR), en las áreas T, y las células dendríticas foliculares (CDf) en los folículos linfoides (49), habiendo sido identificadas ambas poblaciones como células con signos de infección en el transcurso de la LA (47).

Las CDf, de origen indeterminado, mesenquimal o desarrolladas a partir de células precursoras migratorias (50), tienen como principal función la captación y presentación de antígenos en forma de inmunocomplejos a los linfocitos B (51,52), aunque el papel de estos inmunocomplejos en la respuesta de células B, en la funcionalidad del centro germinal, en la memoria inmune y en la inmunidad humoral prolongada no está determinada *in vivo*, existiendo datos contradictorios (53,54). Un área poco estudiada, y donde se han obtenido recientemente los primeros resultados, es la respuesta de las CDf a las citoquinas y a estímulos de la respuesta inmune innata, donde las CDf ajustarían su función (55).

Por tanto, el estudio de la **Respuesta inmune celular y humoral en animales infectados con distintos serotipo del vLA** (evolución de las poblaciones de células inmunocompetentes en el transcurso de la enfermedad, tanto en órganos linfoides como sangre; mediadores implicados en la regulación de la respuesta inmune a fin de establecer el tipo de respuesta inmune Th1 o Th2 predominante; estudio de los mecanismos que regulan los procesos de presentación de antígeno, activación de la respuesta celular y desarrollo de la respuesta humoral protectora) y en **animales vacunados** (evolución de células inmunocompetentes; mediadores químicos involucrados; mecanismos de regulación de la respuesta protectora; mecanismos patogénicos responsables de las reacciones adversas frente a la vacunación; aplicación de inmunomoduladores/adyuvantes en las vacunas para mejorar la protección y disminuir las reacciones adversas), son aspecto de la LA en los que se debe profundizar.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) a través del proyecto AGL2009-13174-C02-01. Pedro José Sánchez Cordón es beneficiario de un contrato dentro del "Programa Ramón y Cajal" del Ministerio de Ciencia e Innovación, (España).

## REFERENCIAS

1. Tabachnick WJ, Robertson MA, Murphy KE. Culicoides variipennis and bluetongue disease. Research on arthropod-borne animal diseases for control and prevention in the year 2000. Ann N Y Acad Sci. (1996) 791:219-26. Review
2. Savini G, Maclachlan NJ, Sánchez-Vizcaíno JM, Zientara S. Vaccines against bluetongue in Europe. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. (2008) 31(2-3):101-20.
3. MAPA. Report of the efficacy test performed in Spain with different commercially available vaccine against BTV4 in cattle and sheep. MAPA report 2006.
4. Bhanuprakash V, Indrani BK, Hosamani M, Balamurugan V, Singh RK. Bluetongue vaccines: the past, present and future. Expert Rev Vaccines. (2009) 8(2):191-204. Review.

5. Savini G, Hamers C, Conte A, Migliaccio P, Bonfini B, Teodori L, Di Ventura M, Hudelet P, Schumacher C, Caporale V. Assessment of efficacy of a bivalent BTV-2 and BTV-4 inactivated vaccine by vaccination and challenge in cattle. *Vet Microbiol.* (2009) 133(1-2):1-8.
6. Schwartz-Cornil I, Mertens P.P.C., Contreras, V., Hemati, B., Pascale, F., Bréard, E., Mellor, P.S., MacLachlan, N.J., Zientara, S. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet. Res.* (2008) 39: 46.
7. Badiola JJ, Bolea R, Marín B, Garza MC, Sarasa R, Vargas A, Acín C. Estudio de un síndrome neurológico como reacción adversa, asociado a la campaña de vacunación de lengua azul 2008-2009. XXI Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria. Lugo (2009) pp. 54.
8. Plana Durán J. Zulvac®: eficacia e inocuidad. Vacunas monovalentes BTV-1, BTV-8 y vacunas polivalentes BTV-1+8. Jornadas informativas FortDodge Animal Health. Pamplona (2009).
9. Luján L, Pérez M, Salazar E, Álvarez N, Badiola J, Fantova E. Síndrome caquetizante crónico del ovino ¿mito o realidad?. XXI Reunión de la Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria. Lugo (2009) pp. 72.
10. Mellor P.S., Wittmann E.J., Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998-2001, *Vet. J.* (2002) 164:20-37.
11. Mertens P.P.C., Maan S., Samuel A., Attoui H., Orbivirus, Reoviridae, In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (Eds.), *Virus taxonomy*, VIIIth report of the ICTV, Elsevier/Academic press, London, UK, (2004), pp. 466-483.
12. Hofmann MA, Renzullo S, Mader M, Chaignat V, Worwa G, Thuer B. Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerg Infect Dis.* (2008) 14(12):1855-61.
13. Chaignat V, Worwa G, Scherrer N, Hilbe M, Ehrensperger F, Batten C, Cortyen M, Hofmann M, Thuer B. Toggenburg Orbivirus, a new bluetongue virus: initial detection, first observations in field and experimental infection of goats and sheep. *Vet Microbiol.* (2009) 138(1-2):11-9.
14. Saegerman C, Berkvens D, Mellor PS. Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerg Infect Dis.* (2008) 14(4):539-44.
15. Roy, P. Orbivirus structure and assembly. *Virology.* (1996) 216: 1–11.
16. Rodríguez-Sánchez B, Iglesias-Martín I, Martínez-Avilés M, Sánchez-Vizcaíno JM. Orbiviruses in the Mediterranean basin: updated epidemiological situation of Bluetongue and new methods for the detection of BTV serotype 4. *Transbound Emerg Dis.* (2008) 55(5-6):205-14.
17. Roy P. Bluetongue virus proteins, *J. Gen. Virol.* (1992) 73:3051-3064.
18. Tan B.H., Nason E., Staeuber N., Jiang W., Monastyrskaya K., Roy P. RGD tripeptide of bluetongue virus VP7 protein is responsible for core attachment to *Culicoides* cells, *J. Virol.* (2001) 75:3937-3947.
19. Anthony S., Jones H., Darpel K.E., Elliott H., Maan S., Samuel A., et al. A duplex RT-PCR assay for detection of genome segment 7 (VP7 gene) from 24 BTV serotypes, *J. Virol. Methods* (2007) 141:188-197.
20. Bonneau KR., Zhang N., Zhu J., Zhang F., Li Z, Zhang K et al. Sequence comparison of the L2 and S10 genes of bluetongue viruses from United States and the People's Republic of China. *Virus Res.* (1999) 61:153-160.
21. Pritchard LL, Sendow I, Lunt R., Hassan SH., Kattenbelt J., Gould AR., et al. Genetic diversity of Bluetongue viruses in the south east Asia. *Virus Res.* (2004) 101:193-201.
22. Bonneau KR., MacLachlan NJ. Genetic diversification of field strains for bluetongue virus. *Vet. Ital.* (2004) 40: 446-447.
23. Bonneau KR., Mullens BA., MacLachlan NJ. Occurrence of genetic drift and founder effect during quasispecies evolution of the VP2 and NS3/3A genes of bluetongue virus upon passage between sheep and cattle. *J. Virol.* (2001) 75: 8298-8205.

24. Jeggo M.H., Wardley R.C., and Brownlie J. A study of the role of cell-mediated immunity in blue tongue virus infection in sheep, using cellular adoptive transfer techniques. *Immunology* (1984) 52: 403-410.
25. Jeggo MH, Wardley RC, Brownlie J. Importance of ovine cytotoxic T cells in protection against bluetongue virus infection. *Prog Clin Biol Res.* (1985a) 178:477-87.
26. Jeggo MH, Wardley RC. Bluetongue vaccine: cells and/or antibodies. *Vaccine.* (1985b) 3(1):57-8.
27. Roy P, Urakawa T, Van Dijk AA, Erasmus BJ. Recombinant virus vaccine for bluetongue disease in sheep. *J. Virol.* (1990) 64:1998-2003.
28. Lobato Z.L., Coupar B.E., Gray C.P., Lunt R., Andrew M.E., Antibody responses and protective immunity to recombinant vaccinia virus-expressed bluetongue virus antigens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (1997) 59:293-309.
29. Maan S, Maan NS, Samuel AR, Rao S, Attoui H, Mertens PP. Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. *J Gen Virol* (2007) 88:621-630.
30. Erasmus B.J. Bluetongue virus. In: Dinter Z., Morein B., editors. *Virus infections of ruminants.* (1990) Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. pp. 227-237.
31. Berry LJ, Osburn BI, Stott JL, Farver T, Heron B, Patton W. Inactivated bluetongue virus vaccine in lambs: differential serological responses related to breed. *Vet Res Commun.* (1982) 5(3):289-93.
32. Stott JL, Barber TL, Osburn BI. Immunologic response of sheep to inactivated and virulent bluetongue virus. *Am J Vet Res.* (1985) 46(5):1043-9.
33. Jeggo M.H., Gumm I.D., Taylor W.P., Clinical and serological response of sheep to serial challenge with different bluetongue virus types, *Res. Vet. Sci.* (1983) 34:205-211.
34. Takamatsu H, Jeggo MH. Cultivation of bluetongue virus-specific ovine T cells and their cross-reactivity with different serotype viruses. *Immunology.* (1989) 66(2):258-63.
35. Jones LD, Chuma T, Hails R, Williams T, Roy P. The non-structural proteins of bluetongue virus are a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants. *J Gen Virol.*(1996) 77 (Pt 5):997-1003.
36. Romagnani S. Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol Today.* (1992) 13(10):379-81. Review.
37. Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today.* (1992)13(3):93-100. Review.
38. Elhay M, Barcham G, Cameron A, Andrews A, Nash A. Recombinant Ovine Interleukin-1 $\beta$  as an adjuvant for multivalent bacterial vaccines. In: *Cytokines in Veterinary Medicine.* Eds. Schijns VECJ and Horzinek MC. (1997) Cab International.
39. Gupta RK, Relyveld EH, Lindbland EB, Bizzini B, Ben Efraim S, Gupta CK. Adjuvants- a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* (1993) 11: 293-306.
40. Dalod, M., Hamilton, T., Salomon, R., Salazar-Mather, T.P., Henry, S.C., Hamilton, J.D., Biron, C.A. Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J. Exp. Med.* (2003) 197: 885-898.
41. Andoniou, C.E., van Dommelen, S.L., Voigt, V., Andrews, D.M., Brizard, G., Asselin-Paturel, C., Delale, T., Stacey, K.J., Trinchieri, G., Degli-Esposti, M.A. Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. *Nat. Immunol.* (2005) 10: 1011-1019.
42. Eisenächer, K., Steinberg, C., Reindl, W., Krug, A. The role of viral nucleic acid recognition in dendritic cells for innate and adaptive antiviral immunity. *Immunobiology* (2008) 212:701-714.

43. Segura E and Villadangos JA. Antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Curr. Opin. Immunol.* (2009). 21:105-110.
44. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* (2000) 18:767-811. Review.
45. Shortman, K., Liu, Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* (2002) 2:151-161.
46. Capone I, Rizza P, Belardelli F. Dendritic cells as targets and tools in vaccines. In: *Immunopotentiators in Modern Vaccines*. Eds. Virgil Schijns and Derek O'Hagan (2005). Academic Press. pp 17-33.
47. Sánchez-Cordón P.J., B. Rodríguez-Sánchez, M.A. Rialde, V. Molina, M. Pedrera, J.M. Sánchez-Vizcaíno, J.C. Gómez-Villamandos. Immunohistochemical detection of bluetongue virus (BTV) in fixed tissues. *J. Comp. Pathol.* (2010) (en prensa).
48. Hemati B, Contreras V, Urien C, Bonneau M, Takamatsu HH, Mertens PP, Bréard E, Sailleau C, Zientara S, Schwartz-Cornil I. Bluetongue virus targets conventional dendritic cells in skin lymph. *J Virol.* (2009) 83(17):8789-8799.
49. Mueller SN, Ahmed R. Lymphoid stroma in the initiation and control of immune responses. *Immunol Rev.* (2008) 224:284-294. Review. Erratum in: *Immunol Rev.* (2008) Oct; 225:333.
50. Cyster JG, Ansel KM, Reif K, Ekland EH, Imán PL et al. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev.* (2000) 176:181-193.
51. MacLennan IC. Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, (1994)12:117-39.
52. Tew JG, Wu J, Qin D, Helm S, Burton GF, Szakal AK. Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol Rev* (1997) 156:39-52.
53. Haberman, A.M., Shlomchik, M.J. Reassessing the function of immunocomplex retention by follicular dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* (2003) 3:757-64.
54. Kosco-Vilbois, M.H. Are follicular dendritic cells really good for nothing?. *Nat Rev Immunol.* (2003) 3:764-9.
55. Allen, D.C., Cyster, J.G.. Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: Phenotype and function. *Seminars in Immunology* (2008) 20:14-25.





# RIESGO DE LOS SUBPRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL

JOSÉ JUAN RODRÍGUEZ JEREZ<sup>1</sup>

## INTRODUCCIÓN

Los subproductos son los cuerpos enteros o partes de animales o productos de origen animal no destinados a consumo humano, incluidos óvulos, embriones y espermatozoides. Durante muchos años, todos estos restos, que no podían ser consumidos directamente por personas, pasaban a consumo animal.

El objetivo era claro, todos los subproductos, una vez tratados, poseen una composición más que aceptable para otros usos, uno de los más importantes, el consumo por parte de los animales, al fabricar harinas o piensos enriquecidos.

Es importante destacar que el valor nutritivo es importante, así como el poder contaminante de estas sustancias. De hecho, si tenemos en cuenta los miles de millones de canales que se consumen en el mundo, así como que entre el 30% y el 60% de una canal pueden ser subproductos, podemos ver el volumen de sustancias altamente contaminantes que se van a verter al medio. Estos subproductos son sensibles a la contaminación masiva de microorganismos, así como a la dispersión de posibles agentes responsables de zoonosis.

Si a esto unimos que el precio de estos subproductos es muy bajo, podemos comprender que todo estaba a favor de la fabricación y distribución de estos productos para el consumo animal.

---

<sup>1</sup> Observatorio de la Seguridad Alimentaria. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. 08195 Bellaterra (Barcelona). Tel: 935811448. Fax: 935812006. e-mail: josejuan.rodriguez@uab.cat

No obstante, tras la crisis las vacas locas (encefalopatía espongiiforme bovina) y otras encefalopatías transmisibles (EET), se puso en tela de juicio este tipo de prácticas. En consecuencia, se prohíbe su distribución y venta para el consumo de herbívoros. A partir de aquí, el objetivo principal que se pretende lograr es que los subproductos procedentes de animales no aptos para el consumo humano no entren en la cadena alimentaria, además de garantizar un uso seguro de los subproductos y transformados a través de métodos de procesamiento autorizados, sin olvidar el marcar e identificar estos subproductos de forma que se permita su trazabilidad hasta su destino final.

Esto ha creado el gran problema de qué hacer con las harinas de origen animal, de gran poder nutritivo. La solución podría pasar por el consumo cruzado y sólo en algunos casos, como por ejemplo, alimentar aves con harinas de origen porcino y a la inversa, pues son especies filogenéticamente alejadas. Todo esto es consecuencia de las crisis alimentarias de los noventa, que ha puesto de manifiesto la importancia de los subproductos en la propagación de posibles zoonosis.

## CLASIFICACIÓN DE LOS SUBPRODUCTOS

Todo subproducto se deberá clasificar, según su riesgo, en tres categorías (1, 2 y 3), identificarse correctamente y transportarse a un establecimiento autorizado según su categoría, donde se eliminará o valorará.

### **Categoría 1**

Esta categoría está relacionada con la existencia de materiales infecciosos de EEB. Por ello, en esta tendremos que considera a cualquier parte de los animales que hayan sido analizados para EEB y hayan dado un resultado positivo. No obstante, también hay que incluir a los MER, que aún cuando no provengan de animales positivos a la prueba diagnóstica, son susceptibles de estar contaminados con estos priones. Además, se han incluido en esta categoría todos aquellos productos contaminados con sustancias prohibidas o con contaminantes medioambientales.

A estos hay que añadir las aguas residuales de las plantas de transformación de los subproductos incluidos en esta categoría, puesto que parte de los contaminantes van a pasar al agua y de aquí podrían llegar al medio ambiente, con el consiguiente peligro de diseminación.

Otros residuos incluidos en esta categoría son los residuos de cocina de medios de transporte internacional. Esta inclusión es importante, especialmente teniendo

en cuenta la gran cantidad de personas y mercancías que se distribuyen por todo el mundo en horas. Por tanto, si hay un problema en algún país del mundo, podríamos ver como los contaminantes de los alimentos que se encuentren en cualquier zona, puede llegar a otro extremo del mundo en menos de 24 horas. Ese residuo ha de ser apartado de la distribución e inactivado por procedimientos que garanticen su inocuidad para las personas, animales y el medio ambiente.

Finalmente y, al igual que en todas las demás categorías, la mezcla de cualquier material de esta categoría con cualquiera de las otras, implica la clasificación de ese material como de la categoría 1.

Todos estos subproductos no pueden pasar a consumo de ninguna manera, por lo que el destino es el de la incineración o co-incineración, ya que asegura su eliminación y puede ser un uso industrial en la obtención de hormigones o materiales de construcción.

Además, puede ser tratado con un tratamiento específico que asegure la eliminación de los priones, en aquellos casos en lo que provengan de animales positivos a la prueba de EEB.

En algunos casos se podría hacer una transformación con tratamiento específico, con una posterior inhumación en un vertedero autorizado. Este tipo de tratamiento comporta un riesgo mayor de cara a la contaminación medioambiental, por lo que en ningún caso puede ser aplicado si el animal es sospechoso de EET o sacrificado en campaña de erradicación de .

En el caso de que se trate de residuos de cocina, sin que haya un especial peligro de contaminación, se puede realizar una inhumación a vertedero autorizado.

Cualquier otro método puede ser aplicado, siempre que existan evidencias científicas de su eficacia y, en consonancia, sea aceptado por el comité científico correspondiente de la EFSA.

## **Categoría 2**

En esta categoría nos encontramos con los residuos procedentes de la producción animal, con subproductos no aprovechables o altamente contaminados y sustancias relacionadas con tratamientos veterinarios.

Es por este motivo que nos encontraremos con el estiércol y el contenido del aparato digestivo, las aguas residuales que no sean de la categoría 1 y los residuos de medicamentos veterinarios y contaminantes.

Además, para asegurar la inactivación de todos los subproductos, se incluyen en esta categoría a los productos importados procedentes de países de fuera la UE, que no cumplan con los requisitos establecidos por nuestra legislación, así como los animales no sacrificados para el consumo humano.

Como en el resto de categorías, cualquier mezcla de los subproductos de esta categoría con la inferior, implica su clasificación como categoría 2.

Como en el caso de la categoría 1, estos subproductos pueden tener algunos usos industriales o incluso para alimentación de algunos animales.

Para su tratamiento, la incineración será aceptable, al ser considerado actualmente como uno de los tratamientos más seguros.

La transformación con un tratamiento específico que elimine la causa de su clasificación en esta categoría puede ser aceptable, especialmente si se van a obtener grasas o sebos u otras sustancias para los abonos u otros usos técnicos, siempre que no vuelvan a poder ser empleadas en su consumo por parte del ser humano. Es decir, no pueden ser empleados para la fabricación de cosméticos, fármacos y productos sanitarios.

### **Categoría 3**

En esta categoría se incluyen aquellos subproductos que no van a suponer un peligro para la salud ni de personas ni de animales. En realidad son restos que provienen de animales sin enfermedades transmisibles, bien porque se hayan degradado o alterado, o por cualquier otra causa.

#### **TRATAMIENTOS ACEPTABLES DE LOS SUBPRODUCTOS**

Los tratamientos específicos admitidos son cinco métodos de transformación, basados en la reducción de partículas del material y una combinación de tiempo, temperatura y presión:

1. Para partículas de menos de 150 mm de diámetro, procedente de animales contaminados con priones infecciosos o, que hayan podido contaminar-

se, han de ser tratados por calor húmedo a una temperatura superior a 133°C, lo que significa que ha de llegar a una presión de 3bares, durante un mínimo de 20 minutos. Este tratamiento garantiza la eliminación de los agentes responsables de la EEB.

2. Para partículas de tamaño comprendido entre 30 mm y 150mm de diámetro, procedentes de animales no contaminados con priones infecciosos, se han de dar un tratamiento equivalente a 120°C durante 50 minutos. Por tanto serían también aceptables tratamientos superiores a 100°C durante 125 minutos o, superiores a 110°C durante 120 minutos.
3. Partículas de menos de 30mm. El tratamiento de elección será de más de 100°C durante 95 minutos o equivalente, lo que implica tratamientos a temperaturas superiores a 110°C ó 120°C durante 35 y 13 minutos respectivamente.
4. En algunos casos, para partículas de menos de 30mm, puede reducirse el tiempo de tratamiento a temperaturas superiores a 100°C, 110°C o 130°C durante 16, 13 ó 3 minutos respectivamente.
5. Finalmente, cuando las partículas sean inferiores a 20mm, se deberá calentar el producto hasta la coagulación del mismo, para posteriormente presar para separar la grasa del agua y de la fracción proteica. El tratamiento se puede realizar entonces a temperaturas inferiores, puesto que se podrá tratar a 80°C ó 100°C durante 120 ó 60 minutos.

Cada uno de estos tratamientos han de ser aplicados según la clasificación del subproducto y la finalidad última es la de conseguir que estos residuos no puedan implicar ningún riesgo para la salud.

Además de estos tratamientos, existen otros subproductos que proceden de la acuicultura. Para estos, el tamaño de partícula ha de ser inferior a 50 mm, con tratamiento térmico superior a 90°C durante 60 minutos. Antes del tratamiento térmico, hace falta mezclar con ácido fórmico para conseguir un  $\text{pH} \leq 4$  y almacenarse durante un mínimo de 24 horas.

## SITUACIÓN ACTUAL

La evolución seguida por la encefalopatía espongiiforme bovina en España desde que en noviembre de 2000 se dio a conocer el primer caso en Galicia guarda un patrón similar al registrado en el Reino Unido para estos primeros años, en los que se

aprecia una evolución ascendente hasta que se alcanza el máximo y, posteriormente, se evidencia una disminución progresiva.

De acuerdo con el caso británico y de otros países de la UE, el inicio en el descenso de los casos de EEB era esperable a los 5 años de los primeros casos detectados, mientras que la reducción a cifras anecdóticas es esperable a partir de los 10 años de evolución. En el caso de nuestro país, el cambio de pendiente se produjo a los 4 años, mientras que a fecha de hoy, después de 7 años de la epidemia, el descenso es más que apreciable. Los datos, como era esperable después de apreciar la disminución del 2004, evidencian un cierto control en la enfermedad.

Si la evolución apreciable continúa como hasta ahora, el volumen total de animales infectados será relativamente bajo, lo que confirmaría que las medidas adoptadas, especialmente el control de los MER y la eliminación de las harinas animales en la alimentación de herbívoros, fueron acertadas. Al mismo tiempo, el sacrificio masivo de animales en una primera etapa, ha llevado a acortar el tiempo necesario para apreciar una disminución en los casos animales.

La aparición de casos positivos guarda relación con la edad de la cabaña y, especialmente, con el número de vacas lecheras. En nuestro país la mayor parte de la producción de carne se basa en terneros (menos de 12 meses), mientras que los animales lecheros tienen mayor edad. La enfermedad, por otra parte, se observa en animales de más de 30 meses. Por todo ello, la probabilidad de apreciar animales enfermos será superior en zonas donde predomine la producción de leche.

Tras el primer año de evolución de la enfermedad, en el año 2000, llamó la atención la situación de Cantabria, ya que con una cabaña importante sólo se detectaba en noviembre de 2001 un único positivo y tres en el total de ese año. A finales de 2006 acumulaba 22 casos y, en la actualidad 23. Si consideramos el número de casos positivos acumulados, según la diferente capacidad productiva de los animales, más del 60% son vacas lecheras y cerca del 25% con capacidad mixta (leche y carne). En conjunto supondría más del 85% del total. La distribución del censo ganadero no es uniforme en las diferentes comunidades autónomas, como tampoco lo es el número de animales mayores de 24 meses. Castilla y León, Galicia y a cierta distancia Andalucía, son las que mayor cifras acumulan. Sin embargo, para un total de 709 casos acumulados en nuestro país hasta mediados de 2007, el mayor número de positivos se da en Galicia.

El estudio de la cabaña debe complementarse con otro parámetro importante como es la demanda de los consumidores. Pese a que ésta se ha recuperado, el nú-

mero de casos no se ha disparado como se esperaba. Una explicación posible sería el sacrificio masivo de los animales de mayor edad, lo que habría comportado eliminar la mayor parte de los afectados. En términos de salud pública, este tipo de actuaciones comportan una notable reducción del riesgo, ya que se asegura que ningún animal enfermo llega al consumidor.

Las comunidades con mayores prevalencias del problema continúan siendo Baleares (132 animales analizados para obtener un caso positivo), Asturias (347 análisis/caso) y Aragón (357 análisis/caso). A estas comunidades siguen Cataluña, Navarra, Galicia y Castilla y León, todas ellas con menos de 1.000 análisis/caso, situación que se mantiene similar desde el inicio de la crisis. Estos resultados muestran las comunidades con una mayor prevalencia de la EEB y, conforme avanza el tiempo, las diferentes comunidades se van agrupando en aquellas que tienen menos de 1.000 análisis por caso y aquellas con más de 1.000 análisis por caso.

El número de análisis medio para obtener un positivo, a escala nacional, está entorno a 753 casos por análisis. Debido a que estamos entre el sexto y el séptimo año de evolución, va desapareciendo el efecto reductor artificial que tuvo el sacrificio masivo de animales sospechosos en los primeros meses de la enfermedad y que esta sea la cifra aproximada que marque la situación media en nuestro país.

## RIESGO DEL CONSUMO DE HARINAS DE ORIGEN ANIMAL

Este fue uno de los debates más importantes cuando se inició la crisis y donde radicó el problema de desconfianza de los consumidores hacia la carne. Durante mucho tiempo era conocido que los subproductos de origen animal eran utilizados en la producción de carne y leche, puesto que suponía un fuente muy interesante de proteína a unos precios aceptables.

Sin embargo, aún cuando fuera algo generalizado en muchas áreas geográficas, siempre fue negado en nuestro país. Eso llevó a presentar al ganado vacuno como caníbales, inducidos a ello por el ansia desmedida de ganar dinero de la industria alimentaria. La consecuencia fue clara, se hundió el consumo de carne en nuestro país y todo el sector del vacuno se vio seriamente afectado. Ante esta situación de crisis, se legisló en la línea de controlar la diseminación de los priones infecciosos, mediante la limitación del consumo de este tipo de subproductos.

Sin embargo, el problema no creo que esté básicamente en ese punto. Ante la pregunta de si las harinas de origen animal son peligrosas para la salud de las personas



o animales, la respuesta no es muy compleja. Desde el punto de vista de la higiene de los alimentos, o de la seguridad alimentaria, un subproducto no podría ser utilizado si previamente no se han eliminado todos aquellos contaminantes que puedan dar lugar a un problema de sanidad animal o de salud pública. Por ello, un subproducto podría ser apto para el consumo animal si previamente podemos garantizar que ha sido completa y satisfactoriamente inactivado. Si se sigue este principio, entonces el subproducto es seguro.

Es evidente que cuando hablamos en el sentido de que damos carne a una vaca, resulta esperpéntico, puesto que esto no es posible. En realidad no se le da un filete, sino una harina que forma parte del pienso de engorde o de producción. No podemos olvidar que la presión productiva es importantes en los animales que se encuentran en explotaciones intensivas. Normalmente las producciones son ricas en proteína, que se centran en una exigencia para que un animal llegue a “fabricar” o “ensamblar” grandes cantidades de proteína al día. En estos casos no se puede conseguir con hierba del campo, por lo que ha de ser suplementada de forma regular.

Llegados a este punto, el aporte de proteína ha de ser a partir de una fuente de calidad, ya sea de origen animal, actualmente prohibido, o vegetal, basado esencialmente en el consumo de harina de soja.

Por tanto, el problema no es la harina, sino la forma en como se trata.

## OTRAS ZOONOSIS

El problema de los subproductos no está ligado exclusivamente a la EEB o a las EET. En realidad hay otros peligros que también han de llamar nuestra atención. Entre ellos, los problemas de tuberculosis y brucelosis como enfermedades clásicas, pero sin olvidar otros como *Salmonella* o *Campylobacter* entre los procesos zoonóticos o las enfermedades víricas de transmisión entre animales, como la fiebre aftosa, gripe aviar, pestes, o enfermedades bacterianas.

A todo esto hay que añadir los residuos de medicamentos o de determinados contaminantes químicos.

Todo ello ha de conformar una serie de riesgos que requieren seguimientos específicos. Así, en el caso de las enfermedades con un origen microbiano, puede ser suficiente un tratamiento por calor para conseguir su inactivación, pero en el caso de los contaminantes químicos es posible que condicione completamente su uso.

Todo esto conforma una serie de peligros que nos afecta en cuanto a la prevención del riesgo de transmisión de esos agentes.

### CONTAMINACIÓN A PARTIR DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Deberemos considerar como diferentes aquellos que proceden de cría en granjas o de acuicultura. Estos animales se encuentran en un área relativamente restringida, todos ellos consumen piensos como alimento y reciben el correspondiente tratamiento tras la aparición de una enfermedad. Este sistema se ha generalizado como la mejor manera de producir carne, pescado, huevos y leche a unos precios razonables, y se realiza controlando todos aquellos parámetros que pueden influir en la producción, de acuerdo con criterios concretos:

1. Mayor cantidad posible
2. Mayor calidad posible
3. En el menor tiempo posible
4. Al mejor precio posible

De hecho, se ha conseguido que alimentos prohibitivos hace años, como la carne de pollo e incluso la misma leche, estén al alcance de cualquier bolsillo.

El primer riesgo que la cría intensiva presenta está unido a la calidad, composición y materias primas empleadas en la fabricación de los piensos. No hay que olvidar que algunos de los problemas que más preocupan hoy en día, como el mal de las vacas locas o la misma salmonelosis, pueden tener su origen en la alimentación animal. Una alimentación del animal deficiente o contaminada, podrá manifestarse en los alimentos que produzca, siendo éstos de baja calidad o contaminados. El control de calidad de los piensos y la verificación de que sean seguros, es un paso principal para garantizar su seguridad.

El segundo riesgo, aunque no por ello menos importante, es el empleo de medicamentos de uso veterinario para el tratamiento de las diferentes enfermedades que sufren los animales. Estos tratamientos, necesarios, han de incluir un periodo durante el cual, el organismo del animal elimina los residuos. Si no se tiene en cuenta, quedarán residuos en las carnes, leches o huevos, elementos que posteriormente pueden pasar al organismo de los consumidores finales. Esta contaminación entraña un peligro puesto que conserva su capacidad de actuar de forma farmacológica en el hombre. Es especialmente importante en el caso de los antibióticos, pues implican que los microorganismos que conviven con nosotros se acostumbren a ellos, e incluso

se adapten a ellos, lo que puede generar antibiorresistencias, o lo que es lo mismo, el microorganismo no se ve afectado por los antibióticos, y el tratamiento es ineficaz. La consecuencia es que si sufrimos alguna enfermedad y nos recetan un antibiótico que era eficaz tiempo atrás, ahora el microorganismo continuará actuando y la infección puede agravarse de forma considerable. En estos casos el peligro es elevado y el riesgo para la salud de los consumidores muy importante.

Hay que hacer un especial hincapié en las carnes. Es el producto crudo que requiere unos controles más exhaustivos, ya que los animales padecen enfermedades que pueden transmitir a las personas. Pero todas las carnes son controladas en la inspección veterinaria que se realiza en los mataderos, y si ésta es correcta, hay que aceptar en la teoría que los animales enfermos son retirados del sistema de distribución.

En la práctica esto no es real. En la inspección veterinaria visual se consigue poner de manifiesto las enfermedades que dejan lesiones en los animales, pero no así los problemas relacionados con animales portadores de diversos microorganismos. Esto implica que la inspección necesita, además, herramientas que permita poner de manifiesto contaminaciones masivas de microorganismos e incluso de patógenos concretos. Más aún cuando el resultado de un decomiso implica que ese material pasa a ser un subproducto, mientras que si pasa a consumo nos encontramos con un alimento. La diferencia en la clasificación depende entonces de la inspección, y por tanto, la formación y cualificación de los inspectores es un paso previo principal, más importante incluso que el propio sistema de higienización.

Sin embargo, y aún cuando los controles sean adecuados, el mayor nivel de contaminación se produce en el matadero. Las carnes pueden ser contaminadas principalmente por los intestinos y la piel, pero no sólo de estas fuentes. También las manos de los manipuladores, las superficies, los materiales de trabajo (cuchillos, guantes, etc.) posibilitan la contaminación, y además, es probable que se produzca la multiplicación de estos microorganismos.

Como medida eficaz de prevención, es necesario mantener una buena temperatura de refrigeración en el núcleo de la carne y un adecuado nivel de acidez de la misma. Una temperatura deficiente, superior a los 4°C, permite la proliferación bacteriana y el aumento de microorganismos.

## LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

Lo que ha de pretender es la eliminación de la suciedad, es decir, la eliminación de los residuos macroscópicos. Para ello, habría que definir previamente lo que es la suciedad en un sentido amplio. La suciedad, entonces, es la materia que se encuentra fuera de lugar. Esta materia, podrá ser de diferentes orígenes y de diferente composición. No será lo mismo la composición de la materia fecal, que la de los residuos minerales procedentes del agua, que los restos aportados por el aire y las personas.

Esta suciedad, además, puede poseer en sí misma una elevada contaminación bacteriana, como es el caso de la materia fecal e incluso muchos de los subproductos y aguas residuales.

En todo caso, los microorganismos van a llegar a las superficies y van a desarrollar un sistema de adherencia a las mismas, lo que les va a garantizar su anclaje y su posible multiplicación, aún cuando se eliminen los restos visibles. Este sistema de adherencia se denomina biofilm.

El biofilm es un grupo de bacterias que producen unas excrecencias, a modo de microfilamentos, con una elevada capacidad adherente. Estas excrecencias permiten que los microorganismos se agrupen en zonas muy limitadas, más seguras, y al mismo tiempo, que se unan fuertemente a un soporte sólido que les va a proporcionar estabilidad, nutrientes y espacio. Estos biofilms son polisacáridos o glicoproteínas, lo que debería ser tenido en cuenta por los fabricantes de limpiadores y desinfectantes en el diseño de sus productos, ya que deberían incorporar sustancias que pudieran solubilizar estas moléculas.

Una vez se ha formado el biofilm, pueden adherirse a él nuevos microorganismos provenientes de la multiplicación celular de los primeros, u otros que caigan en esta matriz, lo que les convierte en verdades reservorios de la contaminación microbiana. Si con la limpieza se consiguen eliminar los restos macroscópicos, puede que queden los biofilms, con lo que se hace imprescindible una adecuada desinfección. Como ejemplo, hay que señalar que el olor desagradable que se produce en algunas áreas de trabajo, en los que aparentemente hay una adecuada limpieza, es debido a estos aglomerados bacterianos.

Una característica importante de estos biofilms es que van a crecer con el tiempo, pudiendo ser detectados entonces por la aparición de viscosidad en las superficies y por reaccionar con las mismas, deteriorándolas. Para que comience a formarse un biofilm, la suciedad y los microorganismos han de tener un contacto físico, para lo que

parece necesario la presencia de flagelos en los microorganismos. Posteriormente ha de transcurrir un tiempo suficiente para que las bacterias se multipliquen y formen un aglomerado microscópico. Por tanto, si se produce una limpieza adecuada en breve tiempo, no existirá el factor tiempo para la multiplicación, siendo entonces esencial que el producto empleado tenga una buena capacidad de disolución. Esta limpieza adecuada debe incluir un frotado intenso, ya que la mezcla de un buen producto junto con el movimiento mecánico y la presión, aceleran la solubilización del biofilm.

Hay que tener presente que la suciedad puede ser de diferente naturaleza y composición. La facilidad de eliminación de la suciedad radica en lo fácil que resulta disolverla. Al fin y al cabo, siempre utilizamos agua para limpiar, debiendo conseguir disolver la suciedad en este agua. Consecuentemente disolver restos de carbohidratos será relativamente sencillo por su elevada hidrofiliidad, al igual que muchos minerales. Sin embargo, mucho más difícil será para las grasas (insolubles en agua y que además necesitan disolventes aniónicos o no iónicos alcalinos) y las proteínas (disolventes alcalinos). Estas últimas, además, si se utiliza calor para la limpieza se desnaturalizan, siendo muy complicada su redisolución. En estos casos es imprescindible el empleo de solventes a pH alcalino, que aseguren su separación y arrastre.

Como podemos ver, en la mayor parte de los casos son necesarios disolventes que actúen a pH alcalino. Un producto con un pH ácido puede ayudar a disolver las incrustaciones de calcio y otros minerales, normalmente asociados al agua y que se acumulan en superficies por secado del agua potable; pero difícilmente podrá arrastrar la suciedad más consistente y persistente.

Hay que resaltar que muchos microorganismos sobreviven mejor en presencia de grasa, tolerando mejor la acción de desinfectantes. La adición de un tensoactivo facilitará el proceso de limpieza, sobre todo porque podrá permitir la eliminación de lípidos, sin necesidad de alcalinizar el producto. Sin embargo, los depósitos de proteínas serán más complicados de eliminar, sobre todo a pH ácido.

La desinfección de las superficies “duras” es un objetivo fundamental si se desea mantener unas buenas condiciones higiénicas. Como hemos comentado anteriormente, para que se produzca una desinfección efectiva, es necesario el empleo de sistemas que permitan la eliminación y actuación del producto contra la formación de biofilms.

Además, el proceso de desinfección se verá afectado de una forma importante en función de las condiciones de aplicación de los desinfectantes químicos (tiempo de contacto, concentración, temperatura y pH), de las características de las superficies (composición química, carga superficial, hidrofobicidad y rugosidad) y del tipo de

microorganismo contaminante. Así, Estos mismos autores resaltan que la desinfección del PVC no tratado es imposible, puesto que posee una estructura esponjiforme, que impide el acceso de los desinfectantes.

El proceso de adhesión comienza con la adsorción o depósito de una capa de acondicionamiento en la superficie del sustrato, creando una tensión superficial que facilite el depósito de los microorganismos. Tras la formación de este sustrato los microorganismos que crecen en él van a poseer una mayor resistencia a las sustancias antibacterianas y al calor.

La siguiente pregunta sería la de saber cuanto tiempo necesita un microorganismo para “pegarse” a una superficie. En estudios recientes se ha demostrado que microorganismos entéricos, que se encuentran en la materia fecal de cualquier persona y/o animal, pueden adherirse a una superficie tras 5 minutos de contacto. Esta adhesión no es pequeña ya que con recuentos de  $6 \log(\text{ufc/g})$ , se fija una cantidad superior a  $3 \log(\text{ufc/cm}^2)$ .

Además, las condiciones de limpieza y desinfección insuficientes aumentan la facilidad con que se forman los biofilms, con el consiguiente riesgo posterior. Especialmente importante es el riesgo de transmisión de algunos virus, ya que una vez incluidos en la matriz del biofilm tienen una elevada persistencia.

Además de las sustancias hay que tener en cuenta los materiales. Muchas superficies poseen oquedades en las que pueden depositarse microorganismos. En estos casos el acceso de los desinfectantes es muy difícil, disminuyendo considerablemente su potencial antimicrobiano.

Si además la superficie a desinfectar está deteriorada, aún será más fácil la colonización bacteriana y mucho más difícil su eliminación.

Por otra parte, se podría decir que muchos microorganismos de riesgo son muy sensibles a las condiciones medioambientales, destruyéndose por desecación. Sin embargo, algunas enterobacterias patógenas son capaces de sobrevivir adheridos a las superficies habituales más de 8 días a  $4^{\circ}\text{C}$  con humedades relativas comprendidas entre un 35% y un 70%.

Estos datos nos llevan a considerar como de especial riesgo, no sólo los microorganismos que puedan existir, sino también su capacidad para adherirse y resistir la acción de los desinfectantes habituales. No obstante, lo comentado anteriormente en desinfección es aplicable fundamentalmente al caso de las bacterias y puede que en cierta medida también para los mohos. Sin embargo, es difícil poder extrapolar el concepto de biofilm para microorganismos del tipo de los virus o los protozoos.

Los virus son partículas que no manifiestan su viabilidad si no infectan a una célula. No van a poder formar un biofilm, aunque pueden verse atrapados por él. En este segundo caso, el virus no se multiplicará, tan solo quedará atrapado en la red polimérica, constituyendo un reservorio de diseminación posterior. El problema en estos microorganismos se reduce a la resistencia específica de cada uno de ellos a los diferentes desinfectantes empleados.

## CONCLUSIONES

Los subproductos forman parte de la producción alimentaria, salvo que por las causas que sean, no puedan pasar a consumo. El problema que tienen estos subproductos es que pueden ser un problema para la salud pública, la sanidad animal o el medio ambiente.

Para reducir el riesgo, es imprescindible la clasificación del subproducto y la aplicación de un tratamiento de inactivación adecuado, aunque al mismo tiempo, se hace necesario aplicar otras medidas de control, especialmente las relacionadas con una correcta limpieza y desinfección de todas las superficies que intervienen en todo el proceso.

## Bibliografía

- Anónimo, 2002. Reglamento CE número 1774/2002, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 3 de octubre de 2002, por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano (DO L 273, de 10 de octubre de 2002). Modificado por última vez por el Reglamento (CE) número 668/2004 de la Comisión (DO L número 112 de 19 de abril de 2004).
- Anónimo, 2005. Decisión de la Comisión de 6 de enero de 2005, por la que se modifica la Decisión 2003/329/CE en cuanto a la prórroga de las medidas transitorias, con arreglo al Reglamento (CE) número 1774/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativas al proceso de tratamiento térmico del estiércol. (DO L 7 de 11 de enero de 2005).
- Buil Monzón S, Navarro Rodríguez C. 2003. Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control en la recogida de sangre higiénica. Eurocarne. 119:1-11.
- Chambers P.G. y Grandin T. 2001. Guidelines for humane handling, transport and slaughter of livestock. FAO – Humane Society International-HIS. RAP Publication 2001/4.
- Dios Blanco A., Eiris Puñal, A., García-Argüelles Suárez C., Piedracoba Díaz A., Rey González A., Serrano Laso J., Sevillano González C. y Soto Pérez G. 2003. Subproductos de origen animal no destinados al consumo humano. Eurocarne. 117:43-47.
- Fernández M. 2003. Nuevas restricciones para los subproductos de origen animal. <http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2003/04/15/5975.php>.
- Hidalgo Moya. 2005. Marco legal de los subproductos animales. [http://www.consumaseguridad.com/web/es/normativa\\_legal/2005/01/24/16335.php](http://www.consumaseguridad.com/web/es/normativa_legal/2005/01/24/16335.php).



- Hsu WY, Simonne A, Jitareerat P. 2006. Fates of seeded *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on selected fresh culinary herbs during refrigerated storage. *J. Food Prot.* 69(8):1997-2001.
- Jang A, Szabo J, Hosni AA, Coughlin M, Bishop PL. 2006. Measurement of chlorine dioxide penetration in dairy process pipe biofilms during disinfection. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72(2):368-376.
- Maukonen, J., Mattila-Sandholm, T., Wirtanen, G. 2000. Metabolic Indicators for assessing bacterial viability in hygiene sampling using cells in suspension and swabbed biofilm. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, 33:225-233.
- Midelet G, Kobilinsky A, Carpentier B. 2006. Construction and analysis of fractional multifactorial designs to study attachment strength and transfer of *Listeria monocytogenes* from pure or mixed biofilms after contact with a solid model food. *Appl Environ Microbiol.* 72(4):2313-2321.
- Moore, G., Griffith, C. 2002. A comparison of surface sampling methods for detecting coliforms on food contact surfaces. *Food Microbiology.* 72: 65-73.
- Ockerman H.W. y Hansen C.L. 1994. Industrialización de subproductos de origen animal. Ed. Acribia. Zaragoza. 387 p.
- Rodríguez Jerez. 2007. Subproductos de origen animal y seguridad alimentaria. <http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2007/04/24/27436.php>.
- SANDACH. 2005. Plan Nacional Integral de Subproductos de origen animal no destinados al consumo humano (SANDACH). Grupo de trabajo sobre mataderos. Rev-3. 21 de abril de 2005. <http://www.sandach.com.es>
- Silva V.D.M. y Silvestre M.P.C. 2003. Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie.* 36(7):709-718.



# ACTUALIZACION EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LAS MENINGOENCEFALITIS ASÉPTICAS DEL PERRO

E. GUTIÉRREZ, B. BLANCO, M. NOVALES, R. LUCENA, E. HERNÁNDEZ, P.J. GINEL

## RESUMEN

Las meningoencefalitis (ME) asépticas son un grupo de enfermedades de carácter inmunomediado que afectan al sistema nervioso central del perro. El diagnóstico presuntivo *ante-mortem* puede establecerse de forma fiable gracias al empleo de técnicas de diagnóstico por imagen avanzadas, en combinación con el estudio de las propiedades del líquido cefalorraquídeo (LCR). Combinando el análisis del LCR y la tomografía computerizada, se obtiene una sensibilidad del 93,75% en la detección de los cambios inflamatorios asociados a las ME asépticas. De acuerdo con nuestros datos, ninguna de nuestras razas autóctonas andaluzas tiene predisposición a padecer ME asépticas, ya que no hemos registrado ningún caso en estas razas en los últimos 5 años. El pronóstico es grave, menos grave cuando los signos clínicos son focales y afectan al telencéfalo y en los casos con una respuesta inicial favorable al tratamiento inmunosupresor. La aparición de focos hipodensos en el parénquima cerebral en la TC y la intensidad de captación del medio de contraste también son factores pronósticos negativos en perros con ME no infecciosas. El ácido micofenólico es un inmunosupresor de uso reciente en animales que parece eficaz en los casos de ME necrotizantes.

---

\* Departamento de Medicina y Cirugía Animal; Facultad de Veterinaria; Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales; 14014 Córdoba.

**Correspondencia:** Dr. Pedro José Ginel Pérez; Profesor Titular del Departamento de Cirugía y Medicina Animal, Facultad de Veterinaria; Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, 14014 Córdoba. Teléfono: 957218713; Fax 957211093, e-mail: pginel@uco.es

## INTRODUCCIÓN

Las meningoencefalitis (ME) asépticas del perro, también llamadas no-infecciosas, son la causa más frecuente de ME en esta especie. Son procesos inflamatorios idiopáticos del sistema nervioso central especialmente frecuentes en razas de pequeño tamaño tan populares como el yorkshire terrier, bulldog francés, caniche, y en general todos los terriers. Este grupo de enfermedades fue descrito por primera vez como "*reticulos*" en 1962 (1), debido al incremento anormal de células del sistema reticuloendotelial, concretamente histiocitos, presentes en los focos lesionales. Más tarde ganó popularidad el término de meningoencefalitis granulomatosas (MEG) propuesto por Braund et al. (1978) (2). Esta denominación es puramente descriptiva de la histopatología del proceso inflamatorio caracterizado por el predominio de células mononucleares, pero con variaciones apreciables asociadas muchas veces con razas concretas. Así, se reconocieron más tarde formas de MEG asociadas a necrosis del tejido nervioso como la ME necrotizante de la raza Pug o Carlino y la leucoencefalitis necrotizante más frecuente en el Yorkshire terrier. A su vez, dentro de las MEG se reconocieron formas localizadas, difusas y oculares. Todos estos procesos tienen síntomas clínicos similares, son de origen no infeccioso y su diagnóstico específico requiere de estudios histopatológicos habitualmente disponibles solo tras la necropsia. Por estos motivos se recomienda emplear el término de ME no infecciosa o aséptica mientras no sea posible un estudio histopatológico (3,4).

## ETIOPATOGENIA

En las ME asépticas las lesiones se localizan de forma predominante en la sustancia blanca, tanto en cerebro como en médula espinal, extendiéndose frecuentemente hacia las leptomeninges, con aparición de manguitos perivasculares compuestos por linfocitos, macrófagos en número variable y células plasmáticas, además de granulomas en parénquima e infiltrados a nivel de leptomeninges. Las lesiones se han caracterizado mediante estudios inmunohistoquímicos como poblaciones compuestas por linfocitos T CD3<sup>+</sup> y en menor medida poblaciones heterogéneas de macrófagos activados que expresan complejo mayor de histocompatibilidad tipo II, lo cual sugiere una hipersensibilidad mediada por linfocitos T o una reacción autoinmune (5).

Se han realizado estudios con PCR para la detección de agentes infecciosos, obteniéndose resultados negativos para agentes primarios conocidos: virus, protozoos y bacterias (6). Con todo, no puede descartarse una posible etiología vírica pues, aunque la sensibilidad de los métodos de análisis es elevada, no se evalúan todos los agentes

víricos potenciales. Se sabe que la lista de agentes neurotrópicos es amplia y no está cubierta en su totalidad por los métodos laboratoriales existentes, aun siendo bastante fiables (7). Mediante el empleo de test IFA y electroforesis, se ha detectado un autoantígeno común en el LCR de perros con ME asépticas necrotizantes: el GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) (8). Además, la mejoría clínica tras la administración de terapias inmunosupresivas con glucocorticoides, ciclosporina o citosina arabinósido también es compatible con un mecanismo patogénico inmunomediado (9), por lo que este tipo de ME canina constituye más probablemente una enfermedad autoinmune.

## SÍNTOMAS

Las ME asepticas son enfermedades agudas y progresivas que representan entre el 5 y el 25% de los procesos que afectan al sistema nervioso central en el perro (10). Es mucho más frecuente en animales de razas pequeñas, especialmente “toys” o “terriers” (11): Yorkshire terrier, West highland white terrier, Jack russel terrier, Chihuahua, Bulldog frances, Shih-tzu, Pinscher miniatura, Maltés y Caniche miniatura. También se ha descrito en razas grandes como Dogo de Burdeos, Collie (12), Dobermann (13) o Labrador (9). La enfermedad se observa en un rango amplio de edades, desde jóvenes menores de un año a perros geriátricos de incluso 12 años, siendo la edad media de presentación de unos 5 años (14).

En Andalucía, las características de presentación de las ME no infecciosas son similares a las descritas en otros países en cuanto a las razas más afectadas, edad de presentación y distribución por sexos. De acuerdo con nuestros datos en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba, ninguna de nuestras razas autóctonas parece tener predisposición a padecer ME no infecciosa, ya que no tenemos ningún caso registrado en los últimos 5 años.

La sintomatología puede variar en función del tipo de ME que padezca el animal. En todas ellas suele ser de aparición aguda-subaguda y de carácter progresivo, empeorando los síntomas en el transcurso de pocos días o semanas. En las MEG, los síntomas varían en función de la localización y extensión de las lesiones, diferenciándose en base a esto tres formas de MEG: focal, multifocal y ocular.

### Forma multifocal

En perros afectados con esta forma de MEG están dañadas más de una estructura funcional del sistema nervioso central y los signos clínicos son difusos. Pueden

indicar diversas localizaciones como nervio óptico, cerebro, cerebelo, tronco del encéfalo, médula espinal o meninges (15). Ocasionalmente puede aparecer fiebre e hiperestesia (10,12).

### **Forma focal**

Existe una lesión única, que por efecto masa, provoca la aparición de los síntomas. Al igual que en la forma anterior, la hiperestesia puede venir asociada a esta segunda forma de presentación. Los signos clínicos variarán en función de su localización. La región del prosencéfalo se afecta con mayor frecuencia y podremos observar convulsiones, cambios de comportamiento, *status* mental alterado, ataxia, torneo, marcha compulsiva o déficit de visión con reflejos pupilares normales. Otras localizaciones posibles son el mesencéfalo y tronco de encéfalo, con síntomas muy variados: depresión, hemiparesia a tetraplejia, déficits de pares craneales y ataxia o incoordinación de origen vestibular, cerebelar o propioceptivo (12).

### **Forma ocular**

La forma ocular es la que se presenta con menor frecuencia. Se caracteriza por una pérdida repentina de visión, unilateral o bilateral, con midriasis y ausencia de reflejo fotomotor, todo ello como consecuencia de una neuritis del nervio óptico (12).

En la meningoencefalitis necrotizante (MEN) y leucoencefalitis necrotizante (LEN), el patrón clínico y lesional es más grave, con la aparición de microcavitaciones, necrosis y esclerosis intensas (16). El curso de la MEN suele ser siempre agudo, muriendo por lo general el animal al poco tiempo, mientras que en la LEN y en la MEG podemos encontrar periodos de supervivencia más amplios (17).

### **Diagnóstico**

Como para cualquier tipo de patología neurológica, el diagnóstico debe realizarse siguiendo un protocolo ordenado y metódico. La anamnesis puede orientarnos hacia una posible ME aséptica en función de la edad, la raza y la aparición aguda de una sintomatología nerviosa localizada en el SNC (convulsiones, síndrome vestibular, torneo, ceguera, ataxia, etc.), que aumenta en frecuencia e intensidad en un periodo breve de tiempo (11). Para descartar patologías de origen metabólico o sistémico, es imprescindible realizar un perfil general completo, que contemple hemograma, bio-

química y urianálisis, así como radiografías de cráneo, columna y tórax para descartar neoplasias primarias con posibles metástasis en SNC. Un estudio ecográfico debe realizarse igualmente, para descartar masas de localización abdominal. En las ME asépticas los resultados obtenidos para los exámenes complementarios anteriormente citados suelen ser normales o inespecíficos, en caso de presentar alteraciones (18). Según la experiencia de los autores, los signos multifocales, el curso progresivo y la exclusión de las ME infecciosas, permiten hacer un diagnóstico presuntivo fiable de ME no infecciosa en el perro.

El diagnóstico definitivo de MEG (antemortem) puede establecerse mediante el estudio de la composición del LCR de animales afectados, conjuntamente con un estudio de las estructuras intracraneales con la ayuda de técnicas como la tomografía computerizada (TC) y especialmente la resonancia magnética (RM) (19).

En casos de ME asépticas, el análisis del LCR generalmente revela una elevada concentración de proteínas y de células (20), pudiendo ambos parámetros oscilar entre un rango de valores bastante amplio, e incluso encontrarse dentro de los rangos fisiológicos en aquellos casos en los que las lesiones se localizan a nivel del parénquima y no comunican con las leptomeninges, el espacio subaracnoideo o la superficie ependimal (21). En consecuencia, no podemos descartar la enfermedad en caso de obtener un LCR sin alteraciones. Los valores fisiológicos de proteínas y células en el LCR son de hasta 25 mg/dl y 5 células/ $\mu$ l respectivamente. En los casos de MEG, las células suelen ser predominantemente mononucleares, incluyendo linfocitos (60-90%), monocitos (10-20%) y macrófagos. Los neutrófilos representan por lo general del 1 al 20% de la población, siendo ocasionalmente el tipo celular predominante, alcanzando porcentajes del 50-60% (12,15). Una pleocitosis mononuclear suele ser común en formas diseminadas de MEG, aunque existen estudios donde se ha llegado a presentar pleocitosis neutrofílica en el 17% de los perros, lo cual pone de manifiesto la variabilidad de hallazgos para esta patología.

Los signos de ME detectados mediante RM consisten en lesiones simples o múltiples hiperintensas en secuencias T2 y de leve a moderadamente hipointensas en secuencias T1 (Figura 1). Del mismo modo puede observarse captación de contraste evidente a nivel de meninges (22). En caso de afectación de los nervios o el quiasma óptico, la apreciación de los mismos suele ser más marcada de lo normal (11).

La TC no es tan sensible como la RM en el diagnóstico de enfermedades inflamatorias a nivel de SNC, mostrando lesiones inespecíficas (23), tales como cambios a nivel de ventrículos laterales, desviación de la hoz del cerebro, edema, cambios focales en la densidad del parénquima, captación focal de contraste, fijación periventricular



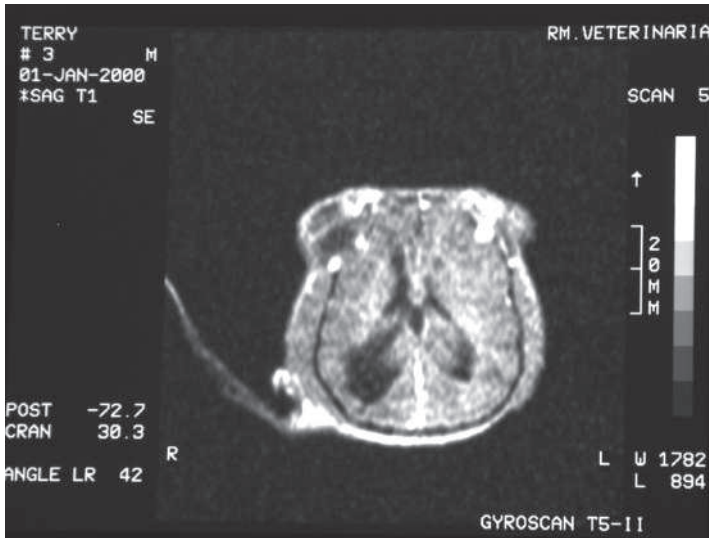


Figura 1: Sección coronal de RM en T1 de un Yorkshire terrier con MEG. Se aprecian focos de inflamación dispersos y dilatación focal del ventrículo lateral derecho debido a pérdida de sustancia en la región frontoparietal derecha.

de contraste y trayectos con fijación de contraste (24) (Figura 2). El efecto masa de las formas focales de MEG se observa indirectamente por el desplazamiento de los tejidos cerebrales subyacentes a la lesión (25) (Figura 3). Las meninges y el nervio óptico tam-

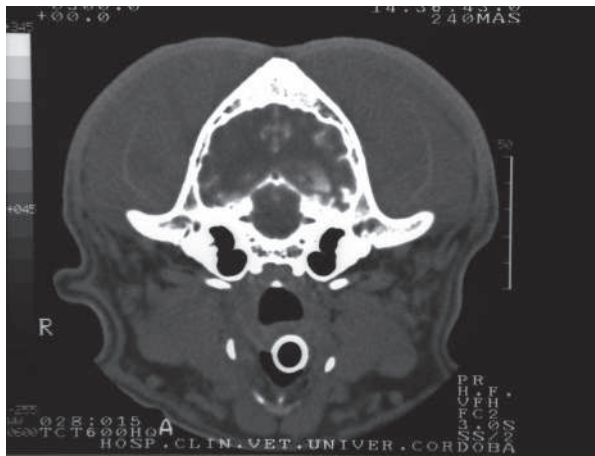


Figura 2. Sección transversal de TC a nivel de las bullas timpánicas en un Pitbull terrier con MEG. Son evidentes áreas radiodensas en ambos hemisferios cerebrales que representan captación multifocal del medio de contraste.

bién pueden manifestar captación de contraste en imágenes de alta definición. Lesiones localizadas a nivel del prosencéfalo pueden mostrar, del mismo modo, captación de contraste (26), sin embargo, las alteraciones que se producen a nivel del tronco del encéfalo son más difíciles de visualizar, debido al artefacto producido por la porción petrosa del temporal. No obstante, según los resultados obtenidos en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba, el valor diagnóstico de la TC en perros con ME no infecciosa puede considerarse alto, pues en el 87,5 % de los casos se aprecian signos radiológicos compatibles con un proceso inflamatorio. Combinada con el análisis del LCR, ambas pruebas alcanzan una sensibilidad del 93,75% en la detección de los cambios inflamatorios asociados a este tipo de patologías inflamatorias.

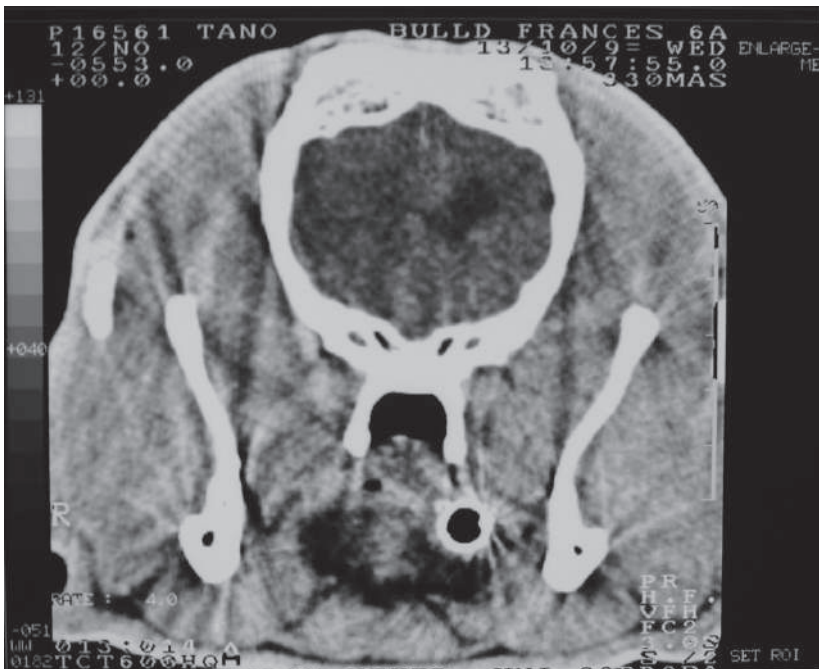


Figura 3: Sección transversal de TC en un Yorkshire terrier con LEN. Se aprecia asimetría ventricular (el ventrículo lateral derecho no es visible), focos hipodensos en hemisferio cerebral derecho compatibles con áreas de edema y necrosis así como efecto de masa (desviación de la hoz del cerebro).

## TRATAMIENTO

El tratamiento de las ME asépticas tiene como objetivo suprimir la respuesta inmune del animal empleando una combinación de dosis inmunosupresores de glu-

cocorticoides junto con otros fármacos inmunomoduladores. La respuesta es variable y es frecuente el desarrollo de efectos secundarios (11).

Los *glucocorticoides* administrados a dosis inmunosupresoras, son el tratamiento de primera elección. Se usa particularmente la prednisona, a razón de 2 mg/kg/día vía oral para reducirla progresivamente en el transcurso de algunos meses hasta la mínima dosis efectiva para el control de la sintomatología clínica (27). La respuesta suele ser variable y los signos clínicos con frecuencia recurren rápidamente al reducir la dosis. El pronóstico en animales tratados exclusivamente con corticoides es malo a medio plazo por los efectos secundarios graves asociados a la administración de dosis inmunosupresoras. Suele emplearse prednisona/prednisolona a una dosis inicial de 1,5-2 mg/kg/12h. La respuesta al tratamiento es menos efectiva en animales afectados con la forma multifocal de MEG (15). La tendencia actual es combinar los glucocorticoides con otros fármacos inmunomoduladores no esteroideos. De esta forma nos beneficiamos de la acción rápida del glucocorticoide para, una vez controlados los síntomas, reducir su dosis hasta interrumpirlos completamente y continuar el tratamiento exclusivamente con fármacos no esteroideos.

La *citostina arabinósido* o citarabina es un principio activo antineoplásico con efecto inmunosupresor. Ha demostrado ser efectiva administrada de forma exclusiva, o conjuntamente con prednisona, en ciertos casos de MEG (4,28,29). La citarabina actúa sobre las células en división, insertándose en el ADN molecular, causando la finalización prematura de la cadena. Debido a su capacidad para atravesar la BHE y a su efecto antiinflamatorio e inmunosupresor, se ha propuesto como posibilidad terapéutica útil para el tratamiento de la MEG, administrada vía subcutánea a razón de 50 mg/m<sup>2</sup> dos veces al día durante dos días consecutivos. Esta posología se repite cada 3 semanas y se combina con prednisona (1 mg/kg/12h) al inicio del tratamiento; reduciéndose la dosis tras el segundo ciclo de administración de citarabina. Cada diez días o dos semanas debe realizarse un perfil general completo, además de periódicamente durante el curso del tratamiento (una vez cada 2 o 3 meses). Los efectos secundarios que se presentan con mayor frecuencia incluyen mielosupresión, vómitos, diarrea y alopecia (29). Scott-Moncrieff et al., (1991) (30), publicaron un estudio experimental sobre la farmacodinamia de la citarabina, en el que no aparecieron efectos adversos tras tres semanas de administración a dosis de 600 mg/m<sup>2</sup> vía intravenosa. En otro estudio más reciente (29), se trataron con citarabina 10 perros con MEG, 8 de ellos recibieron además prednisona a dosis de 1,7 mg/kg/12h, y a los 2 restantes se les administraron de forma conjunta otros agentes inmunosupresores tales como procarbazona y leflunomida; alcanzándose un tiempo medio de supervivencia de 531

días (rango de 46 a 1025 días); además, 5 de los 10 perros permanecían aún con vida al finalizar dicho estudio.

Finalmente, Menaut et al., (2008) (4) publican un estudio sobre la seguridad y eficacia de la combinación de citarabina y prednisolona en el tratamiento de la meningoencefalomielitis de origen idiopático en 11 perros. El protocolo empleado consistió en la administración de citarabina subcutánea a razón de 50 mg/m<sup>2</sup> en intervalos de 12 horas durante 2 días, con repetición cada 3 semanas y prednisolona a dosis inicial de 2 mg/kg/12h, para reducirla progresivamente hasta una dosis mínima eficaz o hasta retirarla por completo. El tiempo de supervivencia es superior al observado en estudios anteriores, siendo la probabilidad acumulada de supervivencia a los 2 años de aproximadamente un 59% de los casos. El porcentaje de recidivas en este estudio fue de un 63,3%, estando asociado, en la mayoría de los casos, a la reducción de la dosis de corticoide.

La *procarbazina* es un fármaco antineoplásico con acción en múltiples niveles, inhibiendo la producción de precursores tanto de ADN como de ARN, y por consiguiente, la síntesis de proteínas. Del mismo modo, puede dañar directamente el ADN mediante reacciones de alquilación (28). Se ha empleado de forma exclusiva o en terapia conjunta con prednisona (31), donde se estudió su eficacia en 20 perros sospechosos de padecer MEG, comparándose los resultados con un grupo control de 11 perros (con MEG diagnosticada mediante estudio histopatológico post-mortem). La prednisona fue reducida o interrumpida en 17 perros, y el tiempo medio de supervivencia fue de 15 meses. La procarbazina se administró vía oral a dosis de 25-50 mg/m<sup>2</sup>/día, observándose como principal efecto secundario (usualmente asociado a dosis altas) una mielosupresión importante en el 30% de los casos en este estudio. El seguimiento propuesto para cada paciente contempla la realización semanal de un perfil general completo durante el primer mes, pasando a un control semanal posteriormente. Otros efectos secundarios observados son principalmente de naturaleza digestiva: gastroenteritis hemorrágica, náuseas, vómitos y disfunción hepática (28).

El empleo de *ciclosporina* en el tratamiento de la MEG se ha recomendado tras la publicación de series clínicas donde ha mostrado su eficacia. La ciclosporina se caracteriza por poseer un potente efecto inmunosupresor, inhibiendo la respuesta inmune mediada por linfocitos T, con el consecuente cese en la producción de interleucina 2 y otras citocinas. La permeabilidad de la BHE a la ciclosporina suele ser baja; sin embargo, este hecho no representa ningún inconveniente debido a la naturaleza inflamatoria de la enfermedad, que altera el funcionamiento fisiológico de la misma, alcanzándose la concentración terapéutica en las áreas afectadas del SNC (32). En

un estudio retrospectivo (11), 10 perros con sospecha de MEG fueron tratados con ciclosporina de forma exclusiva o en combinación con corticoides. La respuesta al tratamiento fue favorable, observándose una mejoría manifiesta del proceso inflamatorio en todos los pacientes. Los efectos adversos derivados del empleo de ciclosporina a dosis terapéuticas incluyen caída excesiva de pelo, hiperplasia gingival e hipertrichosis. En casos de sobredosificación pueden aparecer otros síntomas como anorexia, vómitos y diarrea. El tiempo medio de supervivencia en días fue de 930, dentro de un rango comprendido entre 60 y más de 1290 días, permaneciendo 5 de los pacientes aún con vida en el momento de finalización del estudio. En base a los resultados anteriores, se recomienda el empleo de ciclosporina a razón de 6 mg/kg cada 12 horas (11).

La *leflunomida* es un importante inmunomodulador que se ha empleado para el tratamiento de lesiones cerebrales degenerativas e inflamatorias de causa desconocida en perros, mostrando un aumento significativo en el tiempo de supervivencia (superior a 12 meses desde el inicio del tratamiento) respecto a la terapia inicialmente planteada con corticoides. Actúa inhibiendo la proliferación de células T y B, suprimiendo la producción de inmunoglobulinas e interfiriendo en la adhesión celular (33). Braund (1985) (12), publica un estudio sobre la eficacia del tratamiento con leflunomida en meningoencefalomielitis aséptica multifocal no supurativa en 5 perros; donde se aprecia una mejoría notable de los déficit neurológicos tras varios meses de tratamiento y una resolución parcial o incluso total de las lesiones corticales apreciadas en las imágenes de RM. Los efectos adversos más frecuentes derivados de la administración de este principio activo suelen incluir disminución del apetito, letargia, anemia, hematoquecia o hematemesis, siendo frecuentes los dos últimos en los casos de terapias combinadas con otros agentes inmunomoduladores, principalmente corticoides. El principal inconveniente de este fármaco es su elevado precio que limita su utilización en pequeños animales.

Del mismo modo, se han realizado ensayos clínicos con distintos inmunomoduladores, de los cuales destacaremos el micofenolato. Aunque hasta la fecha no se ha publicado ningún artículo sobre su utilidad en el tratamiento de las ME no infecciosas, otros autores (35) y nosotros mismos en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba, hemos comprobado su eficacia en un número reducido de casos clínicos. El ácido micofenólico parece especialmente útil en el tratamiento de la LEN del Yorkshire terrier, siendo posible interrumpir completamente la administración de glucocorticoides sin la aparición de recidivas. El ácido micofenólico en forma de sales como el micofenolato de mofetilo es un inmunomodulador, usado en primera instancia en humana, en 1970, para el tratamiento de la psoriasis. En la actualidad se han publicado estudios (34), demostrando su eficacia en enfermedades inflamatorias

que no responden a las terapias convencionales y es el fármaco de elección para el tratamiento de la *miastenia gravis* inmunomediada en el perro. Dewey et al., (2000) (35), fueron los primeros en publicar su eficacia en un caso de *miastenia gravis* canina. Se obtuvieron resultados satisfactorios tras la administración de micofenolato mofetilo, llegando a remitir los signos clínicos a los ocho meses del inicio de los síntomas. El micofenolato actúa inhibiendo la formación de nucleótidos, afectando consecuentemente a la síntesis tanto de ADN como de ARN. Los linfocitos T y B dependen de esta síntesis para desarrollar sus funciones, de ahí el interés de su empleo en el tratamiento de la MEG, asumiendo un origen inmunomediado o autoinmune. Los efectos secundarios derivados de su empleo son principalmente de tipo gastrointestinal (nauseas, vómitos, diarreas y dolor abdominal), del mismo modo, pueden aparecer alteraciones hematológicas y genitourinarias de forma menos frecuente. Para minimizar la aparición de los mismos, se aconseja su administración con las comidas. En el perro, es predecible la aparición de diarreas hemorrágicas si no se reduce a la mitad la dosis inicial de 20 mg/kg/12h después del primer mes de tratamiento (36).

## PRONÓSTICO

Por lo general suele ser grave, conllevando en muchos casos la muerte del animal o su sacrificio a petición de los propietarios. Los factores asociados con un mejor pronóstico fueron presencia de signos clínicos focales, especialmente cuando la zona afectada era el telencéfalo (15), y una respuesta inicial favorable al tratamiento inmunosupresor (29). En nuestra experiencia, Determinadas lesiones visibles mediante TC (focos hipodensos en el parénquima cerebral) así como el grado de intensidad de las mismas (captación del medio de contraste) pueden considerarse factores determinantes en el pronóstico de las ME no infecciosas. El resto de signos radiológicos detectables por TC no parecen tener valor pronóstico.

## REFERENCIAS

1. Koestner, A., Zeman, W. Primary reticulosis of the central nervous system in dogs. Am. J. Vet. Res. (1962) 23:381.
2. Braund, K.G., Vandavelde, M., Walker, T. Granulomatous meningoencephalitis in six dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. (1978) 172:1195-1200.
3. Higginbotham, M.J., Kent, M., Glass, E.N. Non-infectious Inflammatory Central Nervous System Diseases in Dogs. Comp. Cont. Educ. (2007) 29:488-497.
4. Menaut, P., Landart, J., Behr, S., Lanore, D., Trumel, C: Treatment of 11 dogs with meningoencephalomyelitis of unknown origin with a combination of prednisolone and cytosine arabinoside. Vet. Rec. (2008) 162:241-245.



5. Jubb, K.V., Huxtable, C.R. Inflammation in the central nervous system. In: Pathology of Domestic Animals. (1993). Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. eds, 4th ed. Academic Press: San Diego, CA. 426-431.
6. Daly, P., Drudy, D., Chalmers, W.S., Baxendale, W., Fanning, S., Callanan, J.J. Greyhound meningoencephalitis: PCR-based detection methods highlight an absence of the most likely primary inducing agents. *Vet. Microbiol.* (2006) 118:189-200.
7. Kennedy, P.G. Viral encephalitis. *J. Neurol.* 2005; 252: 268-272.
8. Shibuya, M., Matsuki, N., Fujiwara, K. Autoantibodies against Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) in Cerebrospinal Fluids from Pug Dogs with Necrotizing Meningoencephalitis. *J. Vet. Med. Sci.* (2007) 69:241-245.
9. Fliegner, R.A., Holloway, S.A., Slocombe, R.F. Granulomatous meningoencephalomyelitis with peripheral nervous system involvement in a dog. *Aust. Vet. J.* (2006) 84:358-361.
10. Cuddon, P.A., Smith-Maxie, L. Reticulosis of the central nervous system in the dog. *Comp. Cont. Educ.* (1984) 6:23-32.
11. Adamo, P.F., Adams, W.M., Steinberg, H. Granulomatous Meningoencephalomyelitis in dogs. *Comp. Cont. Educ.* (2007) 29:678-690.
12. Braund, K.G. Granulomatous meningoencephalomyelitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* (1985) 186:138-141.
13. Mackay, B.M., Curtis, N. Adipsia and hypernatraemia in a dog with focal hypothalamic granulomatous meningoencephalitis. *Aust. Vet. J.* (1999) 77:14-17.
14. Summers, B.A., Cummings, J.F., DeLahunta, A. Granulomatous meningoencephalomyelitis, in *Veterinary Neuropathology*. (1995) St Louis: Mosby p. 110-114.
15. Muñana, K.R., Luttmann, P.J. Prognosis factors for dogs with granulomatous meningoencephalomyelitis: 42 cases (1982-1996). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* (1998) 212:1902-1906.
16. Lotti, D., Capucchio, M.T., Gaidolfi, E., Merlo, M. Necrotizing encephalitis in a Yorkshire terrier: clinical, imaging and pathologic findings. *Vet. Radiol. Ultrasound* (1999) 40:622-626.
17. Suzuki, M., Uchida, K., Morozumi, M. A comparative pathological study on necrotizing meningoencephalitis and granulomatous meningoencephalomyelitis. *J. Vet. Med. Sci.* (2003) 65:1233-1239.
18. Bailey, C.S., Higgins, R.J. Characteristics of cerebrospinal fluid associated with canine granulomatous meningoencephalomyelitis: A retrospective study. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* (1986) 18: 418-421.
19. Bohn, A.A., Wills, T.B., West, C.L., Tucker, R.L., Bagley, R.S. Cerebrospinal fluid analysis and magnetic resonance imaging in the diagnosis of neurologic disease in dogs: a retrospective study. *Vet. Clin. Pathol.* (2006) 35: 315-320.
20. Sorjonen, D.C. Clinical and histopathological features of granulomatous meningoencephalomyelitis in dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* (1990) 26:141-147.
21. Cook, J.R., DeNicola, D.B. Cerebrospinal fluid. *Vet. Clin. North Am.* (1988) 18:475-499.
22. Mellena, L., Samii, V., Vernau, K. Meningeal enhancement of magnetic resonance imaging in 15 dogs and 3 cats. *Vet. Radiol. Ultrasound* (2002) 43:10-15.
23. Wolf, M., Pedroia, V., Higgins, R.J., Koblik, P.D., Turrel, J.M., Owens, J.M. Intracranial ring enhancing lesions in dogs: a correlative CT scanning and neuropathologic study. *Vet. Radiol. Ultrasound* (1995) 36:16-20.
24. Plummer, S.B., Wheeler, S.J., Thrall, D.E., Kornegay, J.N. Computed tomography of primary inflammatory brain disorders in dogs and cats. *Vet. Radiol. Ultrasound* (1992) 33: 307-312.
25. Speciale, J., Van Winkle, T.J., Steinberg, S.A. Computed tomography in the diagnosis of focal granulomatous meningoencephalitis: Retrospective evaluation of three cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* (1992) 28:327-332.



26. Dzyban, L., Tidwell, A. Imaging diagnosis-granulomatous meningoencephalitis in a dog. *Vet. Radiol. Ultrasound* (1996) 37:428-430.
27. Platt, S. Recommendations for corticosteroid use in neurological diseases. (2002) *Proc 20<sup>th</sup> ACVIM Forum* p. 370-372.
28. Cuddon, P., Coates, J., Murray, M. New treatment for granulomatous meningoencephalitis. (2002) *Proc 20<sup>th</sup> ACVIM Forum* p. 319-321.
29. Zarfoss, M., Schatzberg, S., Venator, K. Combined cytosine arabinoside and prednisone therapy for meningoencephalitis of unknown aetiology in 10 dogs. *J. Small Anim. Pract.* (2006) 47: 588-595.
30. Scott-Moncrief, J.C., Chan, T.C., Samuels, M.L. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of cytosine arabinoside in dogs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (1991) 29:13-18.
31. Coates, J., Barone, G., Dewey, C. Procarbazine for treatment of suspected granulomatous meningoencephalomyelitis: 20 cases (1998-2004). (2005) *Proc 23<sup>rd</sup> AC VIM Forum* p. 912.
32. Adamo, P.F., O'Brien, R. Use of cyclosporine to treat granulomatous meningoencephalitis in three dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* (2004) 225:1211-1226.
33. Sturges, B., LeCouteur, R.A., Gregory, C. Leflunomide for treatment of inflammatory or malacic lesions in three dogs: A preliminary clinical study. (1998) *Proc 16<sup>th</sup> ACVIM Forum* p. 40.
34. Palaniappan, S., Ford, A.C., Greer, D. Mycophenolate mofetil therapy for refractory inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* (2007) 13:1488-1492.
35. Dewey, C.W., Boothe, D.M., Rinn, K.I., Coates, J.R., Burkholder, W.J. Treatment of a Myasthenic Dog with Mycophenolate Mofetil. *J. Vet. Emergency and Critical Care* (2000) 10:177-187.
36. Zwerner, J., Fiorentino, D. Mycophenolate mofetil. *Dermatologic Therapy* (2007) 20:229-238.



## ALMERÍA

### ACTOS CONMEMORATIVOS DEL II CENTENARIO DE DARWIN 1809-2009

ALBERTO GONZÁLEZ RAMÓN\*

La Real Academia de Ciencias Veterinarias del Andalucía Oriental, en colaboración con el Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios y la Biblioteca “Francisco Villaespesa”, ha celebrado en Almería una EXPOSICIÓN CONMEMORATIVA DEL II CENTENARIO DE DARWIN 1809-2009, en el Salón de Actos de la Biblioteca “Francisco Villaespesa” de la capital, los días 2 al 11 de Diciembre de 2009.

La ceremonia de inauguración de la exposición se realizó el día 2 de diciembre en el Salón de Actos de la Biblioteca “Francisco Villaespesa”, en presencia de diversas autoridades. La exposición, expuesta anteriormente en Granada, Jaén y Málaga, estaba integrada por 40 paneles y 18 cráneos de homínidos. En los paneles se describen la vida y los trabajos científicos de Charles Darwin, con especial referencia a su libro “El origen de las especies”, que revolucionó al mundo intelectual y social de aquella época. Además la Biblioteca aportó a la exposición una colección de libros relacionados con la temática de la exposición.

El acto de clausura fue realizado por el Presidente de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, Excmo.Sr.D. Antonio Marín Garrido, el día 11 de junio, en el Salón de Actos del Ilmo. Colegio Oficial de Veterinarios de Almería, con la presencia de Excmo. Sr. D. Antonio Marín Garrido, presidente de la Real Academia de Ciencias Veterinarios de Andalucía Oriental, en el acto se hizo mención a la categoría del Profesor Dr. Paul Palmqvist. Catedrático de Paleontología

---

\* Coordinador científico.

de la Universidad de Málaga, que impartiría una conferencia magistral titulada *“En busca de los primeros europeos: Avances en el estudio de los Yacimientos Paleontológicos españoles de inicios del Pleistoceno”*

Todos los actos han sido patrocinados por el Ministerio de Educación, Política Social y Deporte.

## ALMERIA

# MEMORIA DE LAS JORNADAS SOBRE INNOVACIÓN Y TECNOLOGÍA EN LOS ALIMENTOS ECOLÓGICOS

ALBERTO GONZÁLEZ RAMÓN\*

Durante los días 30 de noviembre y 1 y 2 de diciembre se han celebrado en el salón de actos de la Delegación Provincial de Salud organizadas por la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental unas Jornadas de Innovación y Tecnología en los Alimentos Ecológicos, patrocinadas por la Consejería de Innovación Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía. La parte práctica se realizó en las instalaciones de la empresa Cítricos de Andarax S.A. en Gador (Almería), el día 3 de diciembre de 2010..

Los objetivos de estas Jornadas se centraban en exponer y debatir los aspectos más importantes y de mayor actualidad en la obtención y control de los “Alimentos Ecológicos” abordando de forma integral los siguientes:

- Actualizar el concepto de “Alimentos Ecológico”
- Impulsar el conocimiento de la Innovación y las nuevas tecnologías en la producción de alimentos ecológicos.
- Conocer las técnicas adecuadas para adaptar los perfiles a las necesidades de formación del sector agroalimentario, y los recursos actuales en el campo de la investigación.
- Revisar y puesta al día en el conocimiento de la normativa que los regula; comercio interior y exterior.
- Conocer la “Certificación de calidad de los alimentos ecológicos”.

---

\* Coordinador científico.

- Relacionar los conceptos de Alimento Ecológico-Salud.
- Conocer los efectos beneficiosos en la Salud de los consumidores.
- Estado actual del sector en Andalucía.
- Actualizar la base científica de los asistentes en la promoción de la Salud en el ámbito alimentario.

En las jornadas se han impartido cuestiones como: *"Alimentación Ecológica"*, *"Calidad y valor nutricional de alimentos ecológicos basados en la evidencia científica."* *"Alimentos Ecológicos vs. Alimentos transgénicos: tecnologías moleculares para su identificación y trazabilidad"*. *"Etiquetado de productos ecológicos como herramienta de calidad. Certificación ecológica y la Importación de Alimentos"*, *"Sistemas específicos de Control de Alimentos"*, *"Comportamiento del Consumidor de Productos Ecológicos y de Turismo Rural. Comercialización y Trazabilidad"*, realizándose una Visita practica y una conferencia sobre *"El papel de la Industria Ecológica en la Sociedad Actual. Investigación y Recursos"*, en las instalaciones de la empresa "Cítricos de Andarax S.A."

Las Jornadas que han obtenido el **Reconocimiento de interés Científico-Sanitario** por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía han concitado la presencia de más de 50 profesionales relacionados con el sector (veterinarios, farmacéuticos, médicos, Ingenieros Agrónomos, Técnicos de industrias de alimentación, Profesores de enseñanza secundaria, Ingeniería relacionadas con la alimentación, Ciencia y Tecnología de los Alimentos, etc.)

Para esta ocasión se ha contado con la participación de reconocidos profesionales pertenecientes tanto al sector público como al privado, de ámbito nacional y autonómico

De entre ellos destacar al Excmo. Sr. D. **Julio Boza López**. (Presidente de Honor de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental); Ilmo. Sr. D. **Gaspar Ros Berruezo**. (Catedrático de nutrición y bromatología. Universidad de Murcia Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental); Ilmo. Sr. D. **Manuel Jamilena Quesada**. Profesor Titular de Genética de la Universidad de Almería; Ilmo. Sr. D. **Tesifón Parrón Carreño**. (Académico de Número de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental. Jefe de Servicio de Salud de la Delegación Provincial de Salud de Almería); **D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Luisa Maroto Aranda**. Jefa de la Unidad de Sanidad Exterior de Almería; **Ilma. Sra. D<sup>a</sup>. Ana Vázquez Camacho**. Agente de Control Sanitario Distrito Poniente. Delegación Provincial de Almería de la Consejería Salud de la

Junta de Andalucía, Académico correspondiente de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental; **D. José M<sup>a</sup> Molina Ruiz**. Director de Calidad de la Empresa Cítricos del Andarax SA. de Gádor (Almería); **D. Juan Sebastián Fernández Prados**. Profesor de sociología de la Universidad de la UAL y **D. Joaquín Segura Blanes**. Técnico de inspección del CAE.





## JAEN

# MEMORIA DE LAS JORNADAS SOBRE GANADERIA EXTENSIVA Y EL DESARROLLO RURAL EN ANDALUCIA : “LOS PEQUEÑOS RUMIANTES: NUEVOS RETOS DE EXPLOTACIÓN”

ANTONIO MARÍN GARRIDO\*

Durante las tardes de los jueves, del 12 al 26 de noviembre de 2009, se han desarrollado en el salón de actos del Colegio Oficial de Veterinarios de Jaén y organizadas por la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, con el patrocinio de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía, unas jornadas sobre ganadería extensiva y desarrollo rural en Andalucía, con especial referencia a pequeños rumiantes, con la participación de veterinarios y ganaderos interesados en este sector productivo.

Bajo la coordinación científica del Presidente de la Academia, Sr. Marín Garrido, intervinieron los expertos: Dr. D. Manuel Sánchez Rodríguez, profesor titular de Producción Animal de la Universidad de Córdoba. Dr.D. Clemente Mata Moreno, experto europeo en ganadería ecológica. Dr.D. José Luis González Rebollar, investigador del Centro Superior de Investigaciones Científicas del Centro Experimental del Zaidín, Dr.D. Emilio de León Ponce de León, director de compras de COVAP y Dr.D. Tomás Cano Expósito, Director de la Oficina Comarcal Agraria de la Loma de Jaén.

En las jornadas se ha realizado un análisis de la situación de crisis que atraviesa la ganadería en los últimos años así como de diversos factores que la motivan, poniéndose de manifiesto que el modelo de producción ganadera, implantado en nuestro país, a lo largo de los últimos cincuenta años, basado en la transformación de insumos

---

\* Coordinador científico.

adquiridos para la producción de productos alimenticios de origen animal, implica un elevado coste tanto energético como económico, siendo el modelo insostenible, hecho que se ha visto agravado por el proceso de globalización, generador de grandes fluctuaciones en los mercados de materias primas y el aprovisionamiento creciente de alimentos de origen animal procedentes de países emergentes, como Brasil, y otros desarrollados con agriculturas muy competitivas a cuyo frente figuran los Estados Unidos, lo que está obligando a la introducción en los sistemas de producción de nuestra ganadería intensiva a profundas transformaciones.

Sobre la ganadería ligada a la tierra, se concluyó que su función, como productora exclusiva de alimentos, no es suficiente para mantener su viabilidad económica; así por ejemplo, en la actualidad el ovino de carne con el importe del producto que vende al mercado no cubre más de la cuarta parte de sus costes de explotación. Pese a todo, es imprescindible producir alimentos de calidad diferenciada, en régimen ecológico, con denominaciones geográficas, etc., así como seguir innovando, para poner en valor sus producciones mediante la introducción de nuevas tecnologías en todas las fases del proceso productivo.

Por otra parte, en pequeños rumiantes, como objetivo específico de las jornadas, se habló de la importancia del pastoreo como elemento favorable para la protección de los ecosistemas de montaña, mediante la conservación de la biomasa, la mejora de la biodiversidad y la prevención de incendios, así como del importante papel de “ fijador” de la población al medio rural en zonas de difícil orografía, recursos agrarios escasos y distantes de zonas urbanas, hechos que se incardinan en los objetivos de la Política de Desarrollo Rural (P.D.R.) de la Unión Europea. En consecuencia, el pastoreo es una cultura de especial trascendencia para la conservación del paisaje vivo y dinámico en las zonas de montaña, lo que justifica sobradamente su especial consideración por parte de Unión Europea y muy especialmente de nuestra administración nacional dado que somos uno de los Estados Miembros más importantes en la cabaña de ovino-caprino.

Se planteó como alternativa para la viabilidad de esta actividad, el desarrollo del concepto de multifuncionalidad, basado en la producción conjunta de bienes privados, comercializables en mercados constituidos y el suministro de bienes y servicios públicos no comercializables, de tal manera que la actividad productiva del empresario ganadero cesa cuando el negocio no es rentable, interrumpiéndose igualmente el suministro de bienes públicos, quedando de nuevo la sociedad con la responsabilidad de restituir el servicio que equilibre dichos bienes circunstancia que justifica la necesidad de la ayuda pública para mantener la actividad privada agraria.

Por último, se presentaron explotaciones concretas que funcionan en la provincia de Jaén, siguiendo estos principios:

- Adecuación de la carga ganadera a la superficie y sus recursos pastables.
- Mejora del ganado, con razas autóctonas de alta calidad.
- Recuperación de usos y costumbres tradicionales para mejora productiva de la finca (redileo, control de arbustos y arbolado, etc.) y así reducir los insumos.
- Incorporación y mejora de otros ingresos (Caza menor, producción de miel, agro y/o ecoturismo, etc).
- Racionalización del manejo y mejora de la sanidad del ganado.
- Adecuación para el cumplimiento oficial de los requisitos legales de gestión, y garantizar así la percepción de ayudas públicas.
- Diferenciación de los productos de calidad.
- Otros.

Se habló de la puesta en marcha por el Ministerio de Medio Ambiente, Rural y Marino de ayudas incardinadas en la PDR, para el fomento de sistemas de producción de razas ganaderas autóctonas en régimen extensivo, de producción de productos agroalimentarios de calidad de origen animal y a las agrupaciones de productores en los sectores de ovino y caprino, haciéndose público reconocimiento de la apuesta de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía por la ganadería ecológica, al tenerla incorporada para su ayuda en las medidas agroambientales, deseando el sector, que constituyan el primer paso para el desarrollo y consolidación de la citada multifuncionalidad que sirva de garantía a un modelo sostenible para el sector.



## JAÉN

### MEMORIA DE LOS ACTOS CONMEMORATIVOS DEL BICENTENARIO DEL NACIMIENTO DE CHARLES DARWIN

ANTONIO MARÍN GARRIDO\*

El pasado día 22 de Octubre y con una interesante conferencia, bajo el título “ *El segundo centenario de Darwin en las Academias de Andalucía* ” a cargo del Prof. Dr. Ernesto Fernández Sanmartín y el posterior acto de inauguración de la exposición monográfica sobre la vida y obra de Charles Darwin, dio comienzo el ciclo de actos programados por esta Corporación como homenaje a tan destacado naturalista.

El Dr. Fernández Sanmartín realizó un amplio recorrido por la vida de Darwin con especial atención a aquellos acontecimientos de mayor relevancia científica. Al finalizar la conferencia se procedió a la inauguración de la exposición preparada al efecto.

En el acto de clausura el Presidente de la Academia, D. Antonio Marín Garrido, iniciaba la sesión con unas palabras de agradecimiento a todas las personas e Instituciones habían participado y hecho posible la celebración del Ciclo, destacando de forma especial al Ministerio de Educación por la subvención concedida que ha permitido sufragar



---

\* Coordinador científico.

los gastos ocasionado, así como al Director de la Junta de Oficiales de la Real Sociedad Económica de Amigos del País, D. Manuel Carrasco, por la desinteresada cesión de sus instalaciones, y a la Real Academia Malagueña de Ciencias, por la puesta a disposición de todo el material con el que se ha montado la exposición, y acabando con una mención a la Fundación Crucampo por la atención dispensada a los asistentes al acto inaugural de la Exposición y acabando con el público reconocimiento al Ministerio de Educación por la concesión de una subvención que ha permitido sufragar los gastos ocasionados.

Seguidamente realizó una bien elaborada presentación del conferenciante, Prof. Dr. Paul Palmqvist, Catedrático de Paleontología de la Universidad de Málaga, en la que puso de manifiesto el importante bagaje curricular que, pese a su juventud, le acompaña.

La conferencia “ Darwin y la evolución humana. Grandes hitos en la historia evolutiva de los homínidos “ constituyó una auténtica lección magistral.

En ella el Dr. Palmqvist destacó las importantes contribuciones de este insigne investigador, que dieron lugar al nacimiento de la Teoría de la Evolución y, con ello, al desarrollo de la biología moderna, a la que dicha teoría ilumina y da sentido en todas sus disciplinas.

Específicamente, habló del registro paleoantropológico conocido desde los tiempos de Darwin, cuyo estudio ha permitido extraer una serie de conclusiones en relación a los grandes hitos de la evolución del linaje humano, como por ejemplo:

1.- Que la adquisición de la postura bípeda, confirmada recientemente en un esqueleto de *Ardipithecus ramidus*, especie de australopitecino que vivió hace unos cuatro millones y medio de años, antecedió en más de dos millones de años el desarrollo del encéfalo, razón por la que se puede considerar que los primeros homínidos se podrían calificar de “chimpancés que caminaban erguidos”.

2.- Nuestro parentesco evolutivo con los grandes simios africanos, pues las evidencias provenientes de la Biología Molecular (análisis de secuencias de nucleótidos en el ADN) apuntan a una relación turbadoramente estrecha entre el hombre y el chimpancé, lo que viene a confirmar la retrodicción efectuada por el propio Darwin mucho antes de que se tuviese acceso al código genético.

3.- Las ideas fundamentadas en los descubrimientos fósiles recientes, que indican que la diversidad temprana del clado de los homínidos es mucho mayor de lo que se había supuesto y que la bipedestación tuvo lugar en el seno de ambientes





arbolados, lo que contradice la iconografía clásica de la evolución humana, concebida de manera lineal.

4.- La primera dispersión humana desde África hacia Eurasia, que tuvo lugar inmediatamente tras la aparición del género *Homo* según evidencia el yacimiento caucásico de Dmanisi en Georgia y, más posteriormente en el tiempo y ya en Europa, las localidades fósiles de Orce y de Atapuerca en España, lo que ha permitido constatar que estas poblaciones humanas se dispersaron con industrias líticas poco elaboradas (el tecnocomplejo cultural olduvayense) y en el seno de un contexto de dispersiones faunísticas en el que la clave ecológica para el éxito de estos homínidos parece haber sido la adopción de una dieta carnívora y el carroñeo oportunista de las presas de los félidos con dientes de sable, en competencia con las hienas gigantes de inicios del Pleistoceno.

5.- La diversidad del género humano en tiempos relativamente recientes (en términos geológicos), pues hace 30.000 años, en el Pleistoceno superior, coexisten hasta cuatro especies de homínidos (*Homo erectus*, *Homo neanderthalensis*, *Homo sapiens* y *Homo floresiensis*), lo que nos sitúa en una nueva perspectiva en relación a nuestro linaje evolutivo, la de que estamos solos en la Tierra desde hace muy poco.

Las espléndidas instalaciones de la Real Sociedad Económica de Amigos del País han registrado una afluencia masiva de un público interesado en tan sugestivo tema.

La Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, en la persona de su Presidente, ha sido felicitada efusivamente por los asistentes al ciclo por el acierto en la programación de este merecido recuerdo para Charles Darwin.



# JAÉN

## LA GRIPE NUEVA Y LA DE SIEMPRE

El día 17 de diciembre de 2009, organizada por la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental y el Colegio Oficial de Médicos de Jaén tuvo lugar una conferencia dictada por los catedráticos y Académicos María del Carmen Maroto Vela y Gonzalo Piédrola Angulo, sobre "La gripe nueva y la de siempre". Los conferenciantes tras exponer la estructura del virus, que condiciona la gran capacidad de mutación que posee, explicaron las características de la nueva pandemia por el virus influenza A/H1N1/California/04/2009, y sus características comunes y diferenciales con otras epidemias, desde el punto de vista microbiológico, clínico y epidemiológico. Revisaron el problema de las distintas vacunas y la aparición de las últimas mutantes del nuevo virus. A continuación tuvo lugar un animado coloquio con cerca del centenar de asistentes a la charla.

### Expertos afirman que la alarma de la gripe A no está justificada

Los epidemiólogos Gonzalo Piédrola y María del Carmen Maroto analizan los contagios

**PERE BUENO W. JAÉN**  
La rápida propagación de los contagios de la gripe A generó una alarma que, en opinión de los epidemiólogos Gonzalo Piédrola y María del Carmen Maroto, no está justificada. Los expertos analizaron ayer en el Colegio de Médicos, las claves de una enfermedad que está dando muchos que hablar.  
"Hay una alarma social un tanto injustificada. La gripe se conoce desde muy antiguo. Igual que se sabe que es un virus con una gran capacidad de mutación. Para hacer más allá sólo hay que tomar determinadas medidas preventivas, establecer un control donde las instrucciones y analizar en vacunas eficaces". Con esta reflexión argumentó el experto en epidemiología

Gonzalo Piédrola su intervención ante los asistentes jaenenses. En este análisis sobre el nuevo virus que ha generado un gran revuelo en todo el mundo, estuvo acompañado por la también especialista en Salud Pública, María del Carmen Maroto.  
Los disertamientos fueron presentados por el presidente de la Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, Antonio Martín Garrido, y por el presidente del Colegio Provincial de Médicos de Jaén, Emilio García de la Torre. El doctor Piédrola explicó que existen más de mil virus que generan síntomas respiratorios y que una buena parte de ellos son incubados en animales. Del mismo modo, comentó que las medidas que ha tomado



SEÑOR. Antonio Martín Garrido y María del Carmen Maroto.

la Organización Mundial de la Salud son adecuadas.  
"Por su parte, María del Carmen Maroto explicó que el cerdo tiene unas receptores equivalentes a otros animales que hacen que el organismo de este sea "más vulnerable" en el que se permiten e incluso gripales. Lo hecho, el ser

homómeros de porfiria le fue dada a esta gripe porque tiene una gran cantidad de genes que codifican. Para la doctora Maroto, existen tres dolencias que si una madre tiene preconceptos y que persisten en una gran cantidad de países como son la tuberculosis, la malaria y el sida.



## OBITUARIO

### EXCMO. SR. D. VICENTE DE LA TORRE MONTES

El 7 de junio del pasado año fallecía en Madrid el Excmo. Sr. Dr. D. Vicente de la Torre Montes, miembro destacado de la tercera generación de una saga Veterinaria de gran abolengo nacional y de la que su padre, D.Salvador Vicente de la Torre, ha sido el máximo exponente.

El Dr. de la Torre Montes pertenecía desde 1988, como Académico de Número a la Real de Ciencias Veterinarias y, desde el año 2003, en condición de Correspondiente, a la Real de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental.

Tan profunda fue su trayectoria vital que el pasado 23 de noviembre la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España celebró una Sesión Necrológica en su recuerdo. Unos meses antes, el Peno de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental tenía conocimiento de su fallecimiento y se aceptaba por unanimidad la propuesta del Presidente de hacer constar en el Acta de la sesión el sentimiento de pesar de la Corporación y dar traslado de dicho acuerdo a sus deudos.

Numerosas han sido las aportaciones científicas que el Dr. De la Torre Montes ha procurado a las Ciencias Veterinarias, tanto en el ámbito civil como en el militar. Pero, aún siendo importantes todas ellas, debemos hacer especial mención a las que se refieren a los estudios humanísticos. Su excelente discurso de ingreso en nuestra Corporación sobre los “Animales en la mitología” confirmó una vez más la atracción que sentía por los estudios históricos. Sus trabajos sobre “Los animales y el hombre. Reflexiones éticas”, “Profesión y Humanismo” y la recopilación y colaboración en la publicación de la “Antología Poética” de su padre, el Dr. De la Torre González, demuestran su profunda preparación académica. Hoy solo nos queda recordar con cariño su figura y nutrimos de su ejemplo y obra.

### ILTMO. SR. D. JOSÉ CARNERO VARO

El 13 de Junio de 2009 fallecía, tras penosa enfermedad el Iltno.Sr. D. José Carnero Varo.

Nacido el 6 de octubre de 1956 en Vélez-Málaga, cursó la Licenciatura de Veterinaria en Córdoba, continuando así una vocación familiar que se remonta hasta cinco generaciones atrás.

Diplomado en Sanidad y en Inseminación Artificial, Director de Instalaciones Radiológicas y Doctor en Veterinaria por la Facultad de Córdoba , obtiene por oposición la plaza de FAS de la Dirección General de Sanidad.

Ejerció Clínica Privada en Vélez Málaga hasta su fallecimiento

Desde 1980 fue Profesor en la Cátedra de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de Málaga.

Académico Numerario de esta Corporación en la que ingresó tras la lectura de su discurso de entrada sobre la "Importancia Sanitaria de la parasitación por artrópodos en la especie humana"

El Ayuntamiento de Vélez-Málaga, la Facultad de Medicina de Málaga y nuestra Corporación organizaron en su recuerdo, como homenaje póstumo, un acto solemne en el que todos los participantes ante un nutrido grupo de familiares, compañeros y amigos pusieron de manifiesto no sólo su acreditada labor científica, sino su gran valía personal.

### **ILTMO.SR.D. JULIO SORIA RAMIREZ**

El día 15 de diciembre de 2009, con más de 90 años de edad, fallecía en Almería el Ilmo. Sr. D. Julio Soria Ramírez, Académico Fundador de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental por la sección de Almería, ciudad en la que ejerció la mayor parte de su carrera profesional desde su condición de Veterinario Titular.

Deja tras de si una gran familia a la que muchos amigos, numerosas personalidades y compañeros acompañaron en su dolor. De entre los que con sinceras y sentidas palabras pusieron de manifiesto su gran personalidad y valía profesional debemos destacar entre otros, al Presidente del Colegio Oficial de Veterinarios de Almería, Sr. Gómez-Lama; al Vicepresidente de la Real Academia de Ciencias Veterinarias por la Sección de Almería, Sr. González Ramón y los Académicos Numerarios de esta Corporación Sres. Lidón Llamas y Parrón Carreño.

## INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

Los Anales se constituyen en el medio de difusión de la vida académica y de las actividades científicas de esta Real Corporación, en cumplimiento de uno de sus objetivos fundamentales, el de fomentar el estudio e investigación de las Ciencias Veterinarias.

### TRABAJOS Y ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Podrán remitirse para su publicación, exclusivamente, los trabajos que no hayan sido editados previamente en otras publicaciones, de cualquier naturaleza o contenido editorial.

El texto deberá ser redactado en español, e incluirá un resumen, siendo la extensión recomendada para los resúmenes de 12-15 líneas.

Se aconseja que la estructura de los trabajos sea la siguiente: Introducción, métodos, resultados, discusión/conclusiones, notas y referencias.

Las referencias bibliográficas se incluirán al final del texto, ordenadas según el orden de aparición o de cita en el texto, con numeración correlativa. La cita o llamada se hará presentando el número entre paréntesis.

Para cada referencia bibliográfica se detallará el nombre del autor o autores, el título del artículo o capítulo, nombre de la revista, libro o publicación, el número del volumen, números de la primera y última página y año de la publicación.

El documento digital del trabajo debe ser guardado en formato doc de Microsoft Word, sin incorporar gráficos, esquemas, diseños o imágenes, que serán guardadas aparte en formato JPEG, EPS, TIFF, BMP o PICT, con una resolución de 300 ppp (dpi).

Aunque no hay un límite de extensión, se recomienda un máximo de 15 páginas para los artículos y de 20 páginas para las revisiones.

Los autores, junto al trabajo enviado, adjuntarán una nota indicando su nombre y dirección completa, cargos y lugar de trabajo así como el teléfono y dirección de correo electrónico para su localización y contacto.

Los trabajos pueden ser remitidos a la redacción de **ANALES** por correo electrónico a: **administracion.racvao@insacan.org**











