

ANALES
de la
REAL ACADEMIA
DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE ESPAÑA



Premios 2024

2024

VOLUMEN XXXII Suplemento 1

Número 32

***ANALES DE LA
REAL ACADEMIA
DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE ESPAÑA***



Premios 2024

2024

VOLUMEN XXXII Suplemento 1

Número 32

**Los trabajos de este volumen corresponden
a los originales y correcciones efectuadas
por los propios autores**

**REAL ACADEMIA DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE ESPAÑA**

Dirección: C/ Maestro Ripoll, 8

Teléfono: 915 611 799

28006 MADRID

www.racve.es

racve@racve.es

ISSN: 1135-2795

Depósito legal: M. 10.260-1995

Maquetación e Impresión:
Real Academia de Ciencias Veterinarias de España

CONSEJO EDITORIAL

Presidente de la RACVE

Arturo Ramón Anadón Navarro

Vice-Presidente de la RACVE

Salvio Jiménez Pérez

Secretario General de la RACVE

Miguel Ángel Aparicio Tovar

Vicesecretaria

María del Carmen Cuéllar Cariñanos

Bibliotecario

Luis Ángel Moreno Fernández-Caparros

Sección 1ª.

Juan Carlos Illera del Portal

Sección 2ª.

José Vicente Tarazona Lafarga

Sección 3ª.

Raúl Sánchez Sánchez

Sección 4ª.

Francisco Antonio Rojo Vázquez

Sección 5ª.

Miguel Ángel Vives Valles

PREMIOS DE LA
REAL ACADEMIA
DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE ESPAÑA

VOL. XXXII	2024	Núm. 32 (Suplemento 1)
------------	------	---------------------------

SUMARIO

	Pág.
Convocatoria Premios de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España 2024	7
Ganadores de los Premios RACVE 2024	13
XVIII Premio “Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid”. Premiada: D. ^a María Magdalena Garijo Toledo Título trabajo: “Primer registro de mortalidad asociada a <i>angiostrongylus cantonesis</i> en primates no humanos en Europa”	19
XII Premio Andrés Pinaluba, S.A. “Carlos Luis de Cuenca y Esteban”. Premiada: D. ^a María Martínez Valladares Título trabajo: “Uso e impacto de los fármacos antihelmínticos en rumiantes bajo el contexto de sostenibilidad”	43
XI Premio Laboratorios Zendal. Premiado: D. Rodrigo Morchón García Título trabajo: “Estudio del proceso angiogénico como mecanismo de supervivencia de <i>Dirofilaria immitis</i> en el endotelio vascular”	69
XI Premio Fundación CESFAC “Miguel Ángel Díaz Yubero”. Premiada: D. ^a Adriana Recalde Garcete Título trabajo: “Capota de almendra: una materia prima para una nutrición sostenible”	111

XI Premio Fundación CESFAC “Carlos de Blas Beorlegui”. Premiado: D. Manuel Toledo Castillo Título trabajo: “Control de la salud intestinal mediante biomarcadores: clave de la sanidad en la producción porcina”	131
X Premio SUPER FEED-VETIA “Mariano Illera Martín”. Premiada: D. ^a Belén Crespo Cortés Título trabajo: “El uso de cannabinoides en investigación endocrinológica y oncológica”	157
V Premio Amigos de la Historia Veterinaria. Premiado: D. Jaume Vicent Jordá Moret Título trabajo: “La Alianza Veterinaria: una hemerografía inédita”	187
II Premio Laboratorios MEVET “Carlos Buxadé Carbó”. Premiada: D. ^a Lilia Gutiérrez Olvera Título trabajo: “Recuperación de la productividad de los huevos en gallinas ponedoras de segundo y tercer ciclo suplementándolas con una formación fitobiótica; más vida y más bienestar para estas aves”	223

PREMIOS DE LA REAL ACADEMIA DE CIENCIAS VETERINARIAS DE ESPAÑA 2024

CONVOCATORIA

La Real Academia de Ciencias Veterinarias de España convoca los siguientes premios para el año 2024:

1. XVIII Premio “Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid”

Tema: “Libre dentro del ámbito veterinario”. Dotación: 3.000 euros y diploma.

2. XII Premio Andrés Pintaluba, S.A. “Carlos Luis de Cuenca y Esteban”

Tema: “Sustancias para la Alimentación Animal”. Dotación: 1.500 euros y diploma.

3. XI Premio Laboratorios Zendal

Tema: “Libre dentro del ámbito veterinario”. Asociación Iberoamericana de Academias de ciencias Veterinarias (AIACIVET). Dotación: 3.500 euros y diploma.

4. XI Premio Fundación CESFAC “Miguel Ángel Díaz Yubero”

Tema: “Nutrición y sostenibilidad”. Dotación: 2.000 euros, diploma y publicación del trabajo en la revista Mundo CESFAC.

5. XI Premio Fundación CESFAC “Carlos de Blas Beorlegui”

Tema: “Nutrición, sanidad y bienestar animal”. Dotación: 2.000 euros, diploma y publicación del trabajo en la revista Mundo CESFAC.

6. X Premio SUPER FEED-VETIA “Mariano Illera Martín”

Tema: “Endocrinología y nutrición en veterinaria”. Dotación: 4.000 euros y diploma.

7. V Premio Amigos de la Historia Veterinaria

Tema: “Historia de la Veterinaria”. Dotación: 2.600 euros y diploma.

8. V Premio Grupo Omega de Nutrición Animal

Tema: “Alternativas a la utilización de antimicrobianos en alimentación animal”. Dotación: 1.500 euros y diploma.

9. II Premio Laboratorios MEVET “Carlos Buxadé Carbó”

Tema: “El bienestar animal en las explotaciones avícolas intensivas”. Dotación: 2.000 euros y diploma.

BASES GENERALES

1. Los autores, personas físicas españolas o extranjeras, tanto individuales como en grupo, podrán presentar un solo trabajo a la presente convocatoria y a una sola categoría. En ningún caso se identificará, implícita o explícitamente, el autor o autores del trabajo. Los trabajos presentados al Premio “Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid” deberán estar firmados por un veterinario y si es un equipo, alguno de los miembros del mismo deberá ser veterinario.
2. Los trabajos que opten a los premios serán de naturaleza experimental o de revisión, **inéditos**, originales, redactados específicamente para esta convocatoria y no podrán ser presentados a otros premios.
 - 2.1. Como estímulo al análisis del estado de las Ciencias Veterinarias, se apreciarán especialmente las revisiones sobre un contexto

científico propio (pasado, presente y futuro de una línea de investigación) relacionado con las ciencias veterinarias y afines.

3. Formato: En español, en letra Arial 12 puntos en formato UNE A-4, a espacio y medio y presentados en formato PDF. Se recomienda que los artículos de naturaleza experimental no superen las 10.000 palabras. Las revisiones no deben superar las 20.000 palabras, excluyendo en ambos casos, ilustraciones, fotografías y esquemas. En todo caso el tamaño del trabajo no ha de exceder de 10 MB.

Se recomienda, que los trabajos experimentales, contengan los siguientes apartados:

- a. Título conciso. Deberá definir el contenido de la investigación con el menor número de palabras posible.
- b. Título en inglés.
- c. Resumen en español e inglés, de un máximo de 250 palabras.
- d. Introducción, breve y documentada, donde se limitará con claridad la hipótesis desarrollada o los fines y objetivos que se persiguen.
- e. Exposición del material y métodos empleados.
- f. Resultados, discusión crítica y conclusiones.
- g. Bibliografía citada.

En los trabajos de revisión, los apartados deben ser:

- a. Título conciso. Deberá definir el contenido de la investigación con el menor número de palabras posible.
- b. Título en inglés.
- c. Resumen en español e inglés, de un máximo de 250 palabras.
- d. Introducción breve, donde se delimite el interés del motivo científico revisado y su importancia práctica.
- e. Amplia revisión del origen, evolución temporal y situación actual del tema.
- f. Discusión crítica y conclusiones.

- g. Bibliografía citada y notas aclaratorias.
4. La fecha límite para la entrega de los trabajos es el día 4 de noviembre de 2024 antes de las 24 horas.
 5. Los trabajos serán enviados a la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España por medios telemáticos. A tal fin se ha abierto una página especial en el portal de la RACVE (<http://racve.es/premios-racve-2024>). En dicha página los participantes en la convocatoria deberán rellenar los tres únicos campos que aparecen en el mismo: Premio al que concursan; **Lema** del trabajo presentado compuesto por un **máximo de tres palabras** (Solo el lema, no el título del trabajo) y un número de teléfono móvil, para preservar la confidencialidad y poder contactar con los premiados en su momento. El autor o autor principal deberá enviar un correo a la dirección de correo electrónico (plicaracve@racve.es) en el que pondrá en la casilla de “Asunto” el Lema del trabajo presentado y en el cuerpo del correo el nombre y apellidos del autor y/o autores del trabajo.
 6. Se enviará a los concursantes un acuse de recibo del trabajo presentado.
 7. La concesión de un premio de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España supondrá que el autor o autores no podrá presentar un nuevo trabajo a la misma categoría hasta pasadas dos convocatorias.
 8. No podrán ser concedidos dos premios a la misma persona, equipo o grupo, en la misma convocatoria.
 9. Los trabajos premiados pasan a ser propiedad de la Academia y se someterán a la política de publicación de los Anales. A tal fin se requerirá a los autores una declaración formal de cesión de los derechos de publicación e imagen a la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España y a los patrocinadores del premio.
 10. Los Académicos de Número no podrán figurar como autores de los trabajos presentados a este Concurso Científico.
 11. Los premios serán evaluados por los académicos de la RACVE. Los trabajos presentados al Premio Amigos de la Historia Veterinaria serán evaluados por la Sección 5ª de Historia de la Veterinaria. Para cada categoría se concederá el premio a un solo trabajo, pudiéndose

otorgar un Accésit a otro de los trabajos presentados o declarar desierto el premio. El Accésit no llevará consigo dotación económica.

12. El fallo se hará público antes del 15 de diciembre de 2024.
13. En el caso de que sean varios los autores del trabajo premiado, la nominación e importe en metálico y diploma, se entregará al primer firmante, así como, la presentación del trabajo premiado. El resto de los participantes del trabajo recibirán un certificado acreditativo del premio otorgado.
14. La entrega de los premios se realizará en sesión pública extraordinaria de acuerdo con el Protocolo de la Academia, en enero de 2025 en fecha a determinar que se anunciará en la página web de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España y en otros medios. En el acto de entrega de premios cada uno de los premiados tendrá que exponer un resumen de su trabajo, en un tiempo máximo de 5 minutos.
15. Todos los premios serán acreditados mediante el diploma correspondiente, expedido por la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España.
16. No se mantendrá correspondencia con los concursantes.
17. La participación en esta convocatoria implica la aceptación de las bases.

GANADORES DE LOS PREMIOS RACVE 2024

1. XVIII Premio “Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid”

Premiada: D.^a María Magdalena Garijo Toledo, *Catedrática de la Universidad CEU Cardenal Herrera*

Título trabajo: “**Primer registro de mortalidad asociada a *angiostrongylus cantonesis* en primates no humanos en Europa**”

Coautores:

Pedro María Alarcón Elbal, *Profesor Universidad CEU Cardenal Herrera*

Estefanía Montero Cortijo, *Profesora de la Universidad CEU Cardenal Herrera*

Ana Elena Ahuir Baraja, *Profesora de la Universidad CEU Cardenal Herrera*

Agustín Barragán Hernández, *Profesor Universidad CEU Cardenal Herrera*

David Viana Martín, *Profesor Universidad CEU Cardenal Herrera*

Joaquín Ortega Porcel, *Profesor Universidad CEU Cardenal Herrera*

Daniel Bravo Barriga, *Profesor de la Universidad de Córdoba*

José Sansano-Maestre, *Profesor de la Universidad Católica de Valencia*

M.^a Dolores Carbonell Montes, *Veterinaria del Bioparc Valencia*

2. **XII Premio Andrés Pinaluba, S.A. “Carlos Luis de Cuenca y Esteban”**

Premiada: D.^a María Martínez Valladares, *Científica Titular del CSIC*

Título trabajo: **“Uso e impacto de los fármacos antihelmínticos en rumiantes bajo el contexto de sostenibilidad”**

3. **XI Premio Laboratorios Zendal**

Premiado: D. Rodrigo Morchón García, *Profesor Titular, Universidad de Salamanca*

Título trabajo: **“Estudio del proceso angiogénico como mecanismo de supervivencia de *Dirofilaria immitis* en el endotelio vascular”**

Coautores:

Elena Carretón Gómez, *Profesora Titular, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria*

Manuel Collado Cuadrado, *Estudiante predoctoral, Universidad de Salamanca*

Iván Rodríguez Escolar, *Estudiante predoctoral, Universidad de Salamanca*

Alfonso Balmori de la Puente, *Investigador postdoctoral Margarita Salas*

Claudia Alarcón-Torrecillas, *Investigador postdoctoral*

4. **XI Premio Fundación CESFAC “Miguel Ángel Díaz Yubero”**

Premiada: D.^a Adriana Recalde Garcete, *Estudiante de doctorado en Nutrición animal, UPM*

Título trabajo: “Capota de almendra: una materia prima para una nutrición sostenible”

Coautoras:

María Dolores Carro, *Catedrática de Universidad, Departamento de Producción Agraria, UPM*

Trinidad de Evan, *Contratada Posdoctoral con cargo a Proyecto de Generación de Conocimiento 2021 (Referencia PID2021-124648 OB-C21)*

5. XI Premio Fundación CESFAC “Carlos de Blas Beorlegui”

Premiado: D. Manuel Toledo Castillo, *Doctor en Veterinaria y Veterinario jefe de producción, Agropecuaria Casas Nuevas SA*

Título trabajo: “Control de la salud intestinal mediante biomarcadores: clave de la sanidad en la producción porcina”

Coautores:

Anabel Fernández Bravo, *Veterinaria de producción, Agropecuaria Casas Nuevas SA*

Andrea Martínez Martínez, *Veterinaria de producción, Agropecuaria Casas Nuevas SA*

Elena Goyena Salgado, *Doctora en Medicina veterinaria por la Universidad de Murcia*

Emilio José Ruíz Fernández, *Veterinario de producción, Agropecuaria Casas Nuevas SA*

Simón García Legaz, *Veterinario de producción, Agropecuaria Casas Nuevas SA*

José Manuel Pinto Carrasco, *Ingeniero agrónomo, SAT Hnos. Chico SL*

6. X Premio SUPER FEED-VETIA “Mariano Illera Martín”

Premiada: D.^a Belén Crespo Cortés, *Estudiante de doctorado, facultad de Veterinaria, UCM*

Título trabajo: “El uso de cannabinoides en investigación endocrinológica y oncológica”

7. **V Premio Amigos de la Historia Veterinaria**

Premiado: D. Jaume Vicent Jordá Moret, *Profesor adjunto Universidad Cardenal Herrera CEU - Facultad de Veterinaria*

Título trabajo: **“La Alianza Veterinaria: una hemerografía inédita”**

Coautora:

Dra. Ana Navarro Serra, *Profesora adjunta Universidad Cardenal Herrera CEU - Facultad de Veterinaria*

8. **V Premio Grupo Omega de Nutrición Animal**

Desierto

9. **II Premio Laboratorios MEVET “Carlos BUXADÉ CARBÓ”**

Premiada: MVZ, M en C Dra. Lilia Gutiérrez Olvera, *Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Profesora Titular TC- Farmacología Veterinaria*

Título trabajo: **“Recuperación de la productividad de los huevos en gallinas ponedoras de segundo y tercer ciclo suplementándolas con una formación fitobiótica; más vida y más bienestar para estas aves”**

Coautor:

MVZ PhD Dr. Héctor Salvador Sumano López, *Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Profesor Titular TC- Farmacología Veterinaria*

**XVIII PREMIO “ILUSTRE COLEGIO OFICIAL DE
VETERINARIOS DE MADRID”**

**PRIMER REGISTRO DE MORTALIDAD ASOCIADA A
ANGIOSTRONGYLUS CANTONESIS EN PRIMATES NO
HUMANOS EN EUROPA**

MARÍA MAGDALENA GARIJO TOLEDO¹

PEDRO MARÍA ALARCÓN ELBAL²

ESTEFANÍA MONTERO CORTIJO³

ANA ELENA AHUIR BARAJA⁴

AGUSTÍN BARRAGÁN HERNÁNDEZ⁵

DAVID VIANA MARTÍN⁶

JOAQUÍN ORTEGA PORCEL⁷

DANIEL BRAVO BARRIGA⁸

JOSÉ SANSANO-MAESTRE⁹

M.^a DOLORES CARBONELL MONTES¹⁰

RESUMEN

Entre diciembre de 2020 y marzo de 2022, se documentaron tres casos de meningoencefalitis mortal en dos lémures de frente roja (*Eulemur rufus*) y un lémur de cola anillada (*Lemur catta*) en un zoológico del

¹ Catedrática de la Universidad CEU Cardenal Herrera.

² Profesor Universidad CEU Cardenal Herrera.

³ Profesora de la Universidad CEU Cardenal Herrera.

⁴ Profesora de la Universidad CEU Cardenal Herrera.

⁵ Profesor Universidad CEU Cardenal Herrera.

⁶ Profesor Universidad CEU Cardenal Herrera.

⁷ Profesor Universidad CEU Cardenal Herrera.

⁸ Profesor de la Universidad de Córdoba.

⁹ Profesor de la Universidad de Católica de Valencia.

¹⁰ Veterinaria del Bioparc Valencia.

este de España¹¹. Los análisis post-mortem revelaron una congestión moderada en las meninges del cerebro en todos los casos. Se observaron áreas multifocales de hemorragia en uno de ellos, principalmente en el cerebelo y el tronco encefálico. El examen histopatológico mostró alteraciones hemorrágicas agudas y necróticas, junto con meningoencefalitis eosinofílica y/o histiocítica moderada, con manguitos perivasculares y gliosis. Se encontraron numerosas larvas de nematodos en las meninges, el cerebro y la médula espinal, con o sin inflamación, hemorragia y necrosis asociadas. Teniendo en cuenta las especies hospedadoras afectadas, la morfología de los nematodos y su localización anatómica se sospechó que *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) podría ser el agente causal. Para corroborarlo, se llevaron a cabo estudios filogenéticos basados en el gen ITS1 que confirmaron la identificación de este parásito zoonótico y su relación con secuencias ya registradas procedentes de Baleares y Canarias. Esta es la primera detección de angiostrongilosis en primates no humanos en Europa y representa uno de los pocos casos descritos en la región Paleártica hasta la fecha. La profundización de la investigación sobre esta zoonosis es crucial para comprender su propagación en España, evaluar los riesgos para la salud pública y desarrollar medidas de control efectivas de cara a mitigar los brotes y prevenir casos humanos y animales.

ABSTRACT

Between December 2020 and March 2022, three cases of fatal meningoencephalitis were documented in two red-fronted brown lemurs (*Eulemur rufus*) and a ring-tailed lemur (*Lemur catta*) at a zoo in eastern Spain. Post-mortem analyses revealed moderate congestion in the meninges of the brain in all cases. Multifocal areas of hemorrhage were observed in one lemur, primarily in the cerebellum and brainstem. Histopathological examination showed mainly acute hemorrhagic and necrotic changes, along with moderate eosinophilic and/or histiocytic meningoencephalitis, with perivascular cuffing, and gliosis. Numerous nematode larvae were found in the meninges, brain, and spinal cord, with or without associated inflammation, hemorrhage, and necrosis. Considering the affected host species, nematode morphology, and its anatomical localization, *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) was

¹¹ En el manuscrito se ha optado por utilizar el término "este de España" para referirse a la ubicación geográfica, evitando una designación más precisa con el fin de proteger la identidad del grupo de trabajo responsable del estudio.

suspected as the causative agent. Phylogenetic studies based on the ITS1 gene confirmed the initial suspicion of this zoonotic parasite and its relation to sequences from the Balearic and Canary Islands. This is the first detection of angiostrongylosis in non-human primates in Europe and it represents one of the few occurrences reported in the Palearctic region to date. Deepening research on this zoonotic parasite is crucial to understanding its spread in Spain, assessing public health risks, and developing effective control measures to mitigate outbreaks and protect human and animal health.

1. INTRODUCCIÓN

Angiostrongylus cantonensis (Chen, 1935) (Rhabditida: Metastrongylidae) es un parásito zoonótico emergente que plantea un importante problema de Salud Pública mundial. Aunque el parásito es originario del sudeste asiático, se ha propagado a nivel mundial, especialmente en ecosistemas insulares frágiles. Comúnmente conocido como el “gusano pulmonar de las ratas”, este nematodo metastrongiloide infecta principalmente a roedores, en particular a las especies sinantrópicas *Rattus norvegicus* y *Rattus rattus*, que actúan como sus hospedadores definitivos (Kottwitz *et al.*, 2014). Otras especies de aves, así como caballos, perros y primates no humanos (PNH) pueden actuar como hospedadores accidentales (Morgan *et al.*, 2021). Todos ellos, al igual que los humanos, suelen infectarse a través de la ingestión de caracoles infectados, o incluso su baba, que adquieren el parásito principalmente a través del consumo de vegetales contaminados con las heces de ratas infectadas (Rollins *et al.*, 2023). Las larvas de tercer estadio siguen siendo infectantes en hospedadores paraténicos como moluscos, cangrejos o gambas (Jarvi y Prociv, 2021).

Este parásito es actualmente reconocido como la principal causa de meningitis eosinofílica humana en todo el mundo, también llamada neuroangiostrongilosis (NAS), que puede ser potencialmente mortal en algunos casos (Cowie *et al.*, 2022). Los casos de *A. cantonensis* se registran predominantemente en regiones endémicas. No obstante, el crecimiento del turismo internacional, el aumento de los desplazamientos individuales y los cambios en los comportamientos de riesgo sugieren una posible expansión de casos esporádicos en humanos en países no endémicos (Brummaier *et al.* 2019) (**Figura 1**).

En los PNH, el primer caso de infección se notificó en dos macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) importados de Indonesia a Japón

(Kodama *et al.*, 1981). Desde entonces, se han documentado otros casos mortales en las Américas, especialmente en el sureste de Estados Unidos y en Australia (Kottwitz *et al.*, 2014; Walden, 2020). España se considera una zona endémica, con estudios recientes que informan de la presencia de ejemplares adultos de *A. cantonensis* en roedores sinantrópicos (*Rattus rattus*, *R. norvegicus* y *Mus musculus*) de Tenerife (Islas Canarias) y Valencia (Foronda *et al.*, 2010; Martín-Alonso *et al.*, 2011; Galán-Puchades *et al.*, 2022). Además, se han encontrado estadios larvarios en erizos de Mallorca (Islas Baleares) como hospedadores accidentales (Paredes-Esquivel *et al.*, 2019), en lagartijas como hospedadores paraténicos de las Islas Canarias (Anettová *et al.*, 2022), y en caracoles como hospedadores intermediarios de las Islas Canarias (Martín-Alonso *et al.*, 2011; Martín-Carrillo *et al.*, 2023), Mallorca (Jaume-Ramis *et al.*, 2023) y Valencia (Fuentes *et al.*, 2024). El primer caso clínico europeo en humanos fue el de un turista cubano en Cataluña, aunque este se consideró un caso importado debido al consumo de langostinos poco cocidos (Valerio Salient *et al.*, 2021).

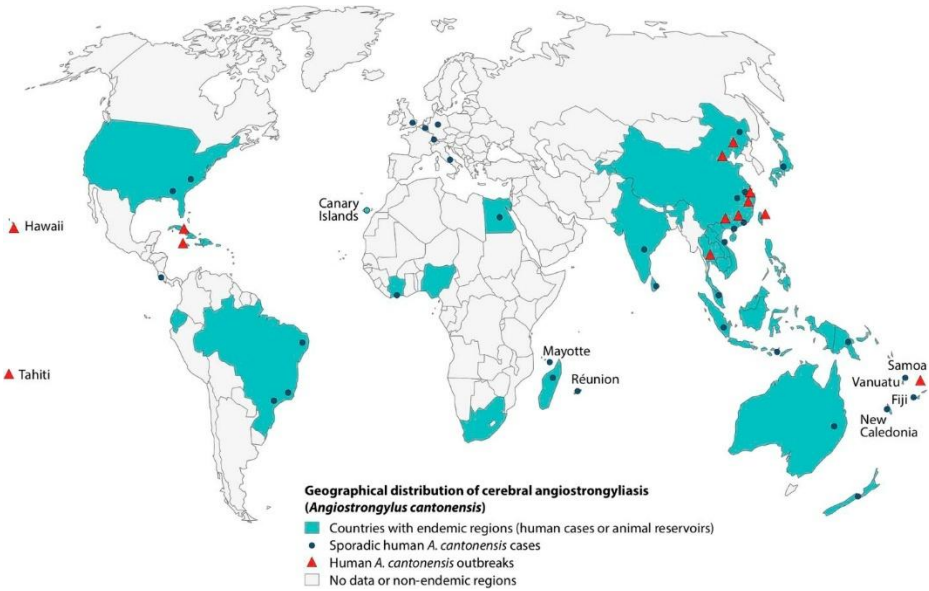


FIGURA 1. Distribución geográfica de la neuroangiostrongilosis. Fuente: Brummaier *et al.* (2019).

En este estudio, se describe la infección letal de *A. cantonensis* en tres lémures: dos lémures de frente roja (*Eulemur rufus*) y un lémur de cola anillada (*Lemur catta*) mantenidos en cautividad en un zoológico de

España. Estos casos representan las primeras muertes por angiostrongilosis en PNH en Europa y los primeros casos de esta parasitosis en ambas especies en todo el mundo.

2. OBJETIVOS

En vista de los antecedentes anteriormente expuestos, los objetivos del presente estudio fueron:

1. **Confirmar la identificación de *Angiostrongylus cantonensis*** como agente causal de la mortalidad en primates no humanos en cautividad en Europa mediante estudios filogenéticos de alta precisión.
2. **Ampliar el conocimiento sobre la angiostrongilosis producida por *Angiostrongylus cantonensis*** y actualizar su patrón de distribución en primates no humanos en el mundo, evaluando su potencial impacto en salud pública.
3. **Diseñar estrategias y proponer medidas de control efectivas** para reducir el riesgo de brotes de angiostrongilosis, protegiendo la salud de humanos y animales en núcleos zoológicos con características similares al del estudio.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Selección de casos, datos clínicos y patología

Entre diciembre de 2020 y febrero de 2022, ocurrieron tres casos de meningitis mortal en un zoológico del este de España. Los dos primeros casos se dieron en lémures de frente roja, mientras que el tercero fue un lémur de cola anillada (**Tabla 1**). Los dos primeros lémures habían nacido en el zoológico, mientras que el lémur de cola anillada fue donado por un centro del Reino Unido en mayo de 2007. El primer caso murió después de 18 días de presentar signos neurológicos. El segundo y tercer caso fueron sacrificados humanitariamente debido a parálisis severa e incoordinación que presentaban, respectivamente.

Todos los individuos compartían el mismo recinto en el zoológico. En él, los animales se mueven libremente por las instalaciones, tanto en el suelo como en árboles. Por lo general, se alimentan con frutas, verduras y pienso. El control de plagas se lleva a cabo regularmente en todo el local por parte de una empresa privada, y se centra, principalmente, en roedores e insectos, sobre todo cucarachas y mosquitos.

Caso No.	Especie	Edad (años)	Sexo	Causa de la muerte	Hallazgos clínicos	Días de signos clínicos	Tratamiento antihelmíntico	Fecha de fallecimiento
1	<i>Eulemur rufus</i>	8	Hembra	Natural	Cojera anterior derecha, apatía, parálisis posterior	18	Ninguno	08/10/2020
2	<i>Eulemur rufus</i>	6	Macho	Eutanasia	Descoordinación, parálisis posterior total	13	Albendazol el día 6 (20 mg/kg/día, 5 días consecutivos)	22/12/2020
3	<i>Lemur catta</i>	28	Macho	Eutanasia	Descoordinación, cae hacia el lado izquierdo	14	Ninguno	16/02/2022

TABLA 1. Historia clínica de los tres lémures con angiostrongilosis del zoológico de estudio.

3.2. Análisis laboratoriales

Se realizó una necropsia completa a cada animal en la que se tomaron muestras de pulmón, corazón, tráquea, esófago, estómago, intestino, páncreas, hígado, bazo, riñón, glándula suprarrenal, ganglios linfáticos y cerebro. Todas ellas se fijaron en formol tamponado al 10 % y posteriormente se montaron en parafina, se procesaron para el examen histológico y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

El sistema nervioso se examinó sistemáticamente bajo el estereomicroscopio (SMZ-171-TLED). Los nematodos y fragmentos encontrados fueron conservados en etanol al 70 % hasta su posterior identificación.

Para el análisis molecular, se extrajo el ADN del tejido de médula ósea fijado en formol e incluido en parafina utilizando el kit de tejido QIAamp DNA FFPE, siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras de ADN se mantuvieron a -80 °C hasta su posterior análisis.

Para la amplificación inicial por PCR, se utilizaron cebadores universales de nematodos metastrongílidos dirigidos a toda la región interna transcrita del espaciador 1 (ITS1), siguiendo protocolos ya publicados (Izquierdo-Rodríguez *et al.*, 2023). Posteriormente, se realizó una segunda PCR empleando cebadores específicos de la especie diseñados para *A. cantonensis*/*A. mackerrasae* y dirigidos a la región ITS1: ITS1_Canto_F3: AACAACTAGCATCATCTACGTC y ITS1_Canto_R1: CATCCTGTGTATCTCGTTCC (Izquierdo-Rodríguez *et al.*, 2023; Qvarnstrom *et al.*, 2010). Se incluyeron ADN genómico de *A. cantonensis* y agua destilada libre de ADN como controles positivos y negativos, respectivamente. Los productos de amplificación se visualizaron en una electroforesis en gel de agarosa al 2 % en tampón 1× Tris-Borato-EDTA y se visualizaron utilizando luz

ultravioleta tras la tinción con RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology Inc., Sungnum, Corea).

Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit de limpieza de gel y PCR QIAquick® (Qiagen, Hilden, Alemania) y posteriormente fueron secuenciados por la empresa StabVida (Caparica, Portugal). Las secuencias se obtuvieron en ambas direcciones y se generó una secuencia de consenso utilizando el Editor de Alineación de Secuencias de BioEdit (versión 7.2.5, Carlsbad, CA, EE. UU.). La identidad a nivel de especie se determinó con un umbral de >99 % de identidad utilizando BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; opción Mega-BLASTn). Las secuencias de nucleótidos generadas durante este estudio se depositaron en el Banco de Datos de ADN de Japón (DDBJ: <https://www.ddbj.nig.ac.jp>).

3.3. Análisis filogenéticos

Se incluyeron un total de cinco especies de *Angyostrongilus* (23 secuencias) en el árbol filogenético, junto con *Crenosoma striatum* (KP941434) como grupo externo. Las reconstrucciones filogenéticas se llevaron a cabo utilizando el criterio de optimización de máxima verosimilitud, empleando el modelo TPM2+F+I definido por IQ-TREE (Trifinopoulos *et al.*, 2016) y teniendo en cuenta el criterio de información Akaike. La robustez de los árboles de ML resultantes se evaluó utilizando SH-aLRT (Shimodaira-Hasegawa-like approximate Probability Ratio Test) y un arranque con 5000 repeticiones de los datos de la secuencia original. Finalmente, el árbol se visualizó utilizando FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

3.4. Recopilación histórica de casos en PNH

Para la recopilación bibliográfica sobre angiostrongilosis en PNH, se consultaron bases de datos especializadas y literatura gris, siguiendo una búsqueda en dos etapas. En primer lugar, se realizó una búsqueda a nivel global para obtener una perspectiva amplia de los registros disponibles. Posteriormente, el enfoque se dirigió hacia Europa y, finalmente, hacia el contexto específico de España. Se utilizaron para ellos diversas palabras clave, tanto de forma individual como combinadas: “*Angiostrongylus*”, “angiostrongyliasis”, “angiostrongylosis”, “eosinophilic meningitis”, “meningitis/encephalitis”, “nematode”, “non-human primates”, “parasites” y “parasitic infections”.

Los registros obtenidos fueron verificados y analizados para extraer la máxima información posible, incluyendo la identificación del parásito y

su correspondencia con las especies hospedadoras. Cada registro fue georeferenciado mediante centroides de la procedencia de los PNH afectados, utilizando el software QGIS (versión 3.34 LTR). Esto permitió mapear la distribución geográfica, facilitando la visualización y apoyando futuros estudios epidemiológicos.

4. RESULTADOS

4.1. Hallazgos anatomopatológicos

Tras el examen macroscópico, todos los casos (3/3) mostraron una congestión moderada difusa de las meninges, tanto en el cerebro, como en el cerebelo. En un caso, las áreas rojizas irregulares multifocales de 3-4 mm se localizaron principalmente en el cerebelo y el tronco encefálico (**Figura 2a**). Se encontraron varios fragmentos de nematodos debajo de las meninges y alrededor de los vasos sanguíneos de los casos 1 y 3 (**Figura 2b**). Debido a su deficiente integridad, la identificación de los nematodos no fue posible bajo el microscopio.

Histológicamente, las áreas del cerebro más afectadas fueron las meninges (3/3), el cuerpo estriado (3/3), el cerebelo (3/3), el sistema ventricular (3/3), el tronco encefálico (2/3) y el colículo cerebral (1/2). La abundancia de los parásitos en las diferentes regiones fue muy variable, y en ocasiones se asociaron o no a hemorragias, necrosis e inflamación (**Figura 2c**). La hemorragia se caracterizó por una extravasación moderada a grave de eritrocitos sin hemosiderina (**Figura 2d-e**). La necrosis, observada con frecuencia, se caracterizó por rarefacción, tanto en la sustancia blanca, como en la sustancia gris cortical, lo que resultó en la pérdida de la arquitectura tisular, desechos celulares dispersos y cariorrexis. Además, se observó edema, junto con infiltración de numerosas células de Gitter que mostraban abundante citoplasma espumoso y restos fagocitados, acompañados de algunos linfocitos y células plasmáticas (**Figura 2e**). En la periferia de las áreas de rarefacción, se observó esponjosidad caracterizada por la vacuolización del neuropilo, aunque raramente rodeada de células gliales (gliosis). En los casos de inflamación, ésta se caracterizó principalmente por acúmulo de eosinófilos, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos y, en raras ocasiones, células gigantes (**Figura 2f-g**). Ocasionalmente se observó un manguito perivascular, con una expansión del espacio de Virchow-Robins debido a las capas concéntricas de macrófagos epitelioides, linfocitos y células plasmáticas (**Figura 2h**).

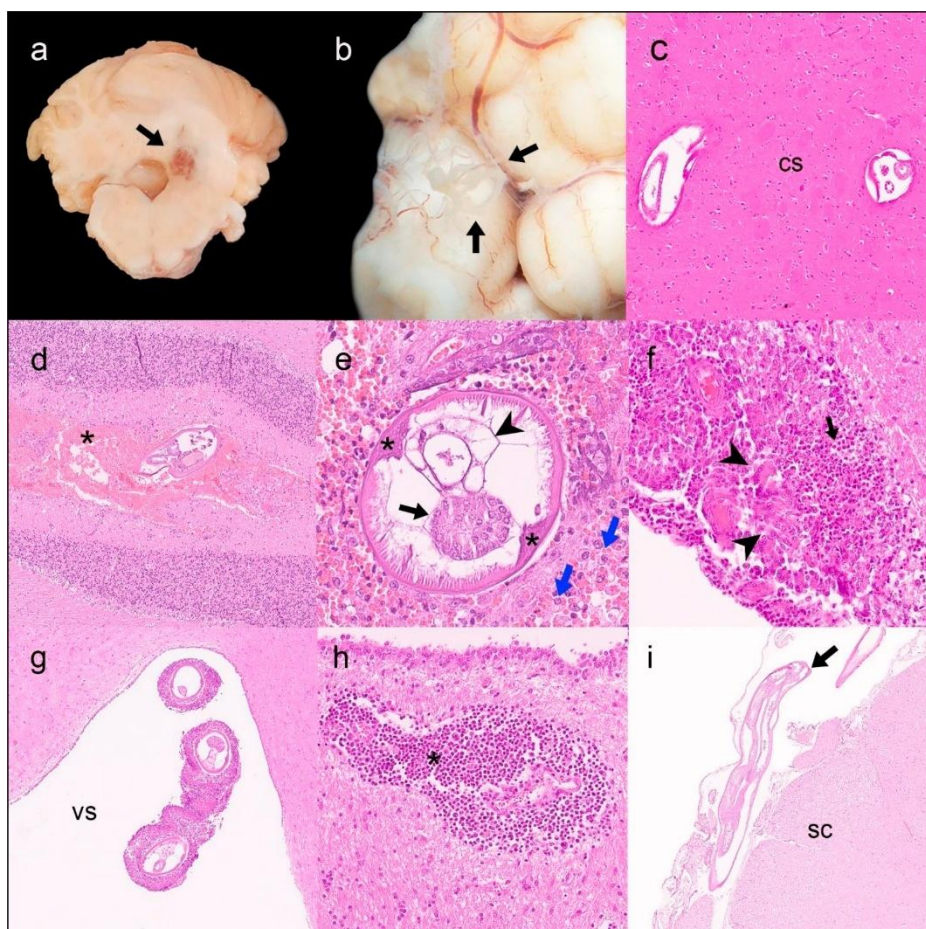


FIGURA 2. Hallazgos macroscópicos e histológicos asociados con *Angiostrongylus cantonensis* en lémures. a) Área irregular de necrosis y hemorragia de 3-4 mm situada entre el cerebelo y el tronco encefálico (flecha). b) Larvas de nematodos localizadas en las meninges del cerebelo (flecha). c) Cuerpo estriado. Dos nematodos en secciones transversales sin reacción patológica (hemorragia, necrosis y/o inflamación). Hematoxilina y eosina (HE). d) Cerebelo. Hemorragia grave (asterisco) asociada con la migración de larvas de nematodos. HE. e) Colículo cerebral. Área de necrosis con rarefacción del neuropilo, gran número de células de Gitter (flecha), vacuolización y hemorragia (*). Corte transversal de un nematodo que muestra cutícula, musculatura polmyaria-coelomiaria, cordones hipodérmicos accesorios basófilos, pseudoceloma, intestino y canal genital. f) Meninges. Focos de inflamación compuestos por eosinófilos (flecha), células gigantes multinucleadas (punta de flecha), neutrófilos y menos linfocitos y células plasmáticas. HE. g) Sistema ventricular. Múltiples cortes transversales de nematodos con reacción inflamatoria eosinofílica a su alrededor. HE. h) Sistema ventricular. Manguito perivascular (asterisco) con expansión del espacio de Virchow-Robins por macrófagos epitelioides, linfocitos y células plasmáticas. HE. i) Médula espinal. Corte longitudinal del nematodo en meninges sin lesiones patológicas. HE. CS: cuerpo estriado; VS: sistema ventricular; SC: médula espinal.

En la médula espinal cervical se observaron parásitos a nivel de las leptomeninges (**Figura 2i**). Había vainas de mielina dilatadas dispersas que contenían espacio libre, axones eosinofílicos (esferoides) hinchados, así como restos celulares y células de Gitter con citoplasma espumoso (elipsoides o cámaras de digestión). Los hallazgos histológicos se resumen en la **Tabla 2**.

Cerebro								Médula espinal			Otras lesiones
Caso No.	Localización del parásito	Meningitis	Hemorragia	Necrosis	Células de Gitter	Inflamación eosinofílica	Manguitos perivasculares	Localización del parásito	Meningitis	Degeneración axonal	
1	Meninges, cuerpo estriado, cerebelo	+	++	++	++	+	+	NE	NE	NE	Congestión pulmonar moderada; glucogenosis hepática
2	Meninges, cuerpo estriado, cerebelo, tronco encefálico, colículo cerebral	+	++	++	+	-	-	Meninges	+	+	Glucogenosis hepática
3	Meninges, cuerpo estriado, cerebelo, tronco encefálico	++	+++	+++	++	+	+	NE	NE	NE	Congestión pulmonar y hepática moderada; glucogenosis hepática

+: leve, ++: moderada, +++: severa, ND: No examinado

TABLA 2. Características patológicas en los tres lémures con angiostrongilosis del zoológico de estudio.

4.2. Hallazgos parasitológicos

El examen microscópico de las secciones teñidas con H-E de los tres animales reveló larvas con un diámetro que oscilaba entre 150 y 200 μm de diámetro. Las larvas presentaban una cutícula eosinófila lisa y delgada, musculatura polimiaria-celomiaria, cordones hipodérmicos accesorios basófilos, un pseudoceloma, un tracto digestivo compuesto por pocas células multinucleadas y un canal genital (**Figura 2e**). Estas características eran compatibles con nematodos inmaduros de la superfamilia Metastrongyloidea. En base a una combinación de características morfológicas, especies hospedadoras y localización anatómica, se sospechó que la especie podría ser *A. cantonensis*.

4.3. Análisis moleculares

Las tres muestras de PNHs dieron positivo por PCR. Sin embargo, solo dos produjeron bandas adecuadas para la secuenciación tras la electroforesis. Tras la purificación, ambas muestras fueron secuenciadas exitosamente, confirmando la identidad de *A. cantonensis* con una similitud

nucleotídica del 99,6 % al 100 % al comparar con secuencias de referencia de GenBank (OR119902 y OR119903). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos DDBJ (accesos [LC819639-40]). Además, el análisis filogenético demostró que estas secuencias se agrupan junto con otras de *A. cantonensis* y *A. mackerrasae* procedentes de España, Estados Unidos y Australia, lo cual respalda la identificación y la relación genética entre poblaciones de diferentes regiones (**Figura 3**).

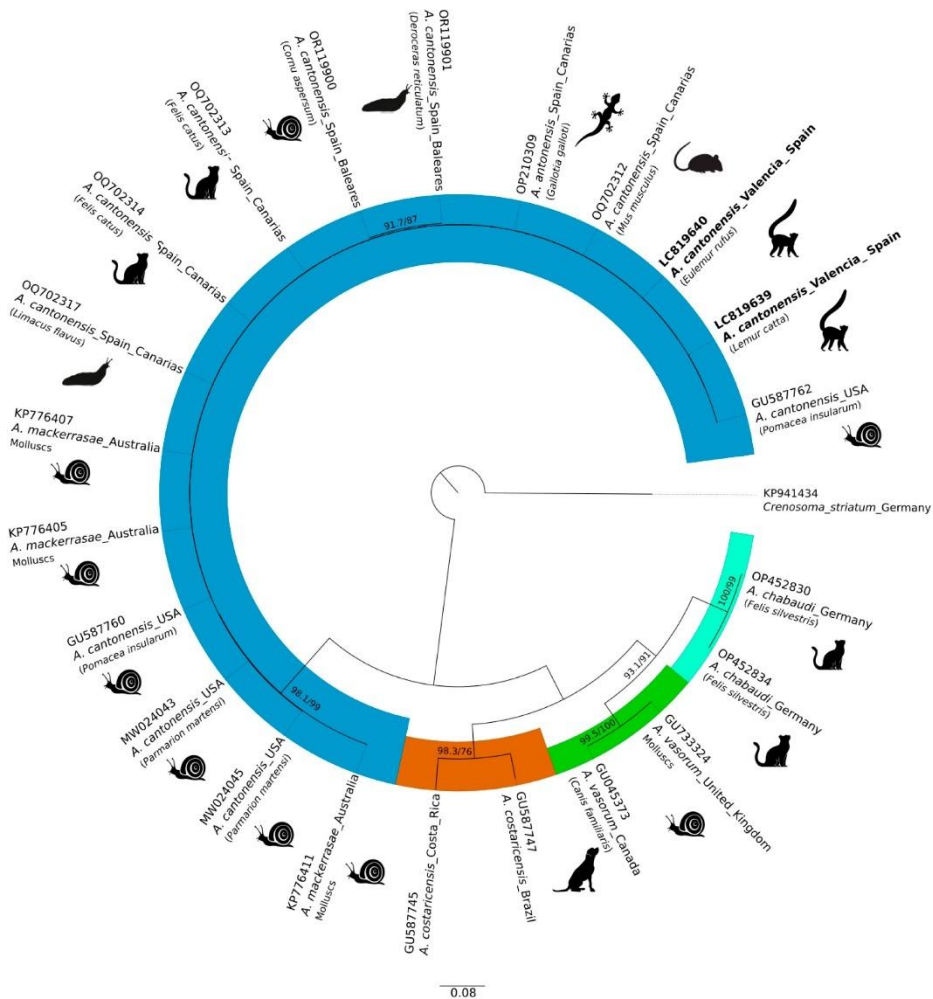


FIGURA 3. Árbol filogenético circular de *Angiostrongylus* spp. basado en el análisis de 23 secuencias de genes ITS1 de nucleótidos utilizando el método de máxima verosimilitud. Los valores de Bootstrap >75% en 5000 repeticiones se indican en nodos de rama específicos. La barra indica el número medio de sustituciones por sitio. El árbol se enraizó utilizando *Crenosoma striatum* (KP941434) como grupo externo. Las secuencias obtenidas durante este estudio se muestran en **negrita** (LC819639 y LC819640).

4.4. Distribución mundial e historia clínica de casos en PNH registrados

La **Tabla 3** presenta un análisis detallado de casos de diversas especies de primates, en su mayoría bajo el cuidado de zoológicos o propietarios privados, ubicados en diferentes países como Indonesia, Australia y Estado Unidos. En este contexto, se observa una notable diversidad de especies, desde *Macaca fascicularis* hasta *Cebus capucinus*, lo que resalta la extensión del problema en distintas ubicaciones y tipos de primates. Los reportes en Norteamérica y Australia podrían indicar una mayor vigilancia y documentación en estas regiones, lo cual permite caracterizar mejor los patrones de enfermedades en animales en cautiverio, a la que habría que incluir España como primer país europeo con este nuevo reporte (**Figura 4**).

Con respecto a la edad y el sexo, la tabla incluye PNHs de un amplio rango de edades, que va desde los 3 años hasta los 49 años de un individuo. En cuanto al sexo, existe una predominancia de casos en machos. Las causas de muerte han sido diversas: aunque algunos fallecimientos han sucedido de forma natural, en varios casos se decidió aplicar eutanasia, debido al deterioro progresivo de la salud de los animales o por razones éticas de bienestar animal. En un caso particular, el de un *Cebus capucinus*, el cuadro evolucionó favorablemente, lo que representa una excepción entre los resultados generales.

En cuanto a los hallazgos clínicos, los signos como letargo, anorexia, parálisis y paresia han aparecido de manera recurrente y suelen ser progresivos, manifestándose durante periodos que oscilan entre días y meses. Estos signos reflejan afecciones severas en los sistemas nerviosos central y periférico, destacando una gravedad creciente de los signos en cada caso. Los tratamientos aplicados incluyen el uso de antiinflamatorios y antiparasitarios, como el fenbendazol y la sulfametazina, si bien la respuesta terapéutica es limitada. Esto probablemente es debido al estado avanzado de la enfermedad al momento de la intervención.

Autor	Año de publicación	Ubicación geográfica	Especie	Edad	Sexo	Causa de la muerte	Localización de la necropsia	Hallazgos clínicos	Días de signos clínicos	Tratamiento antihelmíntico	Hallazgos anatomopatológicos
Kodama et al.	1981	Indonesia	2 <i>Macaca fascicularis</i>	ND	M F	Eutanasia	ND	Debilidad, anorexia, parálisis de las extremidades, distasia	ND	ND	Meningitis eosinofílica, necrosis
Carlisle et al.	1998	Australia	4 <i>Saguinus oedipus oedipus</i> 1 <i>Saguinus imperator subgriseus</i>	3-5 6	3M, 1F M	Natural	ND	Depresión, anorexia, parálisis	5D-18M	Ninguno	Meningitis eosinofílica
Gardiner	1990	Luisiana	<i>Alouatta caraya</i>	3	M	Natural	Parque Audubon y Jardín Zoológico, Nueva Orleans	Letargo, ataxia	20	Sulfametazina (5 mg/10 lb) y antihistamínicos	Meningoencefalitis
Kim et al.	2002	Luisiana	<i>Varecia rubra</i>	ND	ND	Eutanasia	Zoológico de Acadiana	Extremidades hiperespásticas	ND	Ninguno	Meninges cerebrales, multifocalmente hemorrágicas
Duffy et al.	2004	Florida	<i>Hylobates lar</i>	49	M	Eutanasia	Zoológico de Miami	Cuadriparesia, depresión	2	Ninguno	Necrosis e inflamación en las columnas grises dorsales a lo largo de la médula espinal cervical
Emerson et al.	2013	Florida	<i>Pongo pygmaeus</i>	6	F	Eutanasia	Propietario privado	Debilidad del brazo izquierdo, fiebre leve, hipo	19	Antiinflamatorio, antibiótico y fenbendazol	Meningoencefalitis
Kottwitz et al.	2014	Alabama	<i>Saguinus geoffroyi</i>	3 4	M F	Natural Natural	Zoológico de Alabama	Encontrado muerto	ND 7	NA	ND
Edwards et al.	2020	Texas	<i>Callimico goeldii</i>	13	M	Natural	Zoológico de Texas	Letargo con debilidad, diarrea, ataxia, convulsiones	2	NA	Meningoencefalitis
			<i>Saguinus Oedipus</i>	18	M	Eutanasia		Ataxia	7		
			<i>Saguinus bicolor</i>	8	M	Eutanasia		Convulsiones	3		
Walden et al.	2020	Florida	<i>Cebus capucinus</i> <i>Varecia rubra</i>	17 ND	ND	Recuperado		Letargo, paresia de la parte trasera		Fenbendazol (7 mg/kg VO cada 24 h x 14d)	ND
Rizor et al.	2022	Luisiana	<i>Varecia rubra</i>	9	M	Eutanasia		Paresia de las extremidades traseras e inclinación de la cabeza a la derecha	8	ND	Meningoencefalitis
Rivory et al.	2023	Australia	<i>Saimiri boliviensis boliviensis</i>	11	M	Eutanasia		ND	ND	ND	ND

ND: dato no disponible, VO: vía oral

TABLA 3. Registro de casos históricos de angiostrongilosis en primates no humanos en el mundo.

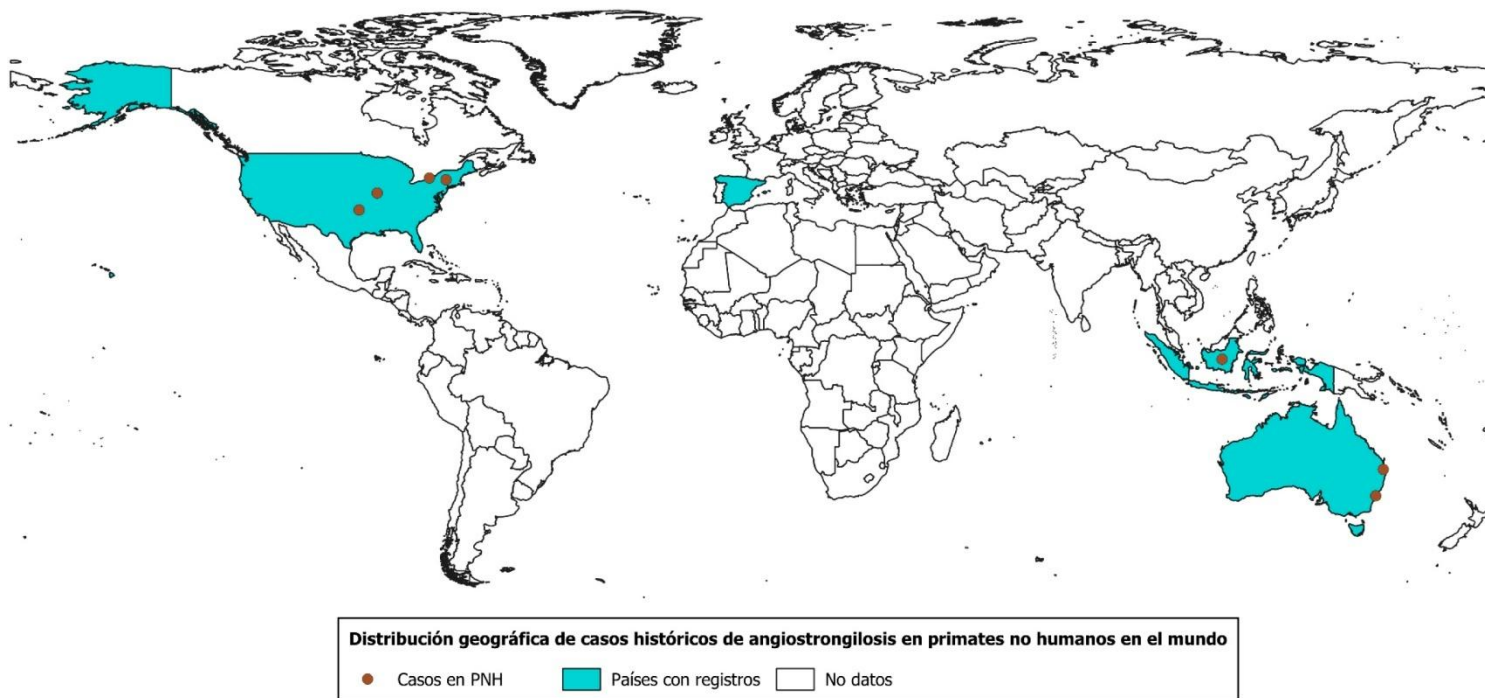


FIGURA 4. Localización geográfica de los casos registrados de angiostrongilosis en primates no humanos en el mundo. Fuente: Elaboración propia.

5. DISCUSIÓN

Hasta donde saben los autores, este es el primer estudio que describe la mortalidad por infección con *A. cantonensis* en PNHs de Europa. Además, este es el primer caso de NAS que afecta a *E. rufus* y *L. catta* en todo el mundo, ampliando el rango de hospedadores afectados por este parásito zoonótico. Ambas especies, así como el resto de las pertenecientes a la familia Lemnidae, son el grupo de mamíferos más amenazado de la tierra. Este descubrimiento pone de manifiesto la urgente necesidad de incluir estos patógenos en los diagnósticos diferenciales y de mejorar los programas de seguimiento para proteger a especies vulnerables. Estos primates, originarios de Madagascar, del que pertenece el lémur de cola anillada, es una especie clasificada como amenazada.

Los tres casos detallados fueron mortales, presentando los animales signos neurológicos durante varios días, lo que se relaciona con la migración de las larvas y con la respuesta inmunitaria frente a los nematodos muertos (da Silva y Morassutti, 2021). En uno de ellos (caso n° 2) se administró tratamiento antihelmíntico con albendazol al inicio de los signos clínicos, pero no se observó respuesta positiva. Aunque en ocasiones anteriores otros lémures, así como unos monos capuchinos se recuperaron tras el tratamiento con fenbendazol (7 mg/kg VO cada 24 h × 14 días) (Walden *et al.*, 2020), la mayoría de los casos notificados en PNHs terminaron falleciendo o requirieron eutanasia. Esto puede indicar una reacción inmunitaria más grave o mayores problemas de tratamiento en estas especies que en los humanos, para quienes la enfermedad suele ser autolimitante, manifestándose como dolor de cabeza agudo y malestar general durante varias semanas. Por otro lado, se debe considerar el infradiagnóstico o el diagnóstico tardío en primates (Duffy *et al.*, 2004). En estos valiosos animales, un diagnóstico precoz mediante herramientas avanzadas, como la PCR en tiempo real en el líquido cefalorraquídeo, sería fundamental para prevenir la enfermedad. En un estudio realizado a pacientes humanos con meningitis eosinofílica, esta técnica detectó ADN de larvas en 22 de las 33 muestras de líquido cefalorraquídeo, lo que prueba su alta eficacia (Qvarnstrom *et al.*, 2016).

Los exámenes histopatológicos de los tres lémures revelaron la presencia de estadios inmaduros del parásito en el tejido nervioso. Estos parásitos migran naturalmente a los pulmones en los roedores, pero generalmente cesan la migración en el sistema nervioso de los hospedadores accidentales, si bien se han observado ejemplares adultos en cerebro

de titíes (*Saguinus* spp.) (Carlisle *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 2020). Asimismo, la migración a los pulmones ha sido evidenciada por Edwards *et al.*, (2020) en un tití (*S. bicolor*). Aunque en nuestro caso no fue posible identificar los especímenes completos bajo el microscopio, la descripción histológica sugiere que habían transcurrido al menos tres semanas desde que se ingirieron las larvas de tercer estadio. La necropsia no reveló lesiones significativas, aparte de congestión en los tres casos y múltiples áreas de hemorragia en el caso 3. Esto se alinea con la ausencia de lesiones macroscópicas en el cerebro y la médula espinal en un lémur rufo rojo (*Varecia rubra*) afectado recientemente (Rizor *et al.*, 2022). Estudios anteriores han descrito la ubicación de nematodos en el cerebro, el tronco encefálico, el cerebelo y la médula espinal en lémures rufos rojos (Edwards *et al.*, 2020; Rizor *et al.*, 2022). En el presente estudio, sin embargo, también se encontraron larvas de nematodos libres en los ventrículos cerebrales en los tres casos. Podría haber varios mecanismos por los cuales los parásitos pueden pasar de las meninges a los ventrículos. Uno de ellos sería que el parásito migre a través de los tejidos perforando las meninges hacia los ventrículos. Alternativamente, la propagación hematogénica podría permitir que los parásitos ingresen al torrente sanguíneo y sean transportados a los ventrículos cerebrales, donde podrían cruzar la barrera hematoencefálica hacia el líquido cefalorraquídeo. En este estudio, los parásitos se localizaron en la región cervical de la médula espinal en el caso 2, aunque en estudios previos habían descrito su presencia en las regiones torácica y lumbar de calitricidos (Familia: Callitrichidae) en cautiverio (Edwards *et al.*, 2020).

Los principales hallazgos histopatológicos incluyeron necrosis y hemorragia, con áreas de inflamación leve a severa que comprendían eosinófilos, células de Gitter, linfocitos y células plasmáticas alrededor de los parásitos, hallazgos como los descritos en el mono ardilla boliviano y lémur rufo rojo en otras especies de estudios previos (Edwards *et al.*, 2020; Rizor *et al.*, 2022; Rivory *et al.*, 2023). Entre los tres lémures, e incluso dentro de un mismo animal, las lesiones histológicas variaron. Algunas áreas exhibieron parásitos rodeados exclusivamente por hemorragia y rarefacción del neuropilo, lo que indica un curso agudo de infección sin inflamación. Otras áreas mostraron solo inflamación variable (eosinófilos, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas), lo que sugiere un curso subagudo. Sorprendentemente, también se observó la ausencia de cambios patológicos asociados al parásito (necrosis, hemorragia e inflamación), que no habían sido descritos previamente. Esta variación puede estar relacionada con el número de larvas ingeridas, el tiempo

transcurrido desde la ingestión y si se trató de una infección primaria o de reinfección. Teniendo en cuenta que un solo caracol puede albergar desde unas pocas hasta miles de larvas infectantes, la gravedad de las lesiones puede variar significativamente entre los hospedadores susceptibles.

El nematodo pulmonar de rata se considera un parásito zoonótico emergente en Europa, ya que se ha encontrado parasitando hospedadores intermediarios y definitivos de diferentes países durante la última década. En concreto, Galán-Puchades *et al.*, (2022) confirmaron su presencia en ratas de Valencia, marcando el primer hallazgo de esta especie en la Península Ibérica. Investigaciones recientes también han aislado el ADN del parásito de tres especies de caracoles terrestres como hospedadores intermediarios (Fuentes *et al.*, 2024), lo que confirma que el ciclo de vida del nematodo puede completarse en esta zona de la España peninsular. Además, los cuidadores del zoológico informaron haber observado a los lémures ingiriendo caracoles del suelo, un comportamiento confirmado previamente en otros PNHs afectados (Walden *et al.*, 2020).

De acuerdo con los análisis filogenéticos, nuestras secuencias se agruparon con las detectadas recientemente en las Islas Canarias y las Islas Baleares (España), así como en Estados Unidos, así como con las de *A. mackerrasae*. Sin embargo, esta última especie debe ser descartada, ya que hasta el momento no se ha detectado fuera de Australia (Morgan *et al.*, 2021). La rápida propagación de *A. cantonensis* a nuevos territorios en las últimas décadas ha sido alarmante (Cowie *et al.*, 2022). Es probable que el tráfico marítimo frecuente y directo con ambas islas, así como con el puerto de Valencia y regiones donde este patógeno es endémico, haya facilitado la entrada del parásito a través de buques de carga y/o la importación involuntaria de ratas y gasterópodos infectados (González y Ruiz de Ybáñez, 2022). Además, la introducción de moluscos y otros invertebrados en los ecosistemas locales, impulsada por prácticas de consumo cultural, podría desempeñar un papel crucial en la expansión del ciclo de vida del parásito en la península ibérica.

Europa se consideraba una región no endémica hasta 2018, cuando se detectó el parásito infectando a dos erizos africanos (*Atelerix algirus*) en la isla española de Mallorca (Paredes-Esquivel *et al.*, 2019). Recientemente, los casos humanos han aumentado entre viajeros que regresan de países endémicos (Valerio Sallent *et al.*, 2021). Entre los factores de riesgo se encuentra el consumo de caracoles crudos o poco

cocinados, que forman parte de los platos tradicionales de algunos países europeos como España o Francia. Además, estudios recientes también han demostrado la capacidad de las larvas para hibernar en el interior de los caracoles, lo que pone de manifiesto el potencial de supervivencia del parásito (Anettová *et al.*, 2023). Sin embargo, la mayoría de los casos de NAS en humanos son el resultado de la ingestión accidental de vegetales infectados con baba de caracoles o babosas, lo cual se puede prevenir lavando y enjuagando minuciosamente los productos agrícolas, especialmente las verduras de hoja verde.

Diversos estudios documentan que los roedores comensales en zoológicos son hospedadores de varios patógenos zoonóticos. En Portugal, se identificaron cinco especies de endoparásitos en roedores del zoológico de Lisboa: *Hymenolepis diminuta* y *Cysticercus fasciolaris* (Ces-toda), *Syphacia obvelata* y *Calodium hepaticum* (syn. *Capillaria hepatica*) (Nematoda), y *Cryptosporidium* sp. (Protozoa) (Crespo *et al.*, 2013). En la República Checa, se detectaron anticuerpos frente a *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* y *Borrelia burgdorferi* s.l. en roedores silvestres recogidos en el zoológico de Brno (Pittermannová *et al.*, 2021). En Francia, se identificaron plagas de roedores como fuentes potenciales de contaminación con *Lawsonia intracellularis*, aislada en varios gibones crestados (*Hylobates pileatus*) que presentaban diarrea en el zoológico de Mulhouse (François-Brazier *et al.*, 2021). En España, las ratas grises (*Rattus norvegicus*) del Zoo de Córdoba presentaron una prevalencia y seroprevalencia de *Leptospira* spp. del 18,2 % y del 41,9 %, respectivamente. Este estudio se llevó a cabo precisamente en la misma zona donde se observó un brote de mortalidad aguda por leptospirosis en macacos de Berbería (*Macaca sylvanus*) en peligro de extinción mantenidos en cautiverio (Beato-Benítez *et al.*, 2024). Esta situación pone de manifiesto la importancia de fortalecer las medidas de control de los roedores que habitan en los zoológicos, los cuales proporcionan amplios recursos (abundante alimento, agua, refugio y temperaturas ideales) para su proliferación. Dada la excepcional capacidad de ciertos animales, en particular los primates, para acceder a los productos utilizados para el control de plagas, se recomienda encarecidamente evitar el empleo de rodenticidas o estaciones de cebo dentro de su recinto. En su lugar, el control perimetral debe reforzarse en todo el recinto del zoológico y alrededor de las instalaciones, empleando técnicas como las trampas instantáneas. Además, también se deben implementar medidas rutinarias de control ambiental, incluida la eliminación de madrigueras y la eliminación del exceso de alimento.

6. CONCLUSIONES

1. ***Angiostrongylus cantonensis* está emergiendo en Europa**, y su presencia parece consolidarse en el este de España.
2. **Existe un riesgo para diversas especies de mamíferos, incluidos los humanos**, por lo cual es necesario que los profesionales de la salud humana y animal establezcan programas de vigilancia específicos para este parásito.
3. **La detección temprana de *A. cantonensis* es compleja**, y el tratamiento de la infección no siempre resulta efectivo, lo que resalta la importancia de estrategias preventivas.
4. **En los primates no humanos se deben aplicar medidas de prevención y control similares a las recomendadas para los humanos**, como evitar el consumo de verduras sin lavar adecuadamente, así como caracoles, moluscos o crustáceos crudos.
5. **Es fundamental implementar un control y monitoreo eficiente de roedores terrestres y caracoles en áreas urbanas y antropizadas** para reducir el riesgo de transmisión del parásito.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Anettová L, Izquierdo-Rodríguez E, Foronda P, Baláž V, Novotný L, Modrý D. 2022. Endemic lizard *Gallotia galloti* is a paratenic host of invasive *Angiostrongylus cantonensis* in Tenerife, Spain. *Parasitol.* 149(7):1-23. doi: 10.1017/S0031182022000336.
- [2] Anettová L, Šipková A, Izquierdo-Rodríguez E, Velič V, Modrý D. 2023. Rat lungworm survives winter: experimental overwintering of *Angiostrongylus cantonensis* larvae in European slugs. *Parasitol.* 150(10):950-955. doi: 10.1017/S0031182023000781.
- [3] Beato-Benítez A, Cano-Terriza D, González M, Martínez R, Pérez-Cobo I, Ruano MJ, Guerra R, Mozos-Mora E, García-Bocanegra I. 2024. Fatal leptospirosis in endangered Barbary macaques (*Macaca sylvanus*) kept in captivity: Assessing the role of sympatric rodents. *Vet Microbiol.* 291:110028. doi: 10.1016/j.vet-mic.2024.110028.

- [4] Brummaier T, Bertschy S, Arn K, Treumann T, Ruf MT, Nickel B, Paris DH, Neumayr A, Blum J. 2019. A blind passenger: a rare case of documented seroconversion in an *Angiostrongylus cantonensis* induced eosinophilic meningitis in a traveler visiting friends and relatives. *Trop Dis Travel Med Vaccines* 15:5:6. doi: 10.1186/s40794-019-0084-x.
- [5] Carlisle MS, Prociv P, Grennan J, Pass MA, Campbell GL, Mudie A. 1998. Cerebrospinal angiostrongyliasis in five captive tamarins (*Sanguinus* spp.). *Aust Vet J.* 76(3):167-70. doi: 10.1111/j.1751-0813.1998.tb10121.x.
- [6] Cowie RH, Ansdell V, Panosian Dunavan C, Rollins RL. 2022. Neuroangiostrongyliasis: Global Spread of an Emerging Tropical Disease. *Am J Trop Med Hyg.* 107(6):1166-1172. doi: 10.4269/ajtmh.22-0360.
- [7] Crespo AP, Lapão N, Correia J, Gomes L, Vaz Y, Madeira de Carvalho LM. 2013. Controlo de pragas em parques Zoológicos: repercussões parasitárias, patológicas e de Saúde Pública. XVIII Meeting of the Portuguese Society of Animal Pathology, RPCV. (Suppl) 108(585-586):71-72.
- [8] da Silva AJ, Morassutti AL. 2021. *Angiostrongylus* spp. (Nematoda; Metastrongyloidea) of global public health importance. *Res Vet Sci.* 135:397-403. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.10.023.
- [9] Duffy MS, Miller CL, Kinsella JM, de Lahunta A. 2004. Parasitology cantonensis in a nonhuman primate, Florida. *Emerg Infect Dis.* 10:2207-10. doi: 10.3201/eid1012.040319.
- [10] Edwards EE, Borst MM, Lewis BC, Gomez G, Flanagan JP. 2020. *Angiostrongylus cantonensis* central nervous system infection in captive callitrichids in Texas. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 19:100363. doi: 10.1016/j.vprsr.2019.100363.
- [11] Emerson JA, Walden HS, Peters RK, Farina LL, Fredholm DV, Qvarnstrom Y, Xayavong M, Bishop H, Slapcinsky J, McIntosh A, Wellehan JF Jr. 2013. Eosinophilic meningoencephalomyelitis in an orangutan (*Pongo pygmaeus*) caused by *Angiostrongylus cantonensis*. *Vet Q.* 33(4):191-4. doi: 10.1080/01652176.2013.880005.

- [12] Foronda P, López-González M, Miquel J, Torres J, Segovia M, Abreu-Acosta N, Casanova JC, Valladares B, Mas-Coma S, Bargues MD, Feliu C. 2010. Finding of *Parastrongylus cantonensis* (Chen, 1935) in *Rattus rattus* in Tenerife, Canary Islands (Spain). *Acta Trop.* 114(2):123-7. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.02.004.
- [13] François-Brazier C, Payebien A, Manson C, Lefaux B, Quintard B. 2021. Prevalence of *Lawsonia intracellularis* Infection in Non-human Primates and Pest Rodents in a Zoological Collection. *J Zoo Wildl Med.* 52(2):680-688. doi: 10.1638/2018-0185.
- [14] Fuentes MV, Gómez-Samblás M, Richter O, Sáez-Durán S, Bueno-Marí R, Osuna A, Galán-Puchades MT. 2024. Local terrestrial snails as natural intermediate hosts of the zoonotic parasite *Angiostrongylus cantonensis* in the new European endemic area of Valencia, Spain. *Zoon Pub Health.* doi: 10.1111/zph.13131.
- [15] Galán-Puchades MT, Gómez-Samblás M, Osuna A, Sáez-Durán S, Bueno-Marí R, Fuentes MV. 2022. Autochthonous *Angiostrongylus cantonensis* Lungworms in Urban Rats, Valencia, Spain, 2021. *Emerg Infect Dis.* 28(12):2564-2567. doi: 10.3201/eid2812.220418.
- [16] Gardiner CH, Wells S, Gutter AE, Fitzgerald L, Anderson DC, Harris RK, Nichols DK. 1990. Eosinophilic meningoencephalitis due to *Angiostrongylus cantonensis* as the cause of death in captive non-human primates. *Am J Trop Med Hyg.* 42(1):70-4. doi: 10.4269/ajtmh.1990.42.70.
- [17] González M, Ruiz de Ybáñez R. 2022. What do we know about *Angiostrongylus cantonensis* in Spain? Current knowledge and future perspectives in a globalized world. *Transbound Emerg Dis.* 69(5):3115-3120. doi: 10.1111/tbed.14393.
- [18] Izquierdo-Rodríguez E, Anettová L, Hrazdilová K, Foronda P, Modrý D. 2023. Range of metastrongylids (superfamily Metastrongyloidea) of public health and veterinary concern present in livers of the endemic lizard *Gallotia galloti* of Tenerife, Canary Islands, Spain. *Parasit Vectors.* 16(1):1-7. doi: 10.1186/S13071-023-05653-z.
- [19] Jarvi S, Prociv P. 2021. *Angiostrongylus cantonensis* and neuro-angiostrongyliasis (rat lungworm disease): 2020. *Parasitology.* 148(2):129-132. doi: 10.1017/S003118202000236X.

- [20] Jaume-Ramis S, Martínez-Ortí A, Delgado-Serra S, Bargues MD, Mas-Coma S, Foronda P, *et al.* 2023. Potential intermediate hosts of *Angiostrongylus cantonensis* in the European Mediterranean region (Mallorca, Spain). *One Health*. 17:100610. doi: 10.1016/j.onehlt.2023.100610.
- [21] Kodama H, Koyama T, Takasaka M, Honjo S, Komatsu T, Yoshimura K, Machida M. 1981. [Two cases of natural infection of *Angiostrongylus cantonensis* in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) (author's transl)]. *Jikken Dobutsu*. 30(3):251-61. Japanese.
- [22] Kottwitz JJ, Perry KK, Rose HH, Hendrix CM. 2014. *Angiostrongylus cantonensis* infection in captive Geoffroy's tamarins (*Saguinus geoffroyi*). *J Am Vet Med Assoc*. 245(7):821-7. doi: 10.2460/javma.245.7.821.
- [23] Martín-Alonso A, Foronda P, Quispe-Ricalde MA, Feliu C, Valladares B. 2011. Seroprevalence of *Angiostrongylus cantonensis* in wild rodents from the Canary Islands. *PLoS One*. 6(11):e27747. doi: 10.1371/journal.pone.0027747.
- [24] Martín-Carrillo N, Baz-González E, García-Livia K, Amaro-Ramos V, Abreu-Acosta N, Miquel J, *et al.* 2023. Data on New Intermediate and Accidental Hosts Naturally Infected with *Angiostrongylus cantonensis* in La Gomera and Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Animals (Basel)*. 13(12):1969. doi: 10.3390/ani13121969.
- [25] Morgan ER, Modry D, Paredes-Esquivel C, Foronda P, Traversa D. 2021. Angiostrongylosis in Animals and Humans in Europe. *Pathogens*. 10(10):1236. doi: 10.3390/pathogens10101236.
- [26] Paredes-Esquivel C, Sola J, Delgado-Serra S, Puig Riera M, Negre N, Miranda MA. 2019. *Angiostrongylus cantonensis* in North African hedgehogs as vertebrate hosts, Mallorca, Spain, October 2018. *Euro Surveill*. 24(33):1900489. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.33.1900489.
- [27] Pittermannová P, Žáková A, Váňa P, Marková J, Tremel F, Černíková L, Budíková M, Bártová E. 2021. Wild Small Mammals and Ticks in Zoos-Reservoir of Agents with Zoonotic Potential? *Pathogens*. 10(6):777. doi: 10.3390/pathogens10060777.

- [28] Qvarnstrom Y, da Silva AC, Teem JL, Hollingsworth R, Bishop H, Graeff-Teixeira C, Da Silva AJ. 2010. Improved Molecular Detection of *Angiostrongylus cantonensis* in Mollusks and Other Environmental Samples with a Species-Specific Internal Transcribed Spacer 1-Based TaqMan Assay. *Appl Environ Microbiol.* 76(15): 5287-5289. doi: 10.1128/AEM.00546-10.
- [29] Qvarnstrom Y, Xayavong M, da Silva AC, Park SY, Whelen AC, Calimlim PS, *et al.* 2016. Real-time polymerase chain reaction detection of *Angiostrongylus cantonensis* DNA in cerebrospinal fluid from patients with eosinophilic meningitis. *Am J Trop Med Hyg.* 94:176–81. doi: 10.4269/ajtmh.15-0146.
- [30] Rivory P, Pillay K, Lee R, Taylor D, Ward MP, Šlapeta J. 2023. Fatal neural angiostrongyliasis in the Bolivian squirrel monkey (*Saimiri boliviensis boliviensis*) leading to defining *Angiostrongylus cantonensis* risk map at a zoo in Australia. *One Health.* 17:100628. doi: 10.1016/j.onehlt.2023.100628.
- [31] Rizor J, Yanez RA, Thaiwong T, Kiupel M. 2022. *Angiostrongylus cantonensis* in a red ruffed lemur at a zoo, Louisiana, USA. *Emerg Infect Dis.* 28(5):1058-1060. doi: 10.3201/eid2805.212287.
- [32] Rollins RL, Medeiros MCI, Cowie RH. 2023. Stressed snails release *Angiostrongylus cantonensis* (rat lungworm) larvae in their slime. *One Health.* 17:100658. doi: 10.1016/j.onehlt.2023.100658.
- [33] Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A, Minh BQ. 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 44(W1):W232-W235. doi: 10.1093/nar/gkw256.
- [34] Valerio Sallent L, Moreno Santabarbara P, Roure Díez S. 2021. Abdominal pain secondary to neuroinvasive *Angiostrongylus cantonensis*; first European case. Some reflections on emerging parasitosis. *Gastroenterol Hepatol.* 44(8):566-567. doi: 10.1016/j.gastrohep.2020.07.023.
- [35] Walden HDS, Slapcinsky J, Rosenberg J, Wellehan JFX. 2020. *Angiostrongylus cantonensis* (rat lungworm) in Florida, USA: current status. *Parasitol.* 148(2):149-152. doi: 10.1017/S0031182020001286.

**XII PREMIO ANDRÉS PINTALUBA, S.A.
“CARLOS LUIS DE CUENCA Y ESTEBAN”**

**USO E IMPACTO DE LOS FÁRMACOS ANTIHELMÍNTICOS EN
RUMIANTES BAJO EL CONTEXTO DE SOSTENIBILIDAD**

MARÍA MARTÍNEZ VALLADARES¹

RESUMEN

Los sistemas de producción ganaderos basados en el pastoreo juegan un papel vital en la promoción de prácticas agrícolas sostenibles en Europa. Estos sistemas dependen de los recursos naturales como una fuente de alimento asequible en la granja. Sin embargo, estos sistemas tienen ciertas desventajas, particularmente en lo que respecta a la salud animal, ya que el ganado en pastoreo es muy susceptible a infecciones causadas por parásitos helmintos. Estas infecciones pueden suponer una carga económica sustancial en el sistema productivo de la explotación, y el método más comúnmente utilizado para su control es la administración de fármacos antihelmínticos. Sin embargo, recientemente estos fármacos se han considerado recientemente como contaminantes emergentes, ya que su presencia en los ecosistemas terrestres y acuáticos representa riesgos ambientales. En el presente trabajo se revisa la situación actual en cuanto al uso, eficacia y posible impacto de estos fármacos, y se describe una posible hoja de ruta para realizar un uso más sostenible de los

¹ Científica Titular del CSIC.

mientos. Por lo tanto, es importante avanzar, consolidar y difundir el conocimiento sobre la presencia ambiental y el impacto ecológico de los antiparasitarios administrados al ganado, al mismo tiempo que se proponen prácticas y métodos más sostenibles para minimizar su uso en el control de las infecciones por helmintos.

ABSTRACT

Pasture-based livestock production systems play an important role in promoting sustainable agricultural practices in Europe. These systems rely on natural resources as an affordable on-farm feed source. However, these systems have certain disadvantages, particularly in terms of animal health, as grazing livestock are highly susceptible to infections caused by helminth parasites. These infections can place a significant economic burden on the farm production system, and the most commonly used method to control them is the administration of anthelmintic drugs. However, these drugs have recently been considered as emerging contaminants, as their presence in terrestrial and aquatic ecosystems poses environmental risks. This study reviews the current situation regarding the use, efficacy and potential impacts of these drugs and describes a possible roadmap for a more sustainable use of anthelmintics. Therefore, it is important to advance, consolidate and disseminate knowledge on the environmental presence and ecological impact of antiparasitic drugs administered to livestock, while proposing more sustainable practices and methods to minimize their use in the control of helminth infections.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción ganaderos que se basan en el uso de pastos desempeñan un papel fundamental en la promoción de prácticas de ganadería sostenible, especialmente en diversas regiones de clima templado de Europa, incluyendo España. Estos sistemas aprovechan el pastoreo de hierbas como una fuente de alimentación accesible y rentable dentro de la misma explotación, lo cual constituye un pilar de la producción sostenible y económicamente viable para muchos ganaderos de ganado bovino, ovino y caprino (Hanrahan *et al.*, 2018). Sin embargo, aunque estos sistemas aportan importantes beneficios, también presentan varios desafíos, siendo uno de los principales la preocupación en torno a la salud animal. Los animales alimentados principalmente a base de pasto, como el ganado vacuno y ovino, son especialmente vulnerables a sufrir

infecciones por parásitos helmintos, los cuales encuentran en estos entornos condiciones ideales para su proliferación. Este tipo de infecciones representa una amenaza significativa y puede generar una carga económica considerable para los sistemas de producción en las ganaderías afectadas.

Según el estudio realizado por Charlier *et al.* (2021), el coste anual combinado derivado de las principales infecciones por helmintos, como los nematodos gastrointestinales, *Fasciola hepatica* y *Dictyocaulus viviparus*, que afectan al ganado vacuno, ovino y caprino, en Europa se estima en unos 1.800 millones de euros. De este total, aproximadamente un 81 %, lo que equivale a unos 1.460 millones de euros, corresponde a pérdidas económicas directamente relacionadas con la reducción en la producción, mientras que el restante 19 % (unos 350 millones de euros) se atribuye a los gastos en tratamientos antihelmínticos. Dada su repercusión económica y su impacto directo en la salud animal, los antiparasitarios ocupan en la actualidad el segundo lugar en importancia dentro del mercado mundial de productos para la sanidad animal. En 2018, el mercado global de antiparasitarios alcanzó un valor de aproximadamente 7.000 millones de euros, y ha mostrado una tasa de crecimiento media anual del 6 % durante la última década, tendencia que se espera continúe en el futuro (Selzer y Epe, 2021). En concreto las infecciones por nematodos gastrointestinales pueden provocar pérdidas de entre el 10 y el 50 % de la producción debido a un menor crecimiento de los animales y a una menor producción de leche, entre otros. En cuanto a la infección por *F. hepatica*, ésta también afecta gravemente la salud animal, produciendo la muerte de los animales en los casos más agudos; en los casos crónicos aparece un deterioro general del animal, con adelgazamiento, menores rendimientos productivos y decomiso de los hígados en el matadero (Charlier *et al.*, 2014). La prevalencia de las infecciones por nematodos gastrointestinales en España es alta (68,2-100 %) y la intensidad del parasitismo es media-baja dependiendo de las zonas donde se realice el pastoreo, si se trata de zonas de secano o de regadío (Martínez-Valladares *et al.*, 2013b). Sin embargo, se ha demostrado que incluso niveles bajos de infección, entre 100 y 150 huevos por gramo en heces, pueden influir negativamente en el rendimiento lechero al final de la lactación, con casi un 10 % menos de rendimientos productivos (Martínez-Valladares *et al.*, 2019). Tal y como se expone en el presente trabajo, el método más utilizado para controlar estas infecciones es el tratamiento con fármacos antihelmínticos. Sin embargo, el uso abusivo de los mismos ha dado lugar a una serie de consecuencias, desde la aparición de las resistencias

antihelmínticas, hasta la presencia de residuos ambientales, con su consecuente impacto en diferentes ecosistemas. Por lo tanto, es necesario un enfoque más sostenible del control de las infecciones por parásitos helmintos donde se tenga en cuenta no solamente la salud animal, sino también la salud ambiental, sin olvidarnos de no poner en riesgo las producciones ganaderas.

REVISIÓN DEL ORIGEN, EVOLUCIÓN TEMPORAL Y SITUACIÓN ACTUAL DEL TEMA

¿Cómo afecta la administración de los fármacos antihelmínticos en rumiantes sobre el medio ambiente?

Para abordar el tratamiento de las infecciones por parásitos helmintos, existen varias clases de antihelmínticos que actúan mediante distintos mecanismos. Entre ellos, se incluyen los benzimidazoles, entre los que destacan el albendazol y el fenbendazol; las lactonas macrocíclicas, que se subdividen en avermectinas y milbemicinas, como la ivermectina, la moxidectina y la eprinomectina; así como otras categorías de agentes como las salicilanilidas, las tetrahidropirimidinas, los imidazotiazoles (como el levamisol), los organofosfatos y los derivados aminoacetónitrílicos. Estos fármacos antihelmínticos se administran mediante diversas vías, tales como la vía oral, la vía inyectable o de aplicación tópica (pour-on). Una vez administrados, los fármacos se metabolizan dentro del organismo del animal y son excretados ya sea a través de la orina o las heces, bien como el fármaco original o como metabolitos de este.

El perfil de excreción del fármaco depende de factores como la vía de administración y las propiedades fisicoquímicas de cada compuesto específico. Por ejemplo, cuando los medicamentos se administran por vía oral, la mayor parte se excreta sin modificaciones significativas en las heces, mientras que los compuestos administrados por vía inyectable o en forma oral sufren un metabolismo más amplio antes de su excreción (Wardhaugh, 2005). En particular, las avermectinas son eliminadas principalmente a través de las heces, mientras que los benzimidazoles y el levamisol son predominantemente excretados en la orina (McKellar, 1997). Sin embargo, la falta de datos detallados sobre estos procesos hace difícil interpretar o comparar los patrones específicos de excreción de los diversos antihelmínticos empleados en los animales. Además, se deben considerar los puntos de entrada de estos productos en el medio ambiente, como los vertidos accidentales durante su aplicación y la eliminación inadecuada de los restos de fármacos, lo cual sugiere que estos

“agroquímicos” pueden tener una persistencia considerable en el medio ambiente, con posibles efectos a largo plazo (Horvat *et al.*, 2012; Snow *et al.*, 2018; Charuaud *et al.*, 2019).

Dadas sus propiedades fisicoquímicas particulares, los antihelmínticos tienden a presentar una baja solubilidad en agua junto con altos coeficientes de adsorción, lo que significa que tienen una mayor tendencia a adherirse a partículas sólidas que a disolverse en medios acuosos. Por consiguiente, estos compuestos suelen asociarse más fácilmente con los materiales presentes en el suelo y los sedimentos que con las corrientes de agua (Tolls, 2001). Esta inclinación hacia la adsorción en sólidos y sedimentos se refleja claramente en la mayoría de las metodologías analíticas, así como en estudios previos orientados a detectar la presencia de antihelmínticos, que se han enfocado predominantemente en muestras de suelo o sedimentos (Mooney *et al.*, 2021). La presencia de estos compuestos en ecosistemas terrestres y acuáticos plantea importantes preocupaciones ambientales debido a los posibles efectos nocivos que pueden tener sobre la biodiversidad y el equilibrio de estos sistemas. En particular, esta problemática se debe principalmente a la elevada toxicidad de ciertos antihelmínticos como el albendazol, la ivermectina y la eprinomectina, los cuales resultan altamente perjudiciales para diversos organismos tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos (Beynon, 2012; Vokřál *et al.*, 2023). Entre los organismos terrestres afectados se incluyen, entre otros, las lombrices de tierra y los colémbolos (Scheffczyk *et al.*, 2016; Junco *et al.*, 2021), mientras que en los ecosistemas acuáticos el impacto se observa en invertebrados y peces (Lumaret *et al.*, 2012; Serafini *et al.*, 2019). Sin embargo, gran parte de la investigación sobre los efectos adversos de los antihelmínticos ha concentrado su atención en los artrópodos que habitan en el estiércol, como los escarabajos peloteros, debido a su función esencial en el reciclaje de nutrientes y la descomposición de la materia orgánica, lo que influye en la fertilidad del suelo (Jacob *et al.*, 2015; Manning *et al.*, 2017; Lewis *et al.*, 2024). En contraste, se sabe menos sobre los efectos de estos compuestos en otros organismos que habitan directamente en el suelo y en las comunidades acuáticas. Estas observaciones respaldan la clasificación de los antihelmínticos como “contaminantes emergentes”, una categoría que agrupa a aquellos compuestos cuya presencia y efectos en el medio ambiente son motivo de creciente preocupación (Lagos *et al.*, 2022).

Por otra parte, los estudios que examinan específicamente los lixiviados de estiércol y el comportamiento de los antihelmínticos en aguas superficiales han sido escasos en número. Las investigaciones realizadas

en esta área han demostrado que los antihelmínticos pueden desplazarse por la superficie del suelo asociados a partículas y que tienden a movilizarse a través de flujos preferenciales en macroporos, canales que permiten el paso de agua y partículas más rápido de lo que ocurriría en un flujo homogéneo a través del suelo (Kreuzig *et al.*, 2007). En regiones de acuíferos kársticos, los suelos presentan fracturas amplias, depresiones y corrientes subterráneas rápidas, que permiten la recarga del agua subterránea con poca o nula atenuación de contaminantes (Coxon, 2011). Como resultado, las aguas subterráneas en estos entornos muestran una vulnerabilidad significativa ante la contaminación por fármacos antihelmínticos, especialmente en zonas con intensa actividad ganadera.

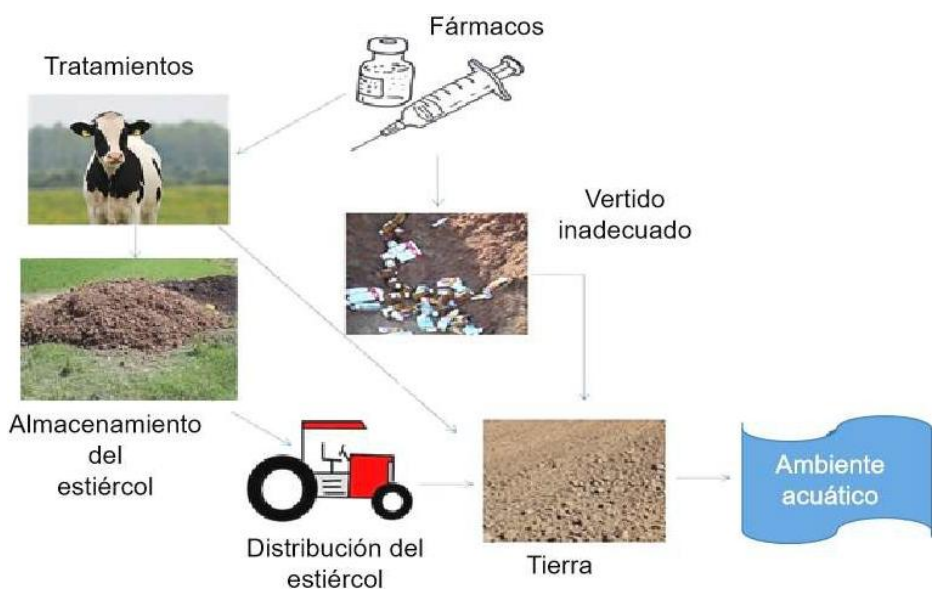


FIGURA 1. Distribución de los residuos de los fármacos antihelmínticos en el medio ambiente.

Un estudio realizado en Irlanda en 2018 detectó concentraciones de diecisiete compuestos antihelmínticos de hasta 41 ng/l en el 22 % de los lugares muestreados, incluyendo aguas subterráneas y aguas superficiales asociadas, incluyendo los fármacos benzimidazoles, que ocasionalmente llegaron al valor umbral de plaguicidas en Irlanda de 75 ng/l (Mooney *et al.*, 2021). Aunque no era probable que la mayoría de las concentraciones de los benzimidazoles detectadas en ese estudio supusieran un riesgo ambiental agudo para los organismos acuáticos, preocupa que los niveles de ivermectina, detectados en concentraciones de

hasta 47,5 ng/l, fueran altamente tóxicos para una serie de organismos acuáticos, como el entero *Neomysis integer*, *Gammarus sp.* y *Daphnia magna* (Horvat *et al.*, 2012). Por otra parte, también se detectaron varios benzimidazoles en ríos de Polonia y España, con concentraciones que oscilaban entre 0,32 y 39,2 ng/l (Wagil *et al.*, 2015; Zrncic *et al.*, 2014). En los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales que abastecen a las industrias farmacéuticas se detectó el fármaco flubendazol en concentraciones de hasta 671 ng/l en Bélgica (Van De Steene y Lambert, 2008), y febantel en efluentes de Croacia en concentraciones de hasta 60 ng/l (Babić *et al.*, 2010).

Una vez que los antihelmínticos se encuentran en el suelo, se espera que interactúen con los microorganismos del mismo, aunque aún se dispone de poca información sobre el grado de toxicidad que pueden presentar estos compuestos en los diferentes grupos microbianos. Un estudio muy reciente demostró que el albendazol puede reducir significativamente la abundancia de hongos totales y arqueas, principalmente las pertenecientes al filo Crenarchaeota (Lagos *et al.*, 2023). Asimismo, junto con otros antihelmínticos como la ivermectina y la eprinomectina, el albendazol también inhibió los procesos de nitrificación de los suelos, reduciendo tanto los niveles de arqueas como los de bacterias que oxidan el amoníaco; estos organismos funcionan como bioindicadores de la toxicidad potencial de estresores abióticos en la microbiota del suelo (Sarkar *et al.*, 2023). Los autores de este estudio concluyeron que la aplicación de antihelmínticos producía diferentes efectos, dependiendo de las concentraciones encontradas, en la diversidad microbiana del suelo, observando alteraciones que podrían afectar a procesos fundamentales en la fertilidad del suelo, como el ciclo del nitrógeno (Lagos *et al.*, 2023). Es importante indicar que la nitrificación es un proceso bioquímico clave para la fertilidad del suelo, en el que las bacterias nitrificantes convierten el amonio en nitratos, los cuales pueden ser aprovechados por las plantas (Norton *et al.*, 2019). Por lo tanto, es necesario realizar estudios adicionales sobre los efectos potenciales de los antihelmínticos sobre el ciclo del nitrógeno y, en particular, sobre la oxidación del amoníaco, dada su importancia en la disponibilidad de nutrientes para las plantas.

En cuanto al efecto de los antihelmínticos en las plantas, la información disponible es limitada, e incluso algunos estudios sugieren que no parecen ejercer un impacto negativo directo en el crecimiento vegetal. Investigaciones previas indican que la penetración directa de las avermectinas en los tejidos vegetales es poco significativa. Sin embargo, un

estudio más reciente informó de concentraciones relativamente elevadas de ivermectina en plantas que crecían muy próximas a restos de heces animales, lo cual indicaría un potencial de absorción indirecta desde el suelo o el estiércol circundante (Iglesias *et al.*, 2018). Según Vokřál *et al.* (2019), las pruebas para determinar la germinación de semillas y el crecimiento temprano de raíces reveló una fitotoxicidad significativa de la ivermectina, mostrando una inhibición del crecimiento de raíces de hasta un 20 % a concentraciones tan bajas como 50 nM, nivel que es factible encontrar en ciertos ambientes. Esto plantea interrogantes sobre el posible impacto de los antihelmínticos en las plantas que crecen en suelos contaminados por estos compuestos.

Los antihelmínticos son actualmente clasificados como Contaminantes Orgánicos Emergentes (COE) (Jurado *et al.*, 2012; Lapworth *et al.*, 2012; Moreau *et al.*, 2019), lo que plantea preocupaciones potencialmente significativas debido a su impacto incierto y multifacético en el medio ambiente. Esta preocupación se amplifica por el hecho de que su presencia en diversos ecosistemas podría influir negativamente en la aparición y propagación de resistencias a los antihelmínticos en el ganado que consume plantas contaminadas con estos compuestos. En un estudio realizado por Navrátilová *et al.*, (2021) se administró albendazol a un grupo de ovejas infectadas de forma natural por nematodos gastrointestinales; el estiércol de estos animales se utilizó como fertilizante para un campo el cual posteriormente fue empleado como fuente de alimentación para un lote de ovejas de otra granja. Lo que sorprendió a los investigadores fue el hallazgo de niveles notablemente elevados del metabolito albendazol-sulfóxido en varias matrices, incluyendo el estiércol, las plantas, el plasma ovino, el contenido ruminal y las heces de las ovejas analizadas. Estos hallazgos aportan una evidencia valiosa y preocupante sobre la transmisión del albendazol desde las heces de las ovejas hacia las plantas, y su posterior transferencia a otros ejemplares de ovejas en condiciones agrícolas reales. Este ciclo de exposición a los fármacos, que puede considerarse un fenómeno de persistencia ambiental, potencialmente fomenta la aparición de resistencias antihelmínticas en los helminthos que infectan a los animales en pastores, complicando aún más la eficacia de los tratamientos en el ganado. Adicionalmente, KelleroVá *et al.* (2020a, 2020b) llevaron a cabo investigaciones que demostraron que la exposición a dosis subletales de albendazol y de su metabolito albendazol-sulfóxido en el nematodo gastrointestinal *Haemonchus contortus* inducía una activación significativa de varias enzimas responsables del metabolismo de estos compuestos. Este hecho mejoró la capacidad del

nematodo para eliminar el antihelmíntico durante tratamientos terapéuticos subsiguientes, lo que puede llevar a una disminución en la eficacia de los tratamientos convencionales. En resumen, los efectos acumulativos de los antihelmínticos en el medio ambiente y su potencial para inducir resistencias en los helmintos son áreas críticas que requieren una atención y un estudio más profundos para mitigar sus impactos adversos en la salud animal y la sostenibilidad de la ganadería.

¿Cuál es la situación en cuanto a la presencia de resistencias antihelmínticas en rumiantes?

La desparasitación estratégica del ganado, con normalmente dos tratamientos, uno en primavera y otro en otoño, tiene un enorme potencial para reducir la incidencia de infecciones por parásitos helmintos (Rojo-Vázquez y Hosking, 2013). Sin embargo, el uso indebido y masivo de estos fármacos como forma “preventiva”, y mayoritariamente sin un diagnóstico previo, es el origen de la aparición de las resistencias. El aumento de las poblaciones de parásitos resistentes es motivo de grave preocupación en toda Europa, especialmente en el ganado ovino, tanto por razones económicas como de salud pública y medioambiental (Himmelstjerna y Rinaldi, 2020). En este contexto, es importante destacar que, desde el 28 de enero de 2022 está vigente el nuevo Reglamento (UE) 2019/6 del Parlamento Europeo y del Consejo, del 11 de diciembre de 2018, sobre medicamentos veterinarios (por el que se deroga la Directiva 2001/82/CE), que contempla el uso sostenible de fármacos antihelmínticos para prevenir la aparición de resistencias.

La resistencia a los antihelmínticos ha evolucionado hasta convertirse en una amenaza global alarmante que pone en peligro el control eficaz de los parásitos y, por ende, la productividad sostenible de la ganadería. Un meta-análisis exhaustivo de datos provenientes de diversas investigaciones europeas revela que la prevalencia de la resistencia antihelmíntica a las principales clases de fármacos empleados en el tratamiento de nematodos gastrointestinales en el ganado oscilaba entre un 48 % y 86 % (Rose Vineer *et al.*, 2020). Esta situación se ve agravada por el creciente número de casos de resistencia cruzada y multirresistencia, lo que complica aún más la situación sanitaria del ganado. En España, los parásitos multirresistentes son altamente prevalentes, y no es infrecuente encontrar explotaciones en las que existe resistencia a todos los antihelmínticos disponibles en el mercado. En estudios realizados hace más de 15 años ya se detectó la presencia de resistencias en el 63,6 % de

los rebaños ovinos muestreados en Castilla y León (estudios realizados entre los años 2006 y 2011), la mayoría de ellos al levamisol (59,0 %), ivermectina (27,3 %) y albendazol (13,6 %), además se mostraron resistencias múltiples en el 27,2 % de ellos (Martínez-Valladares *et al.*, 2013a). Un estudio retrospectivo sobre la progresión de la resistencia en la misma Comunidad Autónoma, Castilla y León, llevado a cabo durante la última década, mostró que la resistencia se mantenía constante, siendo el nematodo gastrointestinal *Teladorsagia circumcincta* la especie más resistente (Martínez-Valladares *et al.*, 2015). Estos datos señalan a la RA como un grave problema para los pequeños rumiantes a medio plazo. Resultados similares se encontraron en Aragón entre los años 2007 y 2009, donde la prevalencia de resistencia antihelmíntica se estimó en un 11 % de los rebaños de ovino, aunque los autores sospecharon de la presencia de cepas de parásitos resistentes a los benzimidazoles en el 98 % de las muestras analizadas (Calvete y Uriarte, 2013). Datos más actuales sobre prevalencia de la resistencia en Castilla y León (muestreos realizados entre los años 2023 y 2024 en el ganado ovino) están demostrando un mantenimiento de los niveles de resistencia a los benzimidazoles (19,2 %), y sin embargo hay un aumento preocupante de la resistencia a las lactonas macrocíclicas, presente en el 77,8 % de los rebaños de ovino muestreados (González del Palacio *et al.*, 2024). Cabe destacar que los rebaños que resultaron resistentes a la ivermectina la estaban utilizando con asiduidad en los últimos años, por lo que su eficacia había disminuido irremediablemente. En paralelo, se llevó a cabo una encuesta a 140 ganaderos de ovino para identificar los factores que afectan la resistencia antihelmíntica en el país. La mayoría de los encuestados (53 %) tenía entre 51 y 65 años y un 59 % no contaba con estudios previos. Solo el 19 % planificaba las desparasitaciones con ayuda de su veterinario, mientras que el 60% consideraba estos tratamientos necesarios para mejorar la productividad. Aun cuando el 67 % creía necesario realizar coprologías para decidir sobre si era necesario desparasitar, solamente el 21 % lo hacía de forma previa. Menos de la mitad (42 %) consideraba la resistencia como un problema a tener en cuenta en su explotación y el 12 % sospechaba de su presencia en sus rebaños. Sin embargo, solamente el 7 % había realizado en algún momento alguna prueba para detectar resistencias. En cuanto a los fármacos usados en el último año, solo el 15 % pudo indicar qué fármaco había utilizado. Los principios activos más utilizados fueron mebendazol y closantel (26 % cada uno), seguidos por ivermectina (18 %) y netobimín (16 %), siendo la combinación de mebendazol y closantel la más administrada (32 %) (Martínez-Valladares *et al.*,

2024). Este estudio demuestra la falta de conocimiento por parte de los ganaderos sobre el control de los parásitos y la problemática de la resistencia antihelmíntica. Es por ello que se necesitan de más recursos para poder formar a los ganaderos y de esta forma aplicar todas las medidas disponibles de control de forma más efectiva con el fin último de preservar la eficacia de los tratamientos antihelmínticos actuales. Esto es de gran importancia ya que a pesar de la alta prevalencia de las infecciones por parásitos helmintos, existen escasas vacunas de uso veterinario. Recientemente se comercializó Barbervax® para prevenir la infección por *H. contortus* en Australia; lamentablemente, las vacunas de subunidades basadas en las proteínas H11 y H-gal-GP no han tenido éxito a la hora de conferir protección (Stutzer *et al.*, 2018; González- Sánchez *et al.*, 2019). Además, la falta de nuevos fármacos está agravando el problema de la resistencia. Los fármacos monepantel y derquantel, introducidos inicialmente en Nueva Zelanda la década pasada (Kaminsky *et al.*, 2008; Little *et al.*, 2010), fueron una solución temporal ya que, debido al uso inadecuado de los fármacos, se han descrito ya numerosos casos de resistencia en diferentes países alrededor de todo el mundo en aquellos países donde se comercializan (Scott *et al.*, 2013; Van den Brom *et al.*, 2015).

La Organización Mundial de Sanidad Animal (WOAH, 2021), anteriormente conocida como OIE, ha emitido alertas sobre la necesidad urgente e ineludible de un uso responsable y prudente de los antihelmínticos para mitigar el desarrollo de resistencias en el ganado. La utilización continua de estos fármacos no solo favorece el probable surgimiento de cepas resistentes, sino que también representa un riesgo potencialmente significativo para el medio ambiente. Si un tratamiento no resulta eficaz debido a la presencia de cepas de helmintos resistentes, es altamente probable que se incremente la frecuencia de tratamientos con otros antihelmínticos, lo que a su vez conllevaría una mayor concentración de residuos en el entorno natural.

¿Existen alternativas a la utilización de los fármacos antihelmínticos para el control de la infección?

En consecuencia, actualmente se están implementando diversas formas alternativas de control de helmintos en el ganado, con el objetivo último de reducir la dependencia de los fármacos convencionales. Entre las soluciones sostenibles que se han propuesto se encuentran los “tratamientos selectivos dirigidos”, que se aplica a animales individuales utilizando herramientas de apoyo a la toma de decisiones, como el recuento

de huevos en heces y el aumento de peso del ganado. Otra opción es el «tratamiento selectivo» basado en herramientas de evaluación de riesgo relacionadas con los pastos, como la detección de anticuerpos específicos del parásito en la leche, para decidir cuándo y cómo tratar a los animales. Además, se han identificado prácticas alternativas o complementarias que incluyen el uso de nutracéuticos (compuestos bioactivos), hongos nematocidas, la vacunación y/o la implementación de prácticas de gestión sostenible de los pastos (Charlier *et al.*, 2022). También se han desarrollado pruebas diagnósticas novedosas para las infecciones por helmintos y la detección de la resistencia a los antihelmínticos así como herramientas de apoyo a la toma de decisiones sobre la necesidad o no de desparasitar al rebaño (Rinaldi *et al.*, 2022).

Aunque estos enfoques se han descrito en la literatura científica, han recibido relativamente poca atención en la práctica, en parte porque la demanda de su uso era baja en un contexto donde los medicamentos eficaces eran accesibles y asequibles. Por lo tanto, los agricultores a menudo no aplican de forma rutinaria prácticas sostenibles, a pesar de que estas prácticas de gestión están diseñadas específicamente para frenar el avance de la Resistencia antihelmíntica. Parece evidente que la aceptación y aplicación de prácticas de gestión sostenibles es más efectiva cuando las recomendaciones cumplen con los criterios de practicidad y viabilidad económica de los agricultores. Esto resalta la importancia de desarrollar estrategias que no solo sean efectivas desde el punto de vista científico, sino también factibles y atractivas para los productores en el campo.

¿Cuáles son los principales desafíos globales que tendremos que abordar en el control de las infecciones por helmintos en rumiantes?

El Pacto Verde Europeo (<https://www.consilium.europa.eu/es/policies/green-deal/>) establece un ambicioso y trascendental objetivo, convertir a la Unión Europea (UE) en el primer continente climáticamente neutro antes del año 2050. Esta meta implica un profundo compromiso de transformación en todas las áreas del desarrollo económico, social y ambiental. Como parte de este plan, la estrategia de la UE denominada “De la Granja a la Mesa” (<https://www.consilium.europa.eu/es/policies/from-farm-to-fork/>) se ha fijado en abordar la contaminación del suelo con el fin de reducir a la mitad el uso de pesticidas de aquí al 2030. Este esfuerzo se enfoca no solo en disminuir los riesgos que los compuestos químicos representan para la salud humana y los ecosistemas,

sino también en fomentar prácticas agrícolas más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente. Paralelamente, la estrategia “Biodiversidad” (https://environment.ec.europa.eu/strategy/biodiversity-strategy-2030_en) de la UE busca mitigar los riesgos de los plaguicidas y, además, promueve que un 25 % de las tierras agrícolas en el territorio europeo se destine a prácticas de agricultura ecológica. Este enfoque tiene como objetivo fomentar la biodiversidad, al tiempo que combate la degradación del suelo, protegiendo así los ecosistemas y asegurando una mayor resiliencia ambiental. Asimismo, el Programa de Investigación de la UE sobre medio ambiente, clima y salud, 2021-2030, establece seis grandes objetivos (Dravvik *et al.*, 2022). En este contexto, el objetivo 3, titulado “sustancias químicas y factores físicos de estrés - prevenir y eliminar las exposiciones químicas nocivas para la salud”, se centra en analizar de manera exhaustiva los efectos que las sustancias químicas y otros factores ambientales de estrés pueden tener en la salud humana y en el medio ambiente. Aunque se han logrado importantes avances en la identificación de estos riesgos, persisten las incertidumbres sobre los impactos específicos que pueden tener diferentes grupos de factores de estrés en los ecosistemas y en la salud humana. Este objetivo se relaciona con el objetivo 6, el cual subraya la importancia de “promover la investigación sobre el cambio transformador en el medio ambiente, el cambio climático y la salud”. En esta dirección, se considera necesario que las sociedades desarrollen la capacidad de adaptarse a los retos crecientes planteados tanto por los factores de estrés ambiental como por el cambio climático. Para lograrlo, será indispensable una transformación profunda en el comportamiento individual y colectivo, así como en las políticas que rijan todos los sectores y áreas de gobierno.

Dentro de estos desafíos se encuentran los denominados COE, Contaminantes Orgánicos Emergentes, que son una serie de compuestos manufacturados cuyo número supera los 950, según un informe de la red NORMAN (del inglés, Network of reference laboratories, research centres and related organisations for monitoring of emerging environmental substances) (2016). En su mayoría, estos compuestos no están regulados y presentan riesgos de toxicidad en gran medida desconocidos. Los COE incluyen productos farmacéuticos, productos de cuidado personal, compuestos veterinarios, sustancias industriales, pesticidas, aditivos alimentarios y nanomateriales. Se les considera “emergentes” debido a su reciente identificación en el ambiente, lo cual ha sido posible gracias a avances en técnicas analíticas más sensibles y precisas. Entre las preocupaciones actuales, la aparición de estos contaminantes, como los

antihelmínticos, ha suscitado una alerta creciente por sus posibles efectos adversos sobre la salud humana y el equilibrio ambiental (Moreau *et al.*, 2019). Aunque algunos de estos antihelmínticos se incluyen en la categoría de “nematocidas” dentro de la Directiva sobre agua potable (Directiva 2020/2184) y la Directiva sobre aguas subterráneas (Directiva 2006/118/CE) de la UE, actualmente no se lleva a cabo una cuantificación reglamentaria específica de estos compuestos en ninguno de estos dos tipos de aguas. Adicionalmente, no se han establecido estándares de calidad ambiental para estos compuestos en aguas naturales.

La Agencia Europea de Medicamentos (CVMP, 2016) ha señalado que la falta de información suficiente dificulta una determinación definitiva sobre 20 sustancias que podrían clasificarse como “sustancias tóxicas, persistentes y bioacumulativas”, muchas de las cuales son fármacos que actúan frente a diferentes especies de parásitos y que son empleadas en la producción de especies de consumo humano. Uno de los compuestos considerados en este grupo es fármaco antihelmíntico moxidectina, cuya presencia en el medio ambiente plantea desafíos importantes. La vigilancia ambiental desempeña un papel esencial, ya que permite evaluar las posibles consecuencias de estos contaminantes en el contexto del cambio climático. Además, el aumento proyectado en el uso de antihelmínticos, debido a la proliferación de fenómenos meteorológicos extremos que incrementan la carga parasitaria en el ganado y en otros organismos, subraya la necesidad urgente de mejorar el testaje ambiental (Bloschl *et al.*, 2019).

Por otro lado, la resistencia a los antihelmínticos se ha convertido en un problema crítico en el control de las infecciones por helmintos, afectando no solo a los nematodos gastrointestinales pero ahora se presenta también como una amenaza emergente en *Fasciola* spp (Charlier *et al.*, 2022). Estos fármacos antihelmínticos desempeñan un papel fundamental en la salud, el bienestar y la productividad de los sistemas ganaderos basados en el pastoreo, ya que permiten un control efectivo de los parásitos que comprometen tanto la salud de los animales como la rentabilidad de las explotaciones. Sin embargo, debido a las limitaciones en el desarrollo de nuevos antihelmínticos, resulta cada vez más esencial tomar medidas para asegurar un uso sostenible y responsable de los recursos farmacológicos disponibles. Esta urgencia radica en que, si el ganado se expone accidentalmente a niveles bajos de estos fármacos o sus metabolitos, y luego se infecta con parásitos helmintos, se cree que estos últimos podrían adaptar sus mecanismos de detoxificación, incrementando

así su resistencia a los tratamientos. En este sentido, la necesidad de revisar y optimizar el enfoque actual en el uso de antihelmínticos es cada vez más reconocida, y se ha hecho evidente que el desarrollo de métodos más sostenibles para controlar la propagación de la resistencia a estos fármacos es un objetivo de gran urgencia.

Hasta el momento, solo unas pocas investigaciones han abordado el tema de la presencia de antihelmínticos y sus metabolitos en el medio ambiente, siendo normalmente limitados en cuanto al análisis de los riesgos potenciales que su presencia puede representar para los ecosistemas acuáticos, las plantas, y la microbiota del suelo. Aunque la relación entre la exposición de animales a residuos de antihelmínticos y el desarrollo de resistencia aún no ha sido probada de manera concluyente, se sugiere que esta exposición puede estar asociada con el incremento en las resistencias observadas en las últimas décadas. Para abordar este complejo problema de forma efectiva, resulta necesario no solo reducir el uso de estos fármacos, sino también desarrollar e implementar alternativas que permitan una gestión eficaz de los parásitos sin comprometer la producción animal ni la salud ambiental. Sin embargo, el éxito en la implementación de estos métodos alternativos dependerá de la comprensión de las barreras que históricamente han dificultado su uso en el sector ganadero.

DISCUSIÓN CRÍTICA Y CONCLUSIONES CONCISAS

¿Cuál sería la hoja de ruta a seguir según la situación actual del uso de los fármacos antihelmínticos?

Tal y como se mencionó anteriormente, investigaciones recientes han revelado la presencia de residuos de antihelmínticos en el medio ambiente, en ciertos casos detectándose en concentraciones cercanas al límite general establecido para plaguicidas (75 ng/l). No obstante, los estudios disponibles son todavía muy escasos y en su mayoría se han centrado únicamente en muestras de suelo, dejando prácticamente sin explorar la presencia de estos residuos en el agua. Ante esta situación, es fundamental ampliar el conocimiento sobre la distribución real de estos residuos, analizar su impacto en el entorno y determinar las prácticas agrícolas que pueden contribuir a reducir su acumulación y efectos adversos.

Abordar de forma integral la cuestión de los residuos de antihelmínticos en el medio ambiente y su repercusión requiere, además, comprender con precisión el patrón de uso de estos fármacos y los factores que determinan su aplicación. Para ello es necesario conocer de forma

detallada las ventas y el uso de cada una de las familias de los fármacos antihelmínticos, con el objetivo de trazar un panorama claro de las tendencias en el uso de estos productos. Además, habría que evaluar la eficacia de estos fármacos en el tratamiento de parásitos en el ganado, ya que se ha observado que la resistencia a los antihelmínticos puede derivar en un uso y dosificación incrementados, lo que genera un aumento de los residuos en el entorno natural. Llevar un seguimiento continuo de la presencia de estos fármacos es esencial para testar los cambios a lo largo del tiempo, vinculándolos tanto con prácticas ganaderas específicas —como dosis y vías de administración—, así como con los procesos de gestión del estiércol (producción, recogida, almacenamiento, tratamiento y aplicación en el suelo). Para medir eficazmente los residuos de antihelmínticos en distintos componentes del entorno —tanto en suelo como en diversas fuentes de agua—, resulta indispensable desarrollar métodos analíticos precisos y adaptados al tipo de muestra. Además, es crucial investigar cómo otros factores, incluidos los ambientales y climáticos, influyen en la distribución y el ciclo de estos compuestos y sus metabolitos en el medio ambiente. Las condiciones del suelo, la topografía, la hidrología, así como la temperatura y las precipitaciones, son variables clave que afectan la circulación de los antihelmínticos y podrían modificar su comportamiento y persistencia.

Hasta la fecha, la evaluación del riesgo ambiental para los medicamentos veterinarios, incluyendo los antihelmínticos, se ha basado en un análisis de dos fases centrado en el producto en lugar de en sus compuestos activos. En este modelo, los datos de ecotoxicidad y exposición que se requieren son bastante limitados en comparación con otros marcos de regulación de sustancias químicas en Europa, como en el caso de los plaguicidas o biocidas. No obstante, es fundamental revisar los efectos potenciales de los antihelmínticos en distintos niveles tróficos tanto en los ecosistemas terrestres como acuáticos. En el suelo, los criterios de valoración incluirían el impacto sobre la microbiota del suelo —en términos de funciones y diversidad—, los nematodos, las lombrices de tierra, los artrópodos beneficiosos para el suelo, las plantas (flora silvestre y cultivos forrajeros para animales), así como las fases de vida libre de los parásitos helmintos, los artrópodos parásitos y las abejas. En los ecosistemas acuáticos, se deberían evaluar los efectos sobre vertebrados, invertebrados y plantas acuáticas. Los resultados de estas evaluaciones podrían utilizarse para proponer valores umbral, los cuales serían de utilidad para orientar acerca de una nueva regulación y protección ambiental en este ámbito.

Para alcanzar el ambicioso objetivo de cero residuos en el medio ambiente antes de 2030, tal y como lo indica el Pacto Verde Europeo, es esencial evaluar, priorizar e implementar prácticas agrícolas que prevengan el uso excesivo o inadecuado de los fármacos antihelmínticos. En este sentido, se están desarrollando y evaluando métodos alternativos y más sostenibles para el control de enfermedades causadas por parásitos helmintos. Estos incluyen tratamientos selectivos que minimizan la exposición innecesaria, el uso de hongos nematófagos que pueden servir como control biológico, el empleo de nutracéuticos como alternativa a los medicamentos, y la mejora de métodos diagnósticos que permiten reducir el uso de antihelmínticos cuando no son necesarios o en casos de resistencia. Para que estas prácticas se integren efectivamente en la actividad ganadera, es fundamental concienciar a los ganaderos sobre la presencia e impacto de estos residuos en el medio ambiente, y sobre la importancia de sus decisiones en el control de los parásitos. Además, deben comprender el riesgo de que un uso excesivo o indebido de antihelmínticos favorece el desarrollo de resistencias, amenazando tanto la eficacia de los tratamientos como el equilibrio ambiental. Esta sensibilización será clave para fomentar una adopción amplia de prácticas sostenibles y para alcanzar los objetivos de protección ambiental en la gestión ganadera.

Los enfoques clásicos para estudiar los antihelmínticos de origen emergente en el medio ambiente suelen centrarse únicamente en identificar su presencia y analizar sus efectos, sin considerar otros factores relevantes como el comportamiento de la industria farmacéutica (ventas, frecuencia de uso y eficacia de los fármacos), la gestión del estiércol, o el impacto de factores ambientales y condiciones climáticas. Sin embargo, aunque las tecnologías avanzadas y los conceptos innovadores son esenciales, no serán suficientes por sí solos para impulsar el cambio necesario.

Los puntos necesarios a contemplar en la hoja de ruta serían los siguientes:

- Realizar un seguimiento de las ventas, el uso y la eficacia de los fármacos antihelmínticos en el ganado. Esta información permitirá entender mejor cómo estos productos circulan y se utilizan en el mercado, y su impacto potencial en el medio ambiente.
- Estudiar los factores específicos que influyen en la presencia y concentración de antihelmínticos en el entorno, para lo cual se deberían

emplear técnicas avanzadas de muestreo y seguimiento de alta resolución. Esto ayudaría a identificar las principales fuentes de emisión y las condiciones que favorecen la dispersión de los residuos en diversos ecosistemas.

- Determinar el impacto de los residuos de los fármacos antihelmínticos en diferentes tipos de ecosistemas, tanto terrestres como acuáticos, para identificar los efectos negativos que pueden tener en organismos y comunidades tróficas.
- Implementar de técnicas de gestión más efectivas para el uso de los antihelmínticos, integrando tratamientos alternativos y aplicando las mejores prácticas disponibles. Para ello habrá que hacer una evaluación de las opciones disponibles como la aplicación de tratamientos selectivos, el biocontrol, o evitar el uso innecesario de fármacos, todos ellos para minimizar su impacto ambiental sin comprometer la salud y producción animal.
- Entender las barreras y dificultades que pueden impedir la implementación de todos estos métodos sostenibles a corto plazo. Para ello es necesario conocer las percepciones y actitudes de los ganaderos y veterinarios, así como otros actores relevantes que ayudarán a desarrollar estrategias de comunicación y capacitación que promuevan el cambio hacia prácticas más sostenibles.
- Estudiar el impacto del uso de los fármacos antihelmínticos integrando todos los factores anteriormente mencionados. Para ello es necesario realizar una modelización que incluya tanto los beneficios de estos tratamientos en la salud animal, como los riesgos potenciales para los ecosistemas, lo que permitirá realizar una evaluación completa del beneficio-riesgo mediante modelos matemáticos. Estos modelos podrán ayudar en la toma de decisiones en la gestión de los tratamientos, buscando un equilibrio entre la eficacia del control de los parásitos, los rendimientos productivos y la protección del medio ambiente.

Como conclusión final destacar que es necesario tender un puente entre las distintas disciplinas que han desarrollado enfoques individuales para abordar la aparición y el impacto de los antihelmínticos en el medio ambiente, así como para gestionar su uso en el ganado. El resultado de estas colaboraciones serán nuevas combinaciones inteligentes de

tecnologías alternativas y complementarias, así como directrices sobre mejores prácticas de manejo. Los esfuerzos conjuntos aportarían pruebas sobre la presencia de los fármacos antihelmínticos y sus metabolitos en el medio ambiente, que será necesario considerar en un contexto normativo. Por otro lado, para implicar eficazmente a las principales partes interesadas del sector de la sanidad animal, es esencial comprender cómo perciben el control de los helmintos los veterinarios, los ganaderos y las empresas farmacéuticas. Además, sería necesario explorar las formas más sostenibles de reducir el uso de antihelmínticos en el ganado y aplicarlos con éxito en diversos entornos y prácticas ganaderas. Para ello habría que incorporar técnicas y conocimientos procedentes de ámbitos hasta ahora inexplorados, en particular las ciencias sociales, para comprender el comportamiento humano en relación con el control de los helmintos, incluyendo la elección de los productos antihelmínticos y los obstáculos a la adopción de los consejos sobre mejores prácticas.

BIBLIOGRAFÍA CITADA Y NOTAS ACLARATORIAS

- [1] Babić S, Mutavdžić Pavlović D, Asperger D, Perisa M, Zrncić M, Horvat AJ, Kastelan-Macan M. Determination of multi-class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Anal Bioanal Chem.* 2010, 398:1185-94.
- [2] Beynon SA. Potential environmental consequences of administration of anthelmintics to sheep. *Vet Parasitol.* 2012, 189:113-24.
- [3] Blöschl G, Hall J, Viglione A, *et al.* Changing climate both increases and decreases European river floods. *Nature.* 2019, 573:108-111.
- [4] Calvete C, Uriarte J. Improving the detection of anthelmintic resistance: evaluation of faecal egg count reduction test procedures suitable for farm routines. *Vet Parasitol.* 2013, 196:438-52.
- [5] Charlier J, Rinaldi L, Musella V, Ploeger HW, Chartier C, Vineer HR, Hinney B, von Samson-Himmelstjerna G, Băcescu B, Mickiewicz M, Mateus TL, Martinez-Valladares M, Quealy S, Azai-zeh H, Sekovska B, Akkari H, Petkevicius S, Hektoen L, Höglund J, Morgan ER, Bartley DJ, Claerebout E. Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the

ruminant livestock industry in Europe. *Prev Vet Med.* 2020, 182:105103.

- [6] Charlier J, Bartley DJ, Sotiraki S, Martinez-Valladares M, Claerebout E, von Samson-Himmelstjerna G, Thamsborg SM, Hoste H, Morgan ER, Rinaldi L. Anthelmintic resistance in ruminants: challenges and solutions. *Adv Parasitol.* 2022, 115:171-227.
- [7] Charlier J, van der Voort M, Kenyon F, Skuce P, Vercruysse J. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends Parasitol.* 2014, 30:361-7.
- [8] Charuaud L, Jarde E, Jaffrezic A, Thomas MF, Le Bot B. Veterinary pharmaceutical residues from natural water to tap water: Sales, occurrence and fate. *J Hazard Mater.* 2019, 361:169-186.
- [9] Coxon C., 2011. Agriculture and karst. In: Van Beynen, P.E. (Ed.), *Karst Management*. Springer.
- [10] CVMP, 2016. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). Reflection paper on the authorisation of veterinary medicinal products containing (potential) persistent, bioaccumulative and toxic (PBT) or very persistent and very bioaccumulative (vPvB) substances. EMA/CVMP/448211/2015 London, United Kingdom.
- [11] Drakvik E, Kogevinas M, Bergman Å, Devouge A, Barouki R; HERA (Health and Environment Research Agenda) Consortium. Priorities for research on environment, climate and health, a European perspective. *Environ Health.* 2022, 21:37.
- [12] González del Palacio L, Ruiz Somacarrera M, Balaña Fouce R, Martínez-Valladares M. Detección de resistencias a fármacos antihelmínticos en rebaños de ganado ovino infectados por nematodos gastrointestinales en las provincias de León y Zamora. *Parasitology*, V Edición especial del XXIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología. 2014, 88.
- [13] González-Sánchez ME, Nombasi-Bokuy M, Cuquerella M, Alunda JM. Immunization with recombinant rHc23 partially protects lambs against trickle infections by *Haemonchus contortus*. *BMC Vet Res.* 2019, 15:333.
- [14] Hanrahan L, McHugh N, Hennessy T, Moran B, Kearney R, Wallace M, Shalloo L. Factors associated with profitability in pasture-

- based systems of milk production. *J Dairy Sci.* 2018 101:5474-5485.
- [15] Horvat A JM, Babić S, Pavlović D M, Ašperger D, Pelko S, Kaštelan-Macan M, Petrović M, Mance AD. Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment. 2012. TrAC, Trends in Analytical Chemistry (Regular Ed.), 31, 61–84.
 - [16] Iglesias LE, Saumell C, Sagüés F, Sallovitz JM, Lifschitz AL. Ivermectin dissipation and movement from feces to soil under field conditions. *J Environ Sci Health B.* 2018, 53:42-48.
 - [17] Jacobs CT, Scholtz CH. A review on the effect of macrocyclic lactones on dung-dwelling insects: Toxicity of macrocyclic lactones to dung beetles. *Onderstepoort J Vet Res.* 2015, 82:858.
 - [18] Junco M, Iglesias LE, Sagués MF, Guerrero I, Zegbi S, Saumell CA. Effect of macrocyclic lactones on nontarget coprophilic organisms: a review. *Parasitol Res.* 2021, 120:773-783.
 - [19] Jurado A, Vázquez-Sune E, Carrerra J, López de Alda M, Pujades E, Barcelo D. Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: a review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Science of the Total Environment.* 2012, 440:82–94.
 - [20] Kaminsky R, Ducray P, Jung M, Clover R, Rufener L, Bouvier J, Weber SS, Wenger A, Wieland-Berghausen S, Goebel T, Gauvry N, Pautrat F, Skripsky T, Froelich O, Komoin-Oka C, Westlund B, Sluder A, Mäser P. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature.* 2008, 452(7184):176-80.
 - [21] Kellerová P, Navrátilová M, Nguyen LT, Dimunová D, Raisová Stuchlíková L, Štěrbová K, Skálová L, Matoušková P. UDP-Glycosyltransferases and Albendazole Metabolism in the Juvenile Stages of *Haemonchus contortus*. *Front Physiol.* 2020a, 11:594116.
 - [22] Kellerová P, Raisová Stuchlíková L, Matoušková P, Štěrbová K, Lamka J, Navrátilová M, Vokřál I, Szotáková B, Skálová L. Sublethal doses of albendazole induce drug metabolizing enzymes and increase albendazole deactivation in *Haemonchus contortus* adults. *Vet Res.* 2020b, 51:94.

- [23] Kreuzig R, Blümlein K, Höltge S. Fate of the benzimidazole anti-parasitics flubendazole and fenbendazole in manure and manured soils. *Clean Soil Air Water*. 2007, 35: 488–494.
- [24] Lagos S, Moutzourelis C, Spiropoulou I, Alexandropoulou A, Karas PA, Saratsis A, Sotiraki S, Karpouzas DG. Biodegradation of anthelmintics in soils: does prior exposure of soils to anthelmintics accelerate their dissipation?. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2022, 29: 62404-62422.
- [25] Lagos S, Tsetsekos G, Mastrogianopoulos S, Tyligada M, Diamanti L, Vasileiadis S, Sotiraki S, Karpouzas DG. Interactions of anthelmintic veterinary drugs with the soil microbiota: Toxicity or enhanced biodegradation?. *Environ Pollut*. 2023, 334:122135.
- [26] Lapworth DJ, Baran N, Stuart ME, Ward RS. Emerging organic contaminants in groundwater: a review of sources, fate and occurrence. *Environ Pollut*. 2012, 163:287–303.
- [27] Lewis MJ, Didham RK, Evans TA, Berson JD. Experimental evidence that dung beetles benefit from reduced ivermectin in targeted treatment of livestock parasites. *Sci Total Environ*. 2024, 945:174050.
- [28] Little PR, Hodges A, Watson TG, Seed JA, Maeder SJ. Field efficacy and safety of an oral formulation of the novel combination anthelmintic, derquantel- abamectin, in sheep in New Zealand. *N Z Vet J*. 2010, 58:121-9.
- [29] Lumaret JP, Errouissi F, Floate K, Römbke J, Wardhaugh K. A review on the toxicity and non-target effects of macrocyclic lactones in terrestrial and aquatic environments. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012, 13:1004-60.
- [30] Manning P, Beynon SA, Lewis OT. Quantifying immediate and delayed effects of anthelmintic exposure on ecosystem functioning supported by a common dung beetle species. *PLoS One*. 2017, 12(8):e0182730.
- [31] Martínez-Valladares M, Geurden T, Bartram DJ, Martínez-Pérez JM, Robles-Pérez D, Bohórquez A, Florez E, Meana A, Rojo-Vázquez FA. Resistance of gastrointestinal nematodes to the most

commonly used anthelmintics in sheep, cattle and horses in Spain. *Vet Parasitol.* 2015, 211:228-33.

- [32] Martínez-Valladares M, Martínez-Pérez JM, Robles-Pérez D, Cordero- Pérez C, Famularo MR, Fernández-Pato N, Castañón-Ordóñez L, Rojo- Vázquez FA. The present status of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematode infections of sheep in the northwest of Spain by in vivo and in vitro techniques. *Vet Parasitol.* 2013a, 191(1-2):177-81.
- [33] Martínez-Valladares M, Martín-Ramos E, Esteban-Ballesteros M, Balaña- Fouce R, Rojo-Vázquez FA. Effect of level of infection by gastrointestinal nematodes and anthelmintic treatment on milk yield in dairy sheep. *Parasite.* 2021, 28:71.
- [34] Martínez-Valladares M, Robles-Pérez D, Martínez-Pérez JM, Cordero- Pérez C, Famularo Mdel R, Fernández-Pato N, González-Lanza C, Castañón- Ordóñez L, Rojo-Vázquez FA. Prevalence of gastrointestinal nematodes and *Fasciola hepatica* in sheep in the northwest of Spain: relation to climatic conditions and/or man-made environmental modifications. *Parasit Vectors.* 2013b, 6: 282.
- [35] Martínez-Valladares, González del Palacio L, Castilla Gómez De Agüero V, Ruiz Somacarrera M, Valderas García E, Balaña Fouce R. Factores socio- económicos que afectan a la aparición y desarrollo de las resistencias antihelmínticas en el ganado ovino. *Parajournal*, V Edición especial del XXIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología. 2014, 99.
- [36] McKellar QA. Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. *Vet Parasitol.* 1997, 72: 413-26; discussion 426-35.
- [37] Mooney D, Richards KG, Danaher M, Grant J, Gill L, Mellander PE, Coxon CE. An analysis of the spatio-temporal occurrence of anthelmintic veterinary drug residues in groundwater. *Sci Total Environ.* 2021, 769:144804.
- [38] Moreau M, Hadfield J, Hughey J, Sanders F, Lapworth DJ, White D, Civil W. A baseline assessment of emerging organic contaminants in New Zealand groundwater. *Sci Total Environ.* 2019, 686:425-439.

- [39] Navrátilová M, Raisová Stuchlíková L, Matoušková P, Ambrož M, Lamka J, Vokřál I, Szotáková B, Skálová L. Proof of the environmental circulation of veterinary drug albendazole in real farm conditions. *Environ Pollut.* 2021, 286:117590.
- [40] NORMAN network, 2016. List of Emerging Substances.
<https://www.norman-network.net/?q=node/19>
- [41] Norton J, Ouyang Y. Controls and Adaptive Management of Nitrification in Agricultural Soils. *Front Microbiol.* 2019, 10:1931.
- [42] Rinaldi L, Krücken J, Martinez-Valladares M, Pepe P, Maurelli MP, de Queiroz C, Castilla Gómez de Agüero V, Wang T, Cringoli G, Charlier J, Gilleard JS, von Samson-Himmelstjerna G. Advances in diagnosis of gastrointestinal nematodes in livestock and companion animals. *Adv Parasitol.* 202, 118:85-176.
- [43] Rojo-Vázquez FA, Hosking BC. A telephone survey of internal parasite control practices on sheep farms in Spain. *Vet Parasitol.* 2013, 192:166-72.
- [44] Rose Vineer H, Morgan ER, Hertzberg H, Bartley DJ, Bosco A, Charlier J, Chartier C, Claerebout E, de Waal T, Hendrickx G, Hinney B, Höglund J, Ježek J, Kašný M, Keane OM, Martínez-Valladares M, Mateus TL, McIntyre J, Mickiewicz M, Munoz AM, Phythian CJ, Ploeger HW, Rataj AV, Skuce PJ, Simin S, Sotiraki S, Spinu M, Stuen S, Thamsborg SM, Vadlejch J, Varady M, von Samson-Himmelstjerna G, Rinaldi L. Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: creation and meta-analysis of an open database. *Parasite.* 2020, 27:69.
- [45] Sarkar S, Kazarina A, Hansen PM, Ward K, Hargreaves C, Reese N, Ran Q, Kessler W, de Souza LFT, Loecke TD, Sarto MVM, Rice CW, Zeglin LH, Sikes BA, Lee STM. Ammonia-oxidizing archaea and bacteria differentially contribute to ammonia oxidation in soil under precipitation gradients and land legacy. *bioRxiv* [Preprint]. 2023, 12:2023.11.08.566028.
- [46] Scheffczyk A, Floate KD, Blanckenhorn WU, Düring RA, Klockner A, Lahr J, Lumaret JP, Salamon JA, Tixier T, Wohde M, Römbke J. Nontarget effects of ivermectin residues on earthworms and springtails dwelling beneath dung of treated cattle in four countries. *Environ Toxicol Chem.* 2016, 35:1959-69.

- [47] Scott I, Pomroy WE, Kenyon PR, Smith G, Adlington B, Moss A. Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet Parasitol.* 2013, 198:166-71.
- [48] Selzer PM, Epe C. Antiparasitics in Animal Health: Quo Vadis?. *Trends Parasitol.* 2021, 37:77-89.
- [49] Serafini S., de Freitas Souza C., Baldissera M.D., Baldisserotto B., Picoli F., Segat J.C., Baretta D., da Silva A.S. Fish exposed to eprinomectin show hepatic oxidative stress and impairment in enzymes of the phosphotransfer network. *Aquaculture.* 2019;508: 199–205.
- [50] Snow DD, Cassada DA, Biswas S, Shafieifini M, Li X, D'Alessio M, Carter L, Sallach JB. Detection, Occurrence and Fate of Emerging Contaminants in Agricultural Environments. *Water Environ Res.* 2018, 90:1348-1370.
- [51] Stutzer C, Richards SA, Ferreira M, Baron S, Maritz-Olivier C. Metazoan Parasite Vaccines: Present Status and Future Prospects. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018, 8:67.
- [52] Tolls J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environ Sci Technol.* 2001, 35:3397-406.
- [53] Van De Steene JC, Lambert WE. Validation of a solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometric method for the determination of nine basic pharmaceuticals in wastewater and surface water samples. *J Chromatogr A.* 2008, 1182:153-60.
- [54] Van den Brom R, Moll L, Kappert C, Vellema P. Haemonchus contortus resistance to monepantel in sheep. *Vet Parasitol.* 2015, 209:278-80.
- [55] Vokřál I, Michaela Š, Radka P, Jiří L, Lukáš P, Dominika S, Kateřina L, Barbora S, Lenka S. Ivermectin environmental impact: Excretion profile in sheep and phytotoxic effect in Sinapis alba. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019, 169:944-949.

- [56] Vokrál I, Podlipná R, Matoušková P, Skálová L. Anthelmintics in the environment: Their occurrence, fate, and toxicity to non-target organisms. *Chemosphere*. 2023, 345:140446.
- [57] Wagil M, Maszkowska J, Białk-Bielińska A, Stepnowski P, Kumirska J. A comprehensive approach to the determination of two benzimidazoles in environmental samples. *Chemosphere*. 2015, 119 Suppl:S35-41.
- [58] Wardhaugh KG. Insecticidal activity of synthetic pyrethroids, organophosphates, insect growth regulators, and other livestock parasiticides: an Australian perspective. *Environ Toxicol Chem*. 2005, 24:789-96.
- [59] World Organisation for Animal Health (OIE). Responsible and prudent use of anthelmintic chemicals to help control anthelmintic resistance in grazing livestock species. 2021.
<https://www.woah.org/en/document/anthelmintics-grazing-livestock-2021/>
- [60] Zrnčić M, Gros M, Babić S, Kaštelan-Macan M, Barcelo D, Petrović M. Analysis of anthelmintics in surface water by ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry. *Chemosphere*. 2014, 99:224-32.

XI PREMIO LABORATORIOS ZENDAL

ESTUDIO DEL PROCESO ANGIOGÉNICO COMO MECANISMO DE SUPERVIVENCIA DE *DIROFILARIA IMMITIS* EN EL ENDOTELIO VASCULAR

RODRIGO MORCHÓN GARCÍA¹

ELENA CARRETÓN GÓMEZ²

MANUEL COLLADO CUADRADO³

IVÁN RODRÍGUEZ ESCOLAR⁴

ALFONSO BALMORI DE LA PUENTE⁵

CLAUDIA ALARCÓN-TORRECILLAS⁶

RESUMEN

La angiogénesis es un mecanismo por el cual se originan nuevos vasos a partir de otros preexistentes en respuesta a la fricción, obstrucción e hipoxia, procesos que se producen durante la dirofilariosis cardiopulmonar canina causada por *Dirofilaria immitis* en el endotelio vascular. El objetivo de este trabajo fue evaluar si varias proteínas específicas del antígeno excretor/secretor de los vermes adultos de *D. immitis* activan el mecanismo angiogénico y diferentes procesos asociados, como la

¹ Profesor Titular, Universidad de Salamanca.

² Profesora Titular, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

³ Estudiante predoctoral, Universidad de Salamanca.

⁴ Estudiante predoctoral, Universidad de Salamanca.

⁵ Investigador postdoctoral Margarita Salas.

⁶ Investigador postdoctoral.

migración y proliferación celular, en un modelo in vitro de células endoteliales vasculares. Estos cultivos fueron tratados con el antígeno excretor/secretor (DiES) como control positivo, el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular-A (VEGF-A) como precursor de la angiogénesis, y las moléculas recombinantes Actina (rDiAct), Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (rDiGAPDH) y Galectina (rDiGal) del antígeno excretor/secretor de vermes adultos de *D. immitis* con y sin VEGF-A, pieza clave en este proceso, durante 24 horas. Como control del cultivo se emplearon cultivos no tratados en las mismas condiciones. DiES+VEGF-A, rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH+VEGF-A y rDiGal+VEGF-A aumentaron significativamente la producción de VEGF-A, sVEGFR-2 y mEndogлина (moléculas pro-angiogénicas) en comparación con los otros cultivos tratados con las proteínas recombinantes exclusivamente, con VEGF-A y con los cultivos no tratados. Además, DiES+VEGF-A, rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH+VEGF-A y rDiGal+VEGF-A produjeron un aumento significativo en la proliferación y migración celular y en la formación de pseudocapilares. La estimulación del mecanismo proangiogénico, así como la inducción de los procesos celulares, podrían favorecer la supervivencia de *D. immitis* en los vasos sanguíneos y remodelar el endotelio vascular.

ABSTRACT

Angiogenesis is a mechanism by which new vessels originate from pre-existing ones in response to friction, obstruction and hypoxia, processes that occur during canine cardiopulmonary dirofilariasis caused by *Dirofilaria immitis* in the vascular endothelium. The aim of this work was to evaluate whether several specific proteins of the excretory/secretory antigen of adult *D. immitis* worms activate the angiogenic mechanism and related processes such as cell migration and proliferation, treated with the excretory/secretory antigen (DiES) as a positive control, Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) as a precursor of angiogenesis, and the recombinant molecules Actin (rDiAct), Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (rDiGAPDH) and Galectin (rDiGal) from the excretory/secretory antigen of adult *D. immitis* adult worms with and without VEGF-A, a key player in this process, for 24 hours. Untreated cultures under the same conditions were used as culture control. DiES+VEGF-A, rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH+VEGF-A and rDiGal+VEGF-A significantly increased the production of VEGF-A, sVEGFR-2 and mEndoglin (pro-angiogenic molecules) compared to the other cultures treated with the recombinant proteins alone, VEGF-A

and untreated cultures. In addition, DiES+VEGF-A, rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH+VEGF-A and rDiGal+VEGF-A produced a significant increase in cell proliferation, migration and pseudocapillary formation. Stimulation of the proangiogenic mechanism, as well as induction of cellular processes, could favour the survival of *D. immitis* in blood vessels and remodelling of the vascular endothelium.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El endotelio vascular

El endotelio vascular constituye la capa interna de los vasos sanguíneos. Es una superficie lisa formada por una monocapa de células endoteliales que actúa como barrera semipermeable entre el interior de los vasos sanguíneos (arterias, capilares y venas) y los tejidos circundantes. Supone un órgano clave para la regulación de muchos procesos fisiológicos, como la permeabilidad y el aporte de nutrientes al tejido, la regulación del tono vascular y el flujo sanguíneo, la respuesta inflamatoria, la hemostasia, la coagulación, la fibrinólisis o el remodelado de los tejidos vasculares, la proliferación y contracción del músculo liso vascular en respuesta a un daño vascular, y la producción de distintas sustancias con efectos autoreguladores (vasodilatadores y vasoconstrictores) (Dejana *et al.*, 2001, 2004).

Las células endoteliales son muy diferentes en cuanto a sus propiedades funcionales y a sus perfiles de expresión génica, que dependen del tipo de vaso al que pertenezcan, del órgano, de su grado de diferenciación y de su estado proliferativo (Herold y Kalucka, 2020). Podemos diferenciar, grosso modo, a las células endoteliales quiescentes, que hacen del endotelio una pared estable y una barrera funcional, y las células endoteliales activas que, ante determinados estímulos, pueden abandonar el endotelio y abordar procesos de proliferación, migración y quimiotaxis, o de establecimiento de uniones con otras células (Eilken y Adams, 2010).

1.2. Formación de los vasos sanguíneos y angiogénesis

Se pueden diferenciar dos procesos principales de formación de vasos sanguíneos, que son la vasculogénesis y la angiogénesis. Si bien existen otros procesos también importantes que complementan estos dos, como el remodelado vascular o la intususcepción, pero son los más estudiados (Patan, 2004).

La vasculogénesis consiste en la formación del plexo vascular primario o primitivo durante el desarrollo embrionario. Este proceso supone la formación de nuevos vasos a partir de hemangioblastos, células pluri-potentes que también dan lugar a las líneas hematopoyéticas. Los hemangioblastos, estimulados por moléculas, entre las que destaca el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (del inglés, Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), se diferencian y organizan dando lugar al plexo vascular primario (Patan, 2004). El sistema vascular aumenta su tamaño y complejidad durante el desarrollo embrionario gracias a los subsecuentes procesos de angiogénesis a partir del plexo primario (Coultas *et al.*, 2005; Herbert y Stainier, 2011).

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, un proceso clave en la resolución de situaciones fisiológicas como la cicatrización de heridas y los procesos inflamatorios obstructivos, entre otros (Figura 1). La angiogénesis se desencadena en respuesta a un estímulo (hipoxia/isquemia tisular) que conduce a un aumento del crecimiento, proliferación y diferenciación del endotelio vascular (Hershey *et al.*, 2001; Van *et al.*, 2001; Eilken y Adams, 2010).

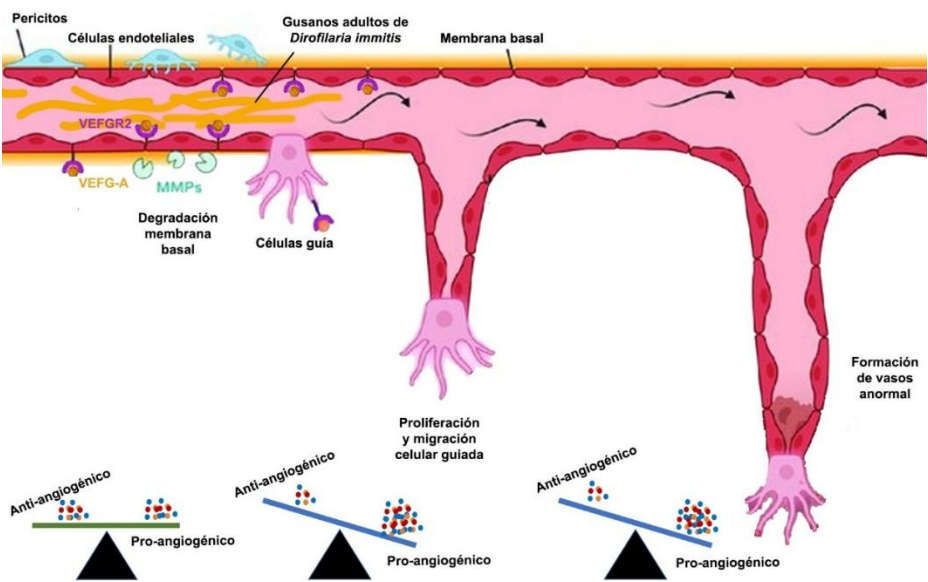


FIGURA 1. Mecanismo angiogénico y el papel del VEGF-A y sus procesos celulares. Imagen adaptada de García-Caballero *et al.* (2022).

Cuando un tejido crece, las células más alejadas de los vasos sanguíneos se encuentran ante una carencia de nutrientes, entre ellos el

oxígeno (Muñoz- Chápuli, 2011). Este gradiente hipóxico estimula a los vasos preexistentes, que empiezan a ramificarse y a formar nuevos vasos en dirección al foco hipóxico (Karamysheva, 2008). Son fundamentales las moléculas Factor Hipóxico Inducible 1α (del inglés, Hypoxia-Inducible Factor 1α , HIF- 1α) y el VEGF. Ante la hipoxia se acumula HIF- 1α , que activa la expresión de los “genes de respuesta a hipoxia”, siendo uno de ellos VEGF (Karamysheva, 2008). De esta forma, se genera un gradiente de VEGF (el factor angiogénico más potente) y, en respuesta a éste, las células endoteliales se activan y desdiferencian, pasando de estado quiescente a activo, degradan la membrana basal, inician la proliferación y migración, y comienzan a formar una yema guiada por el gradiente de VEGF, mediada por la interacción del VEGF-A-Receptor 2 (VEGFR-2) y VEGFR-2 soluble (sVEGFR-2). Esta yema crece alargándose hacia la fuente de VEGF, adquiere un lumen que será la luz del nuevo vaso y, al encontrarse con otra yema, sufre un proceso de anastomosis. Finalmente, el vaso puede madurar gracias a la cobertura mural del endotelio (Gerhardt *et al.*, 2003; Melincovici *et al.*, 2018). Este proceso finaliza con la inhibición de la proliferación y migración endotelial y la formación de nuevos capilares mediada por el factor de crecimiento β derivado de plaquetas (PDGF-B) y su receptor (PDGFR-B) (Betsholtz, 2004). Además, tanto VEGFR-1 como su forma soluble (sFlt1) ejercen una regulación negativa de la señalización a través de VEGFR-2, ya que actúan secuestrando el ligando e impidiendo que se una al receptor (Hazarika *et al.*, 2007).

Otra molécula principal es la endoglina, una glicoproteína transmembrana, esencial para la angiogénesis, la proliferación celular y el desarrollo vascular, que se expresa predominantemente en las células endoteliales vasculares y cuya supresión produce la inhibición de la angiogénesis (Liu *et al.*, 2014). Se han descrito varias isoformas de endoglina. Una de ellas, la forma circulante de endoglina, la endoglina soluble (sEndoglina), regula negativamente la producción de varias proteínas pro-angiogénicas y pro-migratorias implicadas en la angiogénesis (Gregory *et al.*, 2014; Gallardo-Vara *et al.*, 2018; Varejckova *et al.*, 2017). Sin embargo, la forma unida a membrana (mEndoglina) está implicada en procesos con efectos pro-angiogénicos (Ollauri-Ibáñez *et al.*, 2017).

1.3. Dirofilariosis cardiopulmonar canina

Dirofilaria immitis es el agente causal de la dirofilariosis cardiopulmonar, una enfermedad zoonótica y de transmisión vectorial, cuyo

hospedador más importante y del que más datos se conocen es el perro doméstico. Es una enfermedad compleja, progresiva y potencialmente mortal. El humano es considerado un hospedador accidental en donde, en la mayoría de los casos, pasa desapercibida, pudiendo llegar a producir nódulos pulmonares benignos y asintomáticos- Para que su ciclo biológico se complete son necesarios dos hospedadores, uno definitivo que actúe como reservorio y otro hospedador intermediario, que actúe como vector (Figura 2). Los hospedadores definitivos son cánidos y félidos domésticos y silvestres. Existen otros reservorios, además del perro, que pueden realizar este papel, como son el lobo o el zorro, entre otros. (Morchón *et al.*, 2012; 2024). La acción vectorial es ejercida por mosquitos culícidos pertenecientes a los géneros *Culex* spp., *Aedes* spp., *Anopheles* spp., *Culiseta* spp. y *Coquillettidia* spp., entre otros. En España, *Cx. pipiens* en la península Ibérica y *Cx. theileri* en las islas Canarias, son los principales vectores transmisores reportados hasta la fecha (Cancrini y Kramer, 2001; Cancrini *et al.*, 2006; Simón *et al.*, 2012).

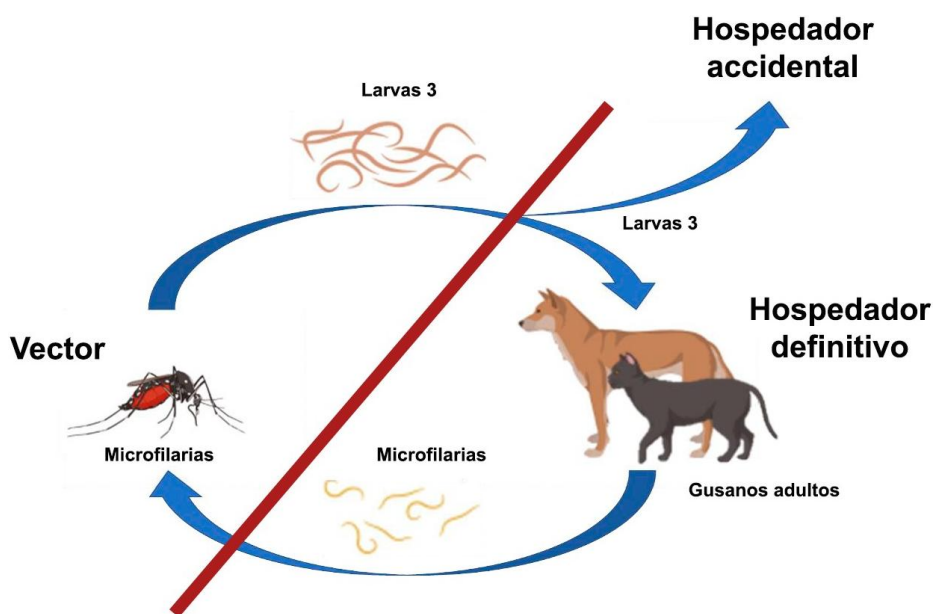


FIGURA 2. Ciclo biológico de *Dirofilaria immitis* y sus hospedadores.

En el hospedador definitivo canino, los vermes adultos se localizan en la cavidad derecha del corazón, entre la arteria pulmonar y el ventrículo derecho, pudiendo llegar a vivir durante años (Figura 3). Su cuerpo es largo y fino y presentan dimorfismo sexual. Los machos miden entre 12 y 20 cm de longitud y tienen un diámetro de 700 a 900 μm , y su

cola acaba en espiral. Las hembras, que tienen una longitud de 25 a 34 cm y un diámetro de 1 a 1,3 mm, presentan una cola corta y redondeada. Las hembras adultas son ovovivíparas, por lo que, después de ser fecundadas liberan al torrente circulatorio larvas de 1^{er} estadio o microfilarias (mf), que miden entre 290 y 330 μ m de longitud por 7 μ m de diámetro (Figura 3).

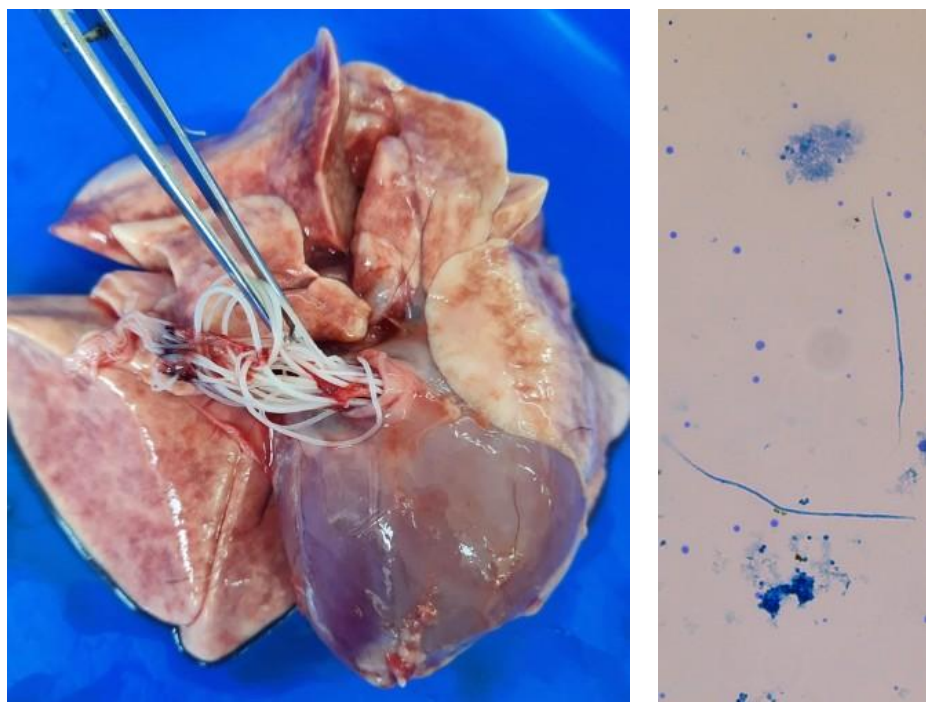


FIGURA 3. Vermes adultos de *Dirofilaria immitis* (♂ y ♀) saliendo de la arteria pulmonar (imagen izquierda) y microfilarias (imagen derecha) de un perro doméstico infectado.

Éstas son ingeridas por mosquitos vectores cuando estos se alimentan sobre individuos infectados. Después de aproximadamente 24 horas, migran desde el intestino del mosquito a los tubos de Malpighi, donde mudan dos veces. La primera ocurre, aproximadamente, a los 10 días después de la infección, apareciendo la larva de 2^o estadio (L₂), y la siguiente ocurre entre el 13^o y el 15^o día después de la toma de sangre, dando lugar a la larva de 3^{er} estadio (L₃). La duración del desarrollo larvario en los mosquitos varía dependiendo de las condiciones ambientales, principalmente de la temperatura. A 28-30°C dura de 8 a 10 días, a 24°C entre 11 y 12 días, y a 22°C entre 16 y 20 días. El porcentaje de

microfilarias que completan su desarrollo a L₃ puede variar entre el 0,4 y el 20% (Cancrini y Kramer, 2001).

Las L₃ son inoculadas en el tejido subcutáneo de un nuevo hospedador, durante la siguiente toma de sangre. Los mosquitos liberan sobre la herida causada por la picadura, una gota de hemolinfa con las L₃, que penetran en la piel del hospedador definitivo por sus propios medios. Las larvas mudan en un periodo no bien determinado, dando lugar a las larvas de 4º estadio (L₄). Según Sawyer (1965) ocurre antes de 3 días, según Kotani y Powers (1982) entre los 3 y 9 días postinfección (p.i.) y según Orihel (1961) entre los 9 y 12 días p.i. El cambio más significativo que ocurre en las L₄, además de un considerable aumento de su tamaño, es el desarrollo de los órganos reproductores. La transformación en preadultos ocurre entre los 50 y los 70 días p.i. Los vermes llegan a su localización definitiva en las arterias pulmonares y el ventrículo derecho del corazón entre los 68 y 70 días p.i., completándose la llegada de todos ellos hacia el día 120 p.i. Allí finalizan su desarrollo y se produce la fecundación. Las microfilarias pueden aparecer en la sangre periférica entre los 6 meses y medio y 7 meses p.i. La microfilaremia aumenta durante los 10 meses siguientes y se mantiene constante durante varios años (7 a 9 años), desapareciendo después progresivamente. La longevidad de las microfilarias puede alcanzar los dos años (Barriga, 1982; Quiroz-Romero, 1984; McCall, 2008).

En el hospedador humano, cuando el vector se alimenta de sangre, la mayoría de las L₃ que son inoculadas, son destruidas por la propia respuesta inmune e inflamatoria del propio hospedador. En algunos casos, las L₃ de *D. immitis* son retenidas por trombos que obstaculizan y ralentizan el riego sanguíneo dando como resultado una embolia pulmonar localizada. Estos se calcifican y forman un nódulo pulmonar calcificado, benigno y asintomático. También podemos encontrarlos en zonas ectópicas como en la zona ocular, hígado, testículos y en nódulos subcutáneos, como así se ha demostrado en investigaciones recientes (Simón *et al.*, 2022; Morchón *et al.*, 2024).

Como otras filarias, *D. immitis* alberga bacterias endosimbiontes del género *Wolbachia*, pertenecientes al orden Rickettsiales (α-2-Proteobacterias) (Figura 4) (Sironi *et al.*, 1995). Están presentes en todas las fases evolutivas de las filarias, siendo especialmente abundantes en las larvas que se desarrollan en los hospedadores vertebrados, en los cordones hipodérmicos de los adultos y en los órganos reproductores de las

hembras (Fenn y Blaxter, 2004; Lamb *et al.*, 2004). Participan en la muda, en la embriogénesis y en la respuesta inmune e inflamatoria hasta tal punto que, cuando son liberadas al torrente sanguíneo, aparecen los daños más importantes en el endotelio vascular (Morchón *et al.*, 2007, 2012; Kramer *et al.*, 2005; García-Guasch *et al.*, 2013).



FIGURA 4. Localización de *Wolbachia* sp. en ovarios y cordones hipodérmicos laterales (teñida en rojizo) de una hembra adulta de *Dirofilaria immitis* mediante la técnica de inmunohistoquímica en sección transversal.

La dirofilariosis cardiopulmonar es una enfermedad cosmopolita. En Europa es una enfermedad en continua expansión, siendo tradicionalmente endémica en los países de sur (Portugal, España, sur de Francia, Italia, Grecia y Turquía) y, en la actualidad, en el centro y el noreste con prevalencias entre el 3,6 y el 55%, dependiendo la zona (Morchón *et al.*, 2022). El aumento de la temperatura, junto con la globalización, el impacto humano, el aumento de la movilidad de animales domésticos y el intercambio de mercancías, han promovido la expansión de vectores y el aumento del número de reservorios (Simón *et al.*, 2017). En España,

la prevalencia en perros es del 6,47% (Montoya- Alonso *et al.*, 2022), siendo las provincias del noroeste y del sur, así como en las Islas Baleares y las Islas Canarias, en las que se han reportado las mayores prevalencias (Figura 5). Estos datos concuerdan con las predicciones de riesgo de infección mostradas en diferentes modelos geoclimáticos basados en el cálculo del calor acumulado necesario para el desarrollo de las L₃ en los mosquitos y la consiguiente transmisión y el hábitat idóneo para *Cx. pipiens* (Genchi *et al.*, 2009; Simón *et al.*, 2014; Rodríguez-Escolar *et al.*, 2023; Morchón *et al.*, 2023).

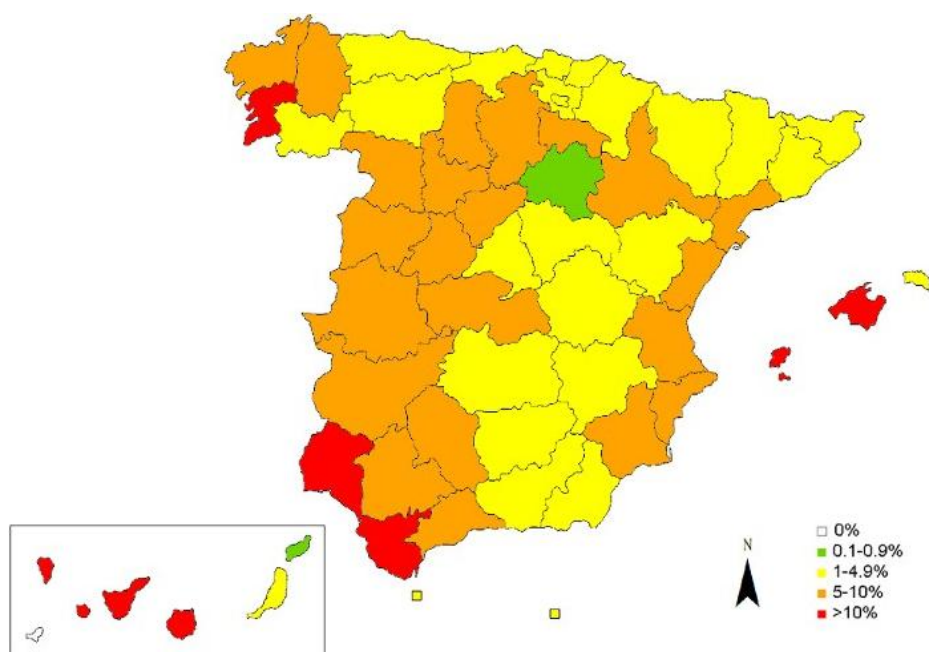


FIGURA 5. Mapa de prevalencia en perros domésticos infectados de *Dirofilaria immitis* por provincias en España (Montoya-Alonso *et al.*, 2022).

La dirofilariosis cardiopulmonar canina es una enfermedad grave y potencialmente fatal. Se la debe considerar como una enfermedad crónica y de evolución progresiva, muy compleja, inicialmente vascular y pulmonar, y que en sus últimas fases afecta a la cavidad derecha del corazón (Simón *et al.*, 2012). La presencia de los vermes adultos produce cambios anatómicos e histológicos en las paredes arteriales causando endarteritis proliferativa (Figura 6), caracterizada por una pérdida de elasticidad, disminución del lumen arterial y aumento de la permeabilidad de la pared vascular. Estos cambios tienen como consecuencia la hipoxia,

hipertensión pulmonar y la salida de líquido de los vasos al parénquima pulmonar perivascular, causando edema pulmonar. El estado de hipertensión pulmonar conduce inicialmente a una dilatación del ventrículo derecho, acompañada de hipertrofia compensatoria. La persistencia de la hipertensión pulmonar, agravada en ocasiones por el aumento del ritmo cardíaco como consecuencia de la actividad física y de fenómenos tromboembólicos, determina una dilatación irreversible de toda la parte derecha del corazón que causa insuficiencia cardíaca congestiva (Figura 6).

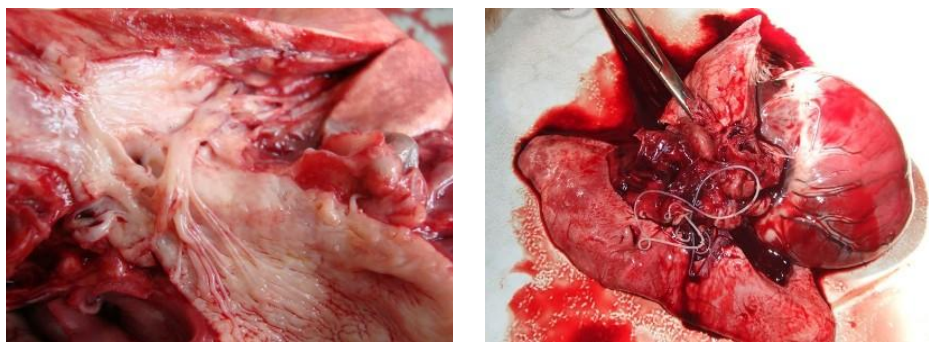


FIGURA 6. Endoarteritis pulmonar proliferativa (imagen izquierda) y corazón con vermes adultos de un perro infectado por *D. immitis* (imagen derecha).

Paralelamente al desarrollo crónico, pueden producirse procesos agudos que suponen un riesgo inmediato para la vida de los animales que los padecen. Aparecen cuando se produce la muerte súbita y simultánea de los vermes adultos, de manera natural o como consecuencia de un tratamiento filaricida. La liberación masiva de productos antigénicos del parásito y de la bacteria endosimbionte del género *Wolbachia* al torrente circulatorio es responsable de la exacerbación de las reacciones inflamatorias en el endotelio vascular y de la formación de tromboembolismos importantes acelerando la insuficiencia cardíaca o causando la muerte del animal (Simón *et al.*, 2012; Ames y Atkins, 2020). A todo esto, hay que añadirle la presencia de microfilarias en el torrente sanguíneo, que pueden vivir hasta 2 años (Simón *et al.*, 2012), y que las podemos llegar a encontrar en los glomérulos, causando disfunción renal (Morchón *et al.*, 2012).

1.4. Mecanismos de supervivencia y su relación con el proceso angiogénico

Dirofilaria immitis participa en varios procesos que contribuyen a su supervivencia dentro del hospedador, limitando el daño a corto

plazo, aunque el daño vascular a largo plazo es inevitable (Dillon *et al.*, 2008). Se ha demostrado que los antígenos excretores/secretores promueven la vasodilatación (Morchón *et al.*, 2010) y a corto plazo regulan el sistema de fibrinolisis del hospedador impidiendo o promoviendo la lisis de los coágulos de fibrina (González-Miguel *et al.*, 2012; Diosdado *et al.*, 2020) (Figura 7). Este efecto también lo producen los antígenos asociados a la superficie de la cutícula de los vermes adultos (González-Miguel *et al.*, 2013). A largo plazo, la producción de plasmina incrementa *in vitro* la proliferación endotelial y muscular, así como la migración y destrucción de la matriz extracitoplasmática, todo ello relacionado con la remodelación vascular (González-Miguel *et al.*, 2015).

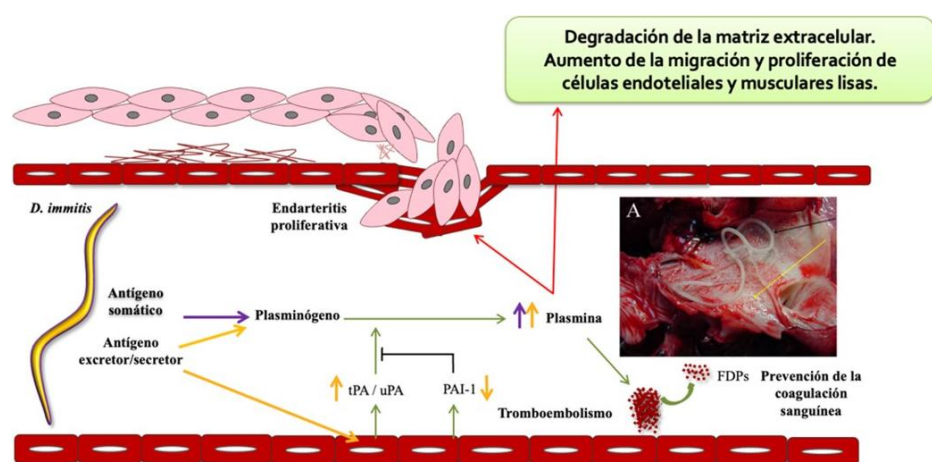


FIGURA 7. Activación del sistema fibrinolítico por parte de antígenos de *Dirofilaria immitis*. Imagen adaptada de González-Miguel *et al.*, 2016).

Proteínas específicas del antígeno excretor/secretor como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fructosa bis-fosfato aldolasa, actina y galectina, que tienen que ver con procesos como el estrés oxidativo, glucólisis y generación de energía, entre otros, están relacionadas con la activación del sistema fibrinolítico (González-Miguel *et al.*, 2016). Por otro lado, cuando los vermes adultos mueren, de forma natural o inducida por tratamiento adulticida, los antígenos de *Wolbachia* sp. promueven una respuesta endotelial vasoconstrictora y quimiotáctica. Esto parece estar relacionado con la cantidad de antígenos de *Wolbachia* sp. liberados al torrente sanguíneo (Morchón *et al.*, 2008, 2010).

Otro de los mecanismos en los que recientemente se ha relacionado a *D. immitis* es el proceso angiogénico, en donde se ha demostrado

que el antígeno excretor/secretor activa la síntesis de factores pro-angiogénicos (VEGFR-2 y mEndogлина), así como la proliferación y migración celular y la formación de pseudocapilares, favoreciendo la supervivencia del parásito en el endotelio vascular. Por otro lado, el extracto somático de *D. immitis* produce un efecto anti-angiogénico y, *Wolbachia* sp. además, no promueve la formación de pseudocapilares (Zueva *et al.*, 2019, 2020; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2023; Machado *et al.*, 2023).

Teniendo en cuenta que *D. immitis* está implicada en la modulación de los mecanismos inflamatorios que permiten al parásito sobrevivir en el hospedador durante años, el objetivo de este estudio fue analizar la influencia de proteínas específicas del antígeno excretor/secretor de vermes adultos de *D. immitis* en la producción de algunos factores implicados en el proceso angiogénico, en la proliferación y migración celular y en la formación de pseudocapilares, utilizando un modelo in vitro de células endoteliales vasculares, y así individualizar su responsabilidad en estos procesos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Proteínas de interés para el estudio

Se emplearon tres moléculas del antígeno excretor/secretor de vermes adultos de *D. immitis* en su forma recombinante: actina (rDiAct), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (rDiGAPDH) y galectina (rDiGal). Además, se empleó antígeno excretor/secretor de vermes adultos de *D. immitis* (DiES) y VEGF-A, precursor de la vía angiogénica, como estímulo positivo (Machado *et al.*, 2023). rDiAct, rDiGAPDH y rDiGal se obtuvieron desarrollando la metodología previamente descrita por González Miguel *et al.* (2015, 2016). Se extrajo ARN de vermes adultos de *D. immitis* utilizando el kit NucleoSpin RNA II (Macherey- Nagel), a partir del cual se sintetizó cDNA de primera hebra utilizando el kit cDNA de primera hebra (Roche). Las secuencias de cDNA de Act, GAPDH y Gal de *D. immitis* se amplificaron por PCR (1 ciclo a 94° C durante 5 minutos, 35 ciclos a 94° C durante 1 minuto, 46° C durante 46 segundos y 72° C durante 1 minuto 30 segundos, y 1 ciclo a 72° C durante 5 minutos, utilizando los siguientes primers:

- ACTFwd (5'-ATGTGTGACGACGACGTTGCGG)
- ACTRev (5'-CTAGAAACATTTGCGATGAACAATTG)
- GAPDHFwd (5'-ATGAGCAAACCAAAGATTGGAATC)

- GAPDHRev (5'-TTATCTGCTGGCGATGTAAGAG)
- GALFwd (5'-ATGCACCACAACGAATATGAAACGAATTAC)
- GALRev (5'-CTAGTGCATTTGAATACCGCTCACTTC)

Finalmente, los productos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa y las bandas se purificaron utilizando el kit StrataPrep DNA Gel Extraction (Stratagene). Los productos de la PCR de Act, GAPDH y Gal se clonaron en el vector pSC-A utilizando el kit StrataClone PCR Cloning (Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante. Ambos clones se purificaron con el kit Machery- Nagel NucleoSpin Plasmid.

Las secuencias completas de codificación para Act, GAPDH y Gal se clonaron en tres vectores TOPO (Gateway System, Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos recombinantes se transformaron en *Escherichia coli* XL1B. Estas células transformadas se cultivaron en placas de LB-agar con ampicilina (100 µg/ml) durante toda la noche a 37°C. Se cultivaron tres colonias en medio LB líquido con ampicilina durante una noche a 37°C en agitación, y se recolectaron las células. Los plásmidos, una vez extraídos, se digirieron con la enzima EcoRI para comprobar la presencia del inserto. Los vectores que contenían los insertos de interés se secuenciaron con el cebador T7, en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, para comprobar si el marco de lectura era correcto. Los vectores que contenían la molécula de interés en el marco de lectura correcto se utilizaron para transformar células de expresión BL-21. Éstas se cultivaron en medio LB líquido más ampicilina (100 µg/ml) durante toda la noche a 37°C en agitación. Los cultivos se diluyeron 1:20 en medio fresco y se siguieron cultivando hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,5 a 600 nm. A continuación, se indujo la expresión de la proteína recombinante añadiendo L-arabina a una concentración final del 0,2% y creciendo a 37°C durante 4 horas en agitación. Las células inducidas se recolectaron y sonicaron en un tampón que contenía 50 mM Na₂PO₄, 300 mM NaCl y 10 mM imidazol, pH8. A continuación, se centrifugó durante 20 minutos a 10.000 xg y el sobrenadante se introdujo en una columna de afinidad HIS-Select®Nickel (Sigma) para la purificación por afinidad de rDiGADPH, rDiAct y rDiGal marcadas con histidina en tres columnas diferentes, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Finalmente, la proteína recombinante se eluyó con tampón de elución (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl y 250 mM imidazol, pH 7,9) para después ser dializada en PBS durante 24 horas a 4°C. La pureza y el rendimiento de la proteína obtenida tras la purificación se evaluó en geles de poliacrilamida al 12%

mediante tinción con Coomassie blue. La densitometría se calculó con el programa PDQUEST (Bio-Rad).

DiES se preparó según la metodología descrita previamente por González-Miguel *et al.* (2012) con algunas modificaciones. Se emplearon 23 vermes adultos vivos de *D. immitis* (8 machos y 15 hembras) extraídos de un perro infectado con la técnica de Flexible Alligator Forceps. Estos vermes se lavaron en PBS estéril pH 7,2 y se incubaron durante 24 horas en 50 ml de medio esencial mínimo de Eagle (MMEE) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) suplementado con 0,04% de gentamicina y 0,01% de nistatina, a 37°C. Posteriormente, el medio resultante se dializó en PBS al 0,01% pH 7,2 y se filtró a través de un Amicon YC05 (Amicon Corporation Scientific System Division, Danvers).

La concentración de proteínas de DiES y las de rDiGADPH, rDiAct y rDiGal se midieron mediante el kit comercial de ensayo de proteína compatible con detergente (DC) (Bio-Rad) y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. La concentración proteica final obtenida fue de 0,53 µg/µl para DiES y 1 µg/µl para rDiGADPH, rDiAct y rDiGal.

2.2. Cultivos celulares y estimulación de los cultivos celulares

Las células endoteliales de vena umbilical (HUVEC) se cultivaron en un medio de cultivo Basal Endotelial 2 (Lonza, Walkersville, EEUU) suplementado con SingleQuots® (Lonza, Walkersville, EEUU): suero bovino fetal al 20%, heparina (22,5 µg /ml), VEGF-A (0,5 ng/ml), ácido ascórbico (1 µg /ml), hFGF-B (10 ng/ml), hidrocortisona (0,2 µg /ml), hEGF (5 ng/ml), gentamicina (30 mg/ml), anfotericina B (15 µg/ml) y R3-IGF-3 (20 ng/ml). Las placas se recubrieron previamente con gelatina de cerdo al 0,1% (Sigma Chemical Co., San Luis, EEUU), fibronectina al 0,01% (SigmaAldrich, Misuri, EEUU) y colágeno al 0,01% (Corning) (Morchón *et al.*, 2008). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada en presencia de un 5% de CO₂/95% de aire. El medio se cambió cada 3 días. La expansión se llevó a cabo tripsinizando las células (Trypsina/EDTA, Lonza, EEUU) y pasándolas cuando las células proliferantes habían alcanzado una densidad suficiente. Los pases se realizaron en una proporción de 1:3. El recuento de células se realizó con un Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen, California, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las células endoteliales fueron tratadas siguiendo la metodología descrita por Machado *et al.* (2023). Las células endoteliales (106

células/placa) se sembraron en placas de cultivo de 60 mm y se cultivaron durante 4 días para obtener cultivos confluentes. Después, estos cultivos se trataron con **VEGF-A** (1 µg/ml) (R&D SYSTEMS), **rDiAct** (1 µg/ml), **rDiAct+VEGF-A** (1 µg/ml cada una), **rDiGAPDH** (1 µg/ml), **rDiGAPDH+VEGF-A** (1 µg/ml cada una), **rDiGal** (1 µg/ml) y **rDiGal+VEGF-A** (1 µg/ml cada una) durante 24 horas con 3 ml de medio de cultivo. Como controles se utilizaron células no estimuladas en las mismas condiciones (**Control**). Como control positivo se empleó el tratamiento de cultivos endoteliales con **DiES+VEGF-A** (1 µg/ml cada una) (Machado *et al.*, 2023). Transcurridas las 24 horas, se recogieron el sobrenadante y el lisado celular, que se almacenaron a -80°C hasta llevar a cabo los análisis pertinentes. Todos los tratamientos se llevaron a cabo por triplicado.

El lisado celular, una vez retirado el medio y lavada la monocapa celular con PBS 1X, se obtuvo añadiendo 1 ml de tampón de lisis [20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 140 mM NaCl; 10 mM de ácido etilendiaminotetraacético; 10 % de glicerol; 1 % de Igepal CA-630; aprotinina, pepstatina y leupeptina (1 µg/ml cada una); 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 1 mM de ortovanadato sódico] para después levantar los cultivos con un rascador. Todo ello se recolectó en un eppendorf que fue centrifugado durante 10 minutos a 20.000 xg a 4°C.

2.3. Ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad

La viabilidad celular se analizó mediante recuentos celulares utilizando el equipo Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La citotoxicidad se evaluó en el sobrenadante de los cultivos celulares estimulados y de control mediante el Toxilight BioAssay Kit (Cambrex, Verviers, Bélgica) siguiendo las instrucciones comerciales. Este kit comercial mide cuantitativamente la liberación de adenilato quinasa de las células dañadas. Los resultados se presentaron como la media ± desviación estándar (DE) de tres experimentos realizados por duplicado.

2.4. Ensayos de factores angiogénicos

La concentración de VEGF-A, VEGFR-1 soluble (VEGFR-1/sFlt), VEGFR-2 soluble (sVEGFR-2) y sEndogлина se midió en los sobrenadantes de los cultivos celulares tratados y no tratados (control) durante 24 horas utilizando kits ELISA Quantikine comerciales (R&D Systems, Minneapolis, EEUU) La concentración de mEndogлина se analizó en los lisados celulares mediante el kit ELISA de Endogлина (R&D

Systems, Minneapolis, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se presentaron como la media $\pm$ DE de tres experimentos realizados por triplicado.

2.5. Ensayos de proliferación celular

La proliferación celular se analizó contabilizando el número de células viables a lo largo de 10 días según Zueva *et al.* (2020), con algunas modificaciones. Se sembraron 103 células por pocillo en una placa de 96 pocillos con los estímulos anteriormente citados durante 10 días: VEGF-A (1 μ g/ml), rDiAct (1 μ g/ml), rDiAct+VEGF-A (1 μ g/ml cada una), rDiGAPDH (1 μ g/ml), rDiGAPDH+VEGF-A (1 μ g/ml cada una), rDiGal (1 μ g/ml) y rDiGal+VEGF-A (1 μ g/ml cada una). Como controles se utilizaron células no estimuladas (Control) y células estimuladas con DiES+VEGF-A (1 μ g/ml cada una) (control positivo), en las mismas condiciones. Se estimó el número de células viables cada 2 días hasta un máximo de 10 días de cultivo incubando los cultivos celulares con 0,5 mg/ml de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (SigmaAldrich, St. Louis, MO, EEUU) durante 4 h. A continuación, se añadió SDS al 10 % en HCl 0,01M en proporción 1:1 (v/v) y se dejó toda la noche a 37 °C. Por último, se midió la absorbancia a 570 nm. Los resultados se presentan como la media $\pm$ DE de tres experimentos realizados por triplicado.

2.6. Ensayos de migración celular

Los ensayos de migración celular se llevaron a cabo mediante la técnica de cicatrización de heridas en cultivos celulares en monocapa (*Wound Healing*) según lo descrito previamente por Pérez-Rodríguez *et al.* (2023) con algunas modificaciones. Se realizaron heridas in vitro raspando monocapas celulares confluentes en placas estériles de 60 mm con una punta de pipeta estéril desechable. Los cultivos se lavaron con tampón PBS estéril y se incubaron con medio de cultivo con los diferentes estímulos hasta 6 horas: VEGF-A (1 μ g/ml), rDiAct (1 μ g/ml), rDiAct+VEGF-A (1 μ g/ml cada una), rDiGAPDH (1 μ g/ml), rDiGAPDH+VEGF-A (1 μ g/ml cada una), rDiGal (1 μ g/ml) y rDiGal+VEGF-A (1 μ g/ml cada una). Como controles se utilizaron células no estimuladas (Control) y células estimuladas con DiES+VEGF-A (1 μ g/ml cada una) (control positivo) en las mismas condiciones. La migración de las células endoteliales a la zona denudada se monitorizó fotografiando las placas cada 30 minutos. Los resultados se presentaron como la media $\pm$ DE de tres experimentos realizados por triplicado.

2.7. Ensayo de formación de tubos de células endoteliales

La formación de pseudocapilares de células endoteliales se evaluó según lo descrito previamente por Jerkic *et al.* (2006), con modificaciones. Se sembraron un total de 8000 células endoteliales por pocillo en placas μ -Slide Angiogenesis® recubiertas previamente con Matrigel® (Ibidi, Gräfelfing, Alemania) en medio de cultivo con los diferentes estímulos: VEGF-A (1 μ g/ml), rDiAct (1 μ g/ml), rDiAct+VEGF-A (1 μ g/ml cada una), rDiGAPDH (1 μ g/ml), rDiGAPDH+VEGF-A (1 μ g/ml cada una), rDiGal (1 μ g/ml) y rDiGal+VEGF-A (1 μ g/ml cada una). Como controles se utilizaron células no estimuladas (Control) y células estimuladas con DiES+VEGF-A (1 μ g/ml cada una) (control positivo) en las mismas condiciones. Tras la siembra en Matrigel®, las células se extendieron y alinearon entre sí para desarrollar estructuras huecas en forma de tubo. Las células y las uniones intercelulares se observaron cada 30 minutos durante 3 horas de incubación y los cambios morfológicos se fotografiaron con un microscopio invertido Leica (Leica, Wetzlar, Alemania) de contraste de fases. Posteriormente, se dividieron las uniones intercelulares entre los cuerpos celulares para calcular la relación entre ellos (formación de tubos de células endoteliales = uniones celulares/cuerpos celulares). Los resultados se presentaron como la media $\pm$ DE de tres experimentos realizados por triplicado.

2.8. Análisis estadístico

Se utilizó GraphPad Prism v.7 para todos los análisis de datos. Los análisis se realizaron mediante ANOVA y se corrigieron para medidas repetidas cuando fue apropiado. Si el ANOVA revelaba diferencias significativas globales, las medias individuales se evaluaron post hoc mediante la prueba de Tukey. Todos los resultados se expresaron como media $\pm$ DE de tres experimentos realizados por triplicado. En todos los experimentos, una diferencia significativa se definió como un valor $p < 0,05$ y $p < 0,01$, $df=4$, para un nivel de confianza del 95 y 99% respectivamente.

3. RESULTADOS

3.1. Efecto del antígeno excretor/secretor de *Dirofilaria immitis* (DiES) y de las moléculas recombinantes rDiAct, rDiGAPDH, rDiGal sobre la viabilidad celular y la citotoxicidad

Los tratamientos con VEGF-A, DiES+VEGF-A, rDiAct, rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH, rDiGAPDH+VEGF-A, rDiGal, y

rDiGal+VEGF-A no mostraron efecto citotóxico alguno sobre las células endoteliales ni sobre la viabilidad celular en comparación con los cultivos celulares no estimulados (Control), reportándose, al menos, el 80% de células vivas en todos ellos, no encontrándose diferencias significativas entre los cultivos analizados (Figura 8).

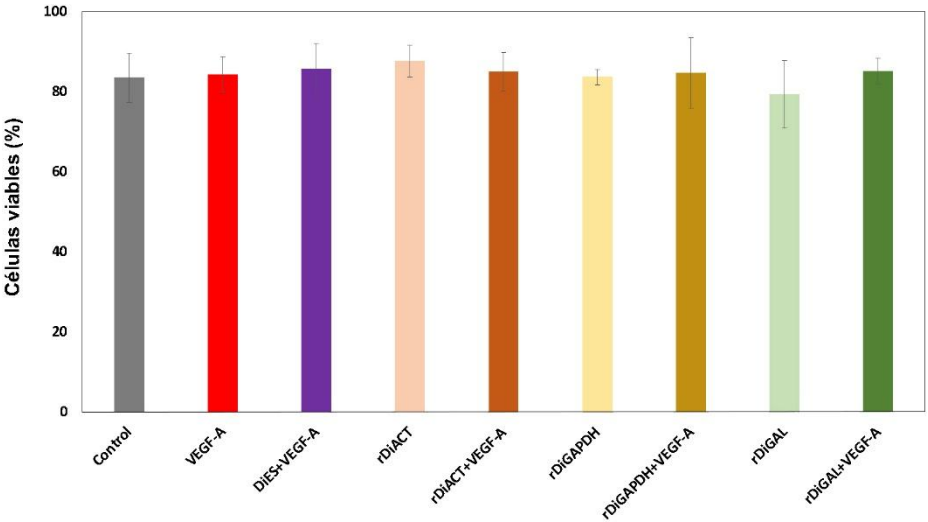


FIGURA 8. Efectos de los diferentes tratamientos sobre la viabilidad celular [porcentaje (%) de células vivas] en cultivos no estimulados Control (●) y cultivos estimulados con VEGF-A (●), DiES+VEGF-A (●), DiAct (●), DiAct+VEGF-A (●), rDiGAPDH (●), rDiGAPDH+VEGF-A (●), rDiGal (●), rDiGal+VEGF-A (●) durante 24 horas. Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes.

3.2. Efecto de las moléculas recombinantes rDiAct, rDiGAPDH, rDiGal del antígeno excretor/secretor de *Dirofilaria immitis* sobre los factores angiogénicos

3.2.1. VEGF-A

La estimulación de cultivos celulares con rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH+VEGF-A y rDiGal+VEGF-A aumentó significativamente la producción de VEGF-A en los medios de cultivo en comparación con cultivos celulares estimulados con rDiAct, rDiGAPDH, rDiGal, VEGF-A y con los cultivos no estimulados ($p<0,01$) durante las primeras 24 horas (Figura 9).

La estimulación de los cultivos celulares con DiES+VEGF-A (control positivo) también produjo un aumento significativo en la

producción de VEGF-A en comparación con los cultivos estimulados con las proteínas rDiAct, rDiGAPDH, rDiGal ($p<0,01$), VEGF-A ($p<0,01$) y los cultivos no estimulados (Control) ($p<0,01$) durante las primeras 24 horas, como cabía esperar. Además, los cultivos celulares estimulados con VEGF-A también mostraron un aumento significativo en la producción de VEGF-A en comparación con todos los cultivos estimulados y no estimulados ($p<0,01$) aunque mucho menor que en el caso anterior. No se detectaron diferencias significativas entre los cultivos celulares estimulados con rDiAct, rDiGAPDH y rDiGal y con los cultivos no estimulados (Control) durante las primeras 24 horas, obteniéndose valores similares.

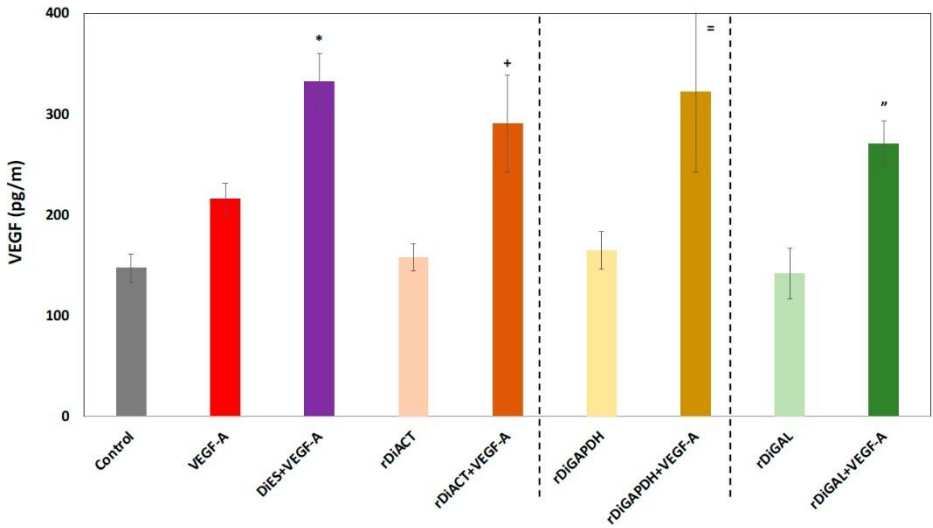


FIGURA 9. Efectos de los diferentes tratamientos sobre la producción de VEGF-A en cultivos no estimulados Control (●) y estimulados con VEGF-A (●), DiES+VEGF-A (●), DiAct (●), DiAct+VEGF-A (●), rDiGAPDH (●), rDiGAPDH+VEGF-A (●), rDiGal (●), rDiGal+VEGF-A (●) durante 24 horas. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes. Los símbolos (*,+,=,") indican respectivamente diferencias significativas con un $p<0,05$ entre DiES+VEFG-A vs Control, VEGF-A, DiAct, rDiGAPDH y rDiGal (*); rDiAct+VEFG-A vs Control, VEGF-A y DiAct (+); rDiGAPDH+VEFG-A vs Control, VEGF-A y rDiGAPDH (=); rDiGal+VEFG-A vs Control, VEGF-A y rDiGal (").

3.2.2. VEGFR-1/sFlt (anti-angiogénico) y sVEGFR-2 (pro-angiogénico)

Por un lado, con respecto al contenido de VEGFR-1/sFlt detectado, no se observaron diferencias significativas entre los cultivos celulares

estimulados con los diferentes tratamientos y los no estimulados durante las primeras 24 horas (Figura 10A). Por otro lado, la estimulación de los cultivos celulares con rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH+VEGF-A y rDiGal+VEGF-A aumentó significativamente la producción de s-VEGFR-2 en comparación con cultivos celulares estimulados con rDiAct, rDiGAPDH y rDiGal, con los cultivos estimulados con VEGF-A y con los cultivos no estimulados (Control) ($p<0,01$) durante las primeras 24 horas (Figura 10B).

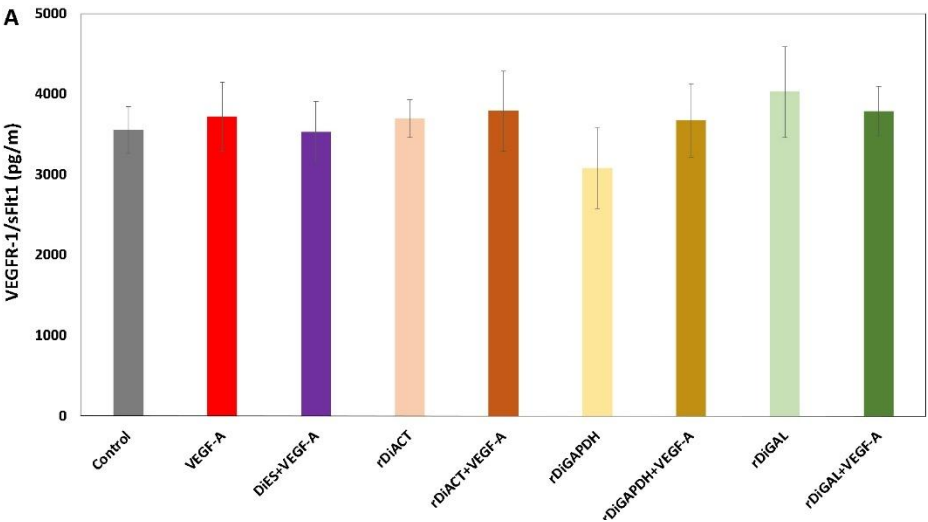


FIGURA 10A. Efectos de los diferentes tratamientos sobre la producción de VEGFR-1/sFlt en cultivos no estimulados Control (●) y cultivos estimulados con VEGF-A (●), DiES+VEGF-A (●), DiAct (●), DiAct+VEGF-A (●), rDiGAPDH (●), rDiGAPDH+VEGF-A (●), rDiGal (●), rDiGal+VEGF-A (●) durante 24 horas. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes.

En los cultivos celulares estimulados con DiES+VEGF-A (control positivo) también aumentó significativamente la producción de sVEGFR-2 en comparación con los cultivos no estimulados (Control), y los estimulados con VEGF-A y las proteínas rDiAct, rDiGAPDH, rDiGal ($p<0,01$) (Figura 10B). No se detectaron diferencias significativas entre los cultivos celulares estimulados con VEGF-A, las proteínas rDiAct, rDiGAPDH y rDiGal y las células no tratadas (Control), obteniéndose valores similares.

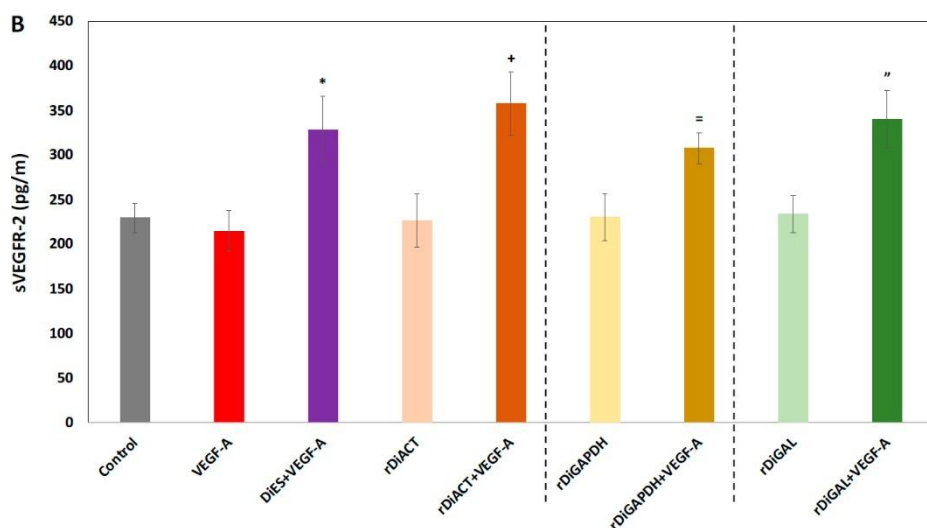


FIGURA 10B. Efectos de los diferentes tratamientos sobre la producción de sVEGFR-2 en cultivos no estimulados Control (●) y cultivos estimulados con VEGF-A (●), DiES+VEGF-A (●), DiAct (●), DiAct+VEGF-A (●), rDiGAPDH (●), rDiGAPDH+VEGF-A (●), rDiGal (●), rDiGal+VEGF-A (●) durante 24 horas. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes. Los símbolos (*,+,=,") indican respectivamente diferencias significativas con un $p < 0,01$ entre DiES+VEGF-A vs Control, VEGF-A, DiAct, rDiGAPDH y rDiGal (*); rDiAct+VEGF-A vs Control, VEGF-A y DiAct (+); rDiGAPDH+VEGF-A vs Control, VEGF-A y rDiGAPDH (=); rDiGal+VEGF-A vs Control, VEGF-A y rDiGal (").

3.2.3. *sEndoglina (anti-angiogénico) y mEndoglina (pro-angiogénico)*

En cuanto a la producción de sEndoglina, detectada en los sobrenadantes de los cultivos celulares, no se observaron diferencias significativas entre los cultivos estimulados y no estimulados durante las primeras 24 horas (Figura 11A). Sin embargo, si se observaron diferencias en relación a la producción de mEndoglina. De hecho, en los cultivos celulares tratados con rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH+VEGF-A y rDiGal+VEGF-A se observó un aumento significativo la producción en comparación con cultivos celulares estimulados con rDiAct, rDiGAPDH y rDiGal, con los cultivos estimulados con VEGF-A y con los cultivos no estimulados (Control) ($p < 0,01$) durante las primeras 24 horas (Figura 11B).

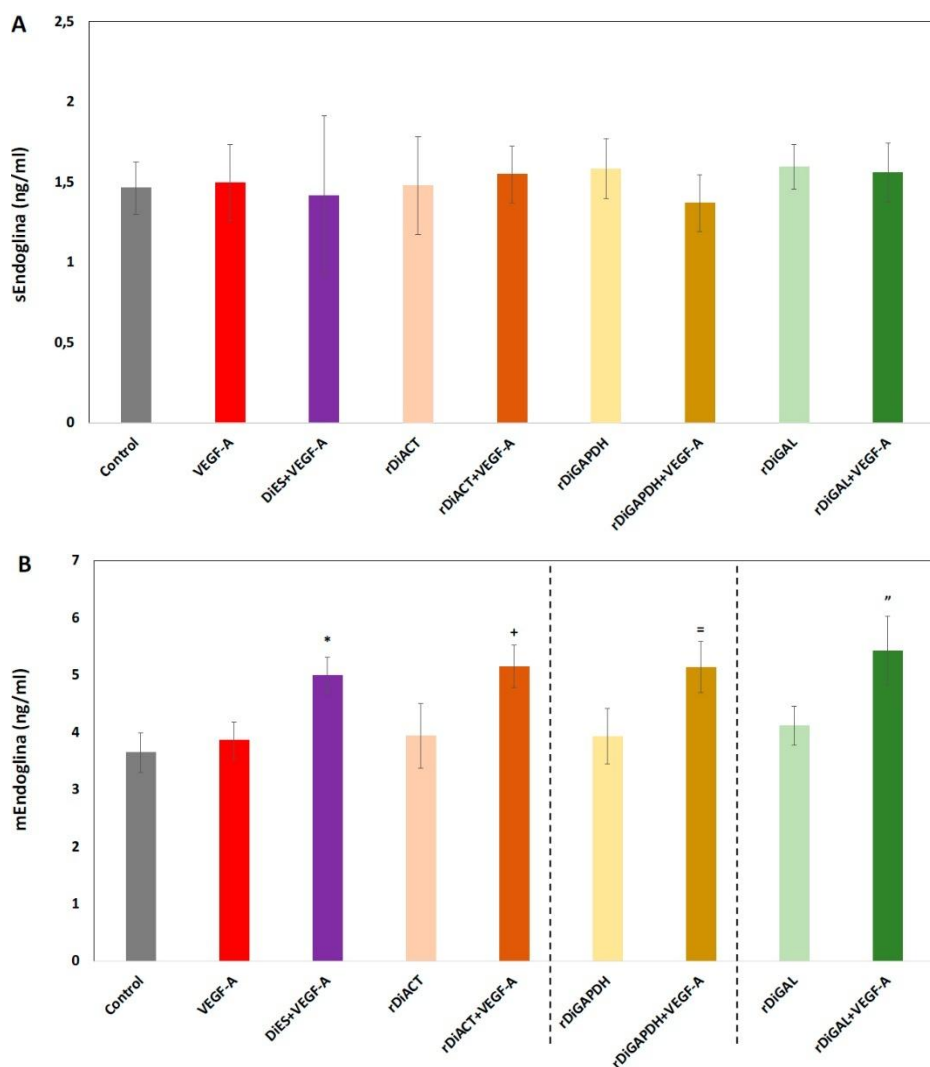


FIGURA 11. Efectos de los diferentes tratamientos sobre la producción de sEndoglin (**A**) y mEndoglin (**B**) en cultivos no estimulados Control (●) y cultivos estimulados con VEGF-A (●), DiES+VEGF-A (●), DiAct (●), DiAct+VEGF-A (●), rDiGAPDH (●), rDiGAPDH+VEGF-A (●), rDiGal (●), rDiGal+VEGF-A (●) durante 24 horas. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes. Los símbolos (*, +, =, ") indican respectivamente diferencias significativas con un $p < 0,05$ entre DiES+VEGF-A vs Control, VEGF-A, DiAct, rDiGAPDH y rDiGal (*); rDiAct+VEGF-A vs Control, VEGF-A y DiAct (+); entre rDiGAPDH+VEGF-A vs Control, VEGF-A y rDiGAPDH (=); y entre rDiGal+VEGF-A vs Control, VEGF-A y rDiGal (").

Los cultivos celulares tratados con DiES+VEGF-A (control positivo) aumentaron significativamente la producción de mEndoglin en

comparación con los cultivos no estimulados (Control) y los estimulados con VEGF-A y las proteínas rDiAct, rDiGAPDH y rDiGal ($p<0,05$) durante las primeras 24 horas. No se detectaron diferencias significativas entre los cultivos celulares estimulados con VEGF-A, las proteínas rDiAct, rDiGAPDH y rDiGal y las células no tratadas durante las primeras 24 horas, obteniéndose también valores similares.

3.2.4. Efecto de las moléculas recombinantes rDiAct, rDiGAPDH, rDiGal del antígeno excretor/secretor de *Dirofilaria immitis* sobre la proliferación celular

Se analizó el efecto de rDiAct, rDiGAPDH, rDiGal y VEGF-A sobre la proliferación celular analizando el número de células endoteliales viables (proliferación celular) mediante la técnica MTT en un periodo de 10 días cada 2 días (Figura 12). Todos los cultivos celulares estimulados y no estimulados mostraron curvas típicas de crecimiento celular en todos los grupos experimentales con un crecimiento progresivo entre los días 0 y 6 u 8 post- estimulación, experimentando una disminución de células viables a partir de ahí hasta el día 10 post-estimulación. La técnica MTT mostró un aumento significativo del número de células viables a los 6 y 8 días de la estimulación entre los cultivos estimulados con rDiAct+VEGF-A y DiES+VEGF-A (control positivo) en comparación con los cultivos estimulados con VEGF-A, rDiAct y los cultivos no tratados (Control) ($p<0,05$) (Figura 12A). Un hecho similar fue observado en los tratamientos con rDiGAPDH+VEGF-A (Figura 12B).

En relación a los cultivos estimulados con rDiGal+VEGF-A y DiES+VEGF-A (control positivo) se observaron diferencias significativas en comparación con los cultivos estimulados con VEGF-A, rDiGal y los no tratados (Control) a los días 6 y 8 de la estimulación inicial ($p<0,05$) (Figura 12C).

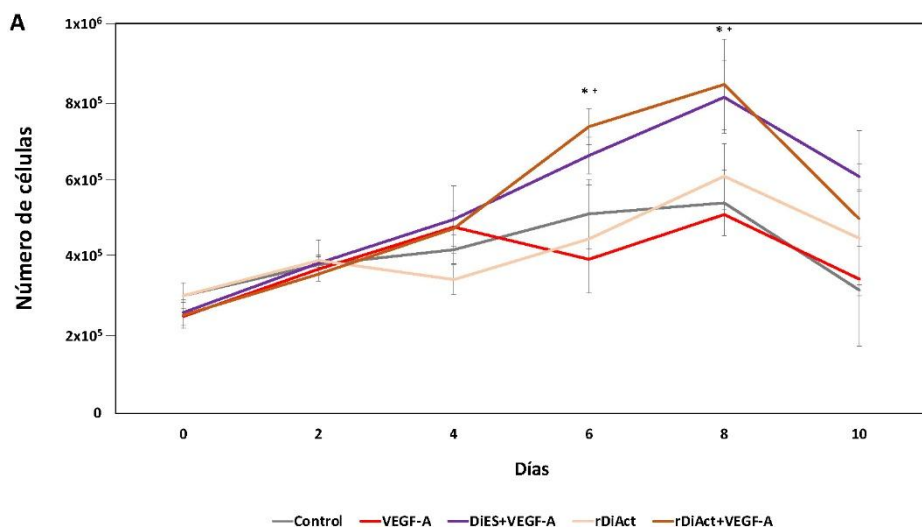


FIGURA 12A. Efectos de los diferentes tratamientos sobre la proliferación celular en cultivos no estimulados Control (●) y cultivos estimulados con VEGF-A (●), DiES+VEGF-A (●), DiAct (●), DiAct+VEGF-A (●) cada 2 días durante 10 días. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes. Los símbolos (*,+) indican respectivamente diferencias significativas con un $p < 0,05$ entre DiES+VEGF-A vs Control, VEGF-A, DiAct, (*); rDiAct+VEGF-A vs Control, VEGF-A y DiAct (+).

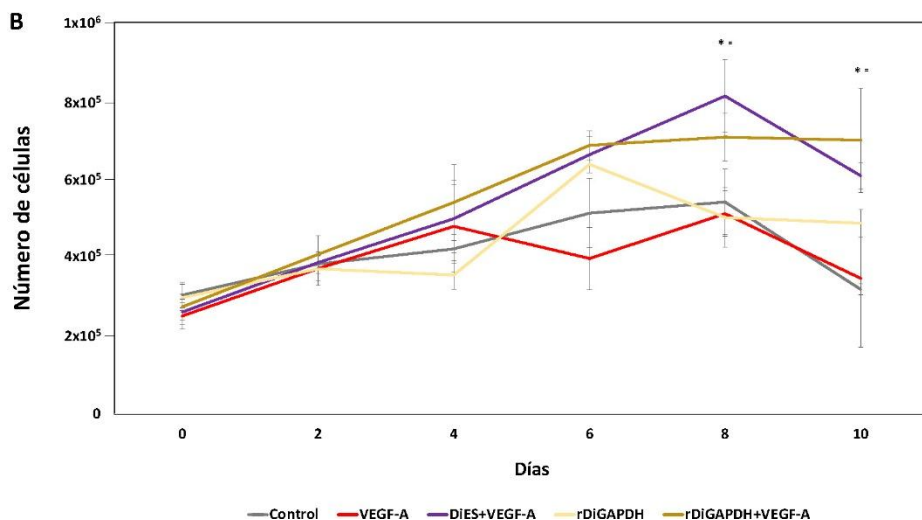


FIGURA 12B. Efectos de los diferentes tratamientos sobre la proliferación celular en cultivos no estimulados Control (●) y cultivos estimulados con VEGF-A (●), DiES+VEGF-A (●), rDiGAPDH (●), rDiGAPDH+VEGF-A (●) cada 2 días durante 10 días. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes. Los símbolos (*,=) indican respectivamente diferencias significativas con un $p < 0,05$ entre DiES+VEGF-A vs Control, VEGF-A, rDiGAPDH (*); rDiGAPDH+VEGF-A vs Control, VEGF-A y rDiGAPDH (=).

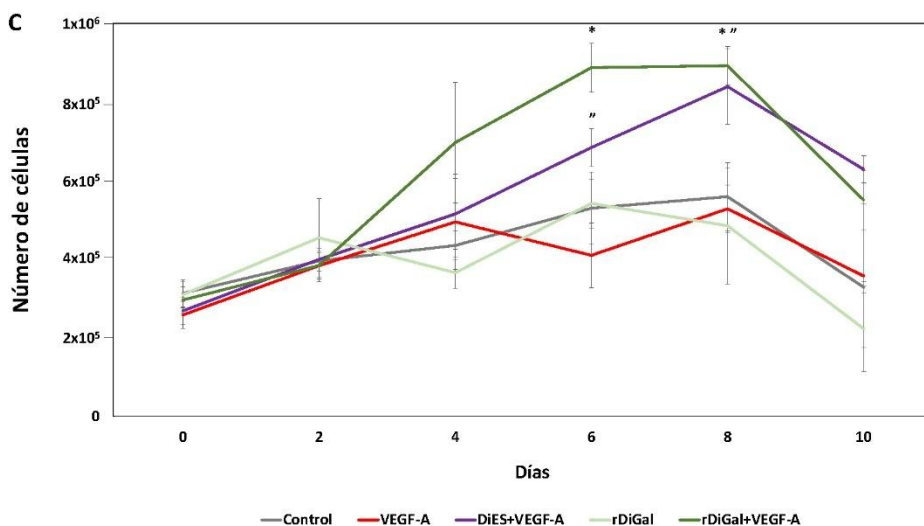


FIGURA 12C. Efectos de los diferentes tratamientos sobre la proliferación celular en cultivos no estimulados Control (●) y cultivos estimulados con VEGF-A (●), DiES+VEGF-A (●), rDiGal (●), rDiGal+VEGF-A (●) cada 2 días durante 10 días. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes. Los símbolos (*,") indican respectivamente diferencias significativas con un $p < 0,05$ entre DiES+VEGF-A vs Control, VEGF-A, rDiGal (*); rDiGal+VEGF-A vs Control, VEGF-A y rDiGal (").

3.2.5. Efecto de las moléculas recombinantes rDiAct, rDiGAPDH, rDiGal del antígeno excretor/secretor de *Dirofilaria immitis* sobre la migración celular

Se realizó un ensayo de curación de heridas (*Wound healing*) para evaluar la migración celular (Figura 13). La cuantificación se llevó a cabo midiendo la distancia de migración celular en comparación con el control negativo (células no tratadas) hasta 3 horas después de la estimulación. Se detectó un descenso significativo de la distancia de migración celular tras la estimulación con rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH+VEGF-A y rDiGal+VEGF-A en comparación con los cultivos celulares estimulados con VEGF-A, las proteínas rDiAct, rDiGAPDH y rDiGal respectivamente, y los cultivos no estimulados (Control) ($p < 0,05$). Un hecho similar fue observado con el tratamiento con DiES+VEGF-A (control positivo) en comparación con los cultivos estimulados con VEGF-A, rDiAct, rDiGAPDH, rDiGal y los cultivos no tratados (Control) ($p < 0,05$) como cabía esperar. No se detectaron diferencias significativas entre los cultivos celulares estimulados con VEGF-A, las proteínas rDiAct, rDiGAPDH y rDiGal y las células no tratadas (Control) durante las 3 primeras horas, obteniéndose valores similares.

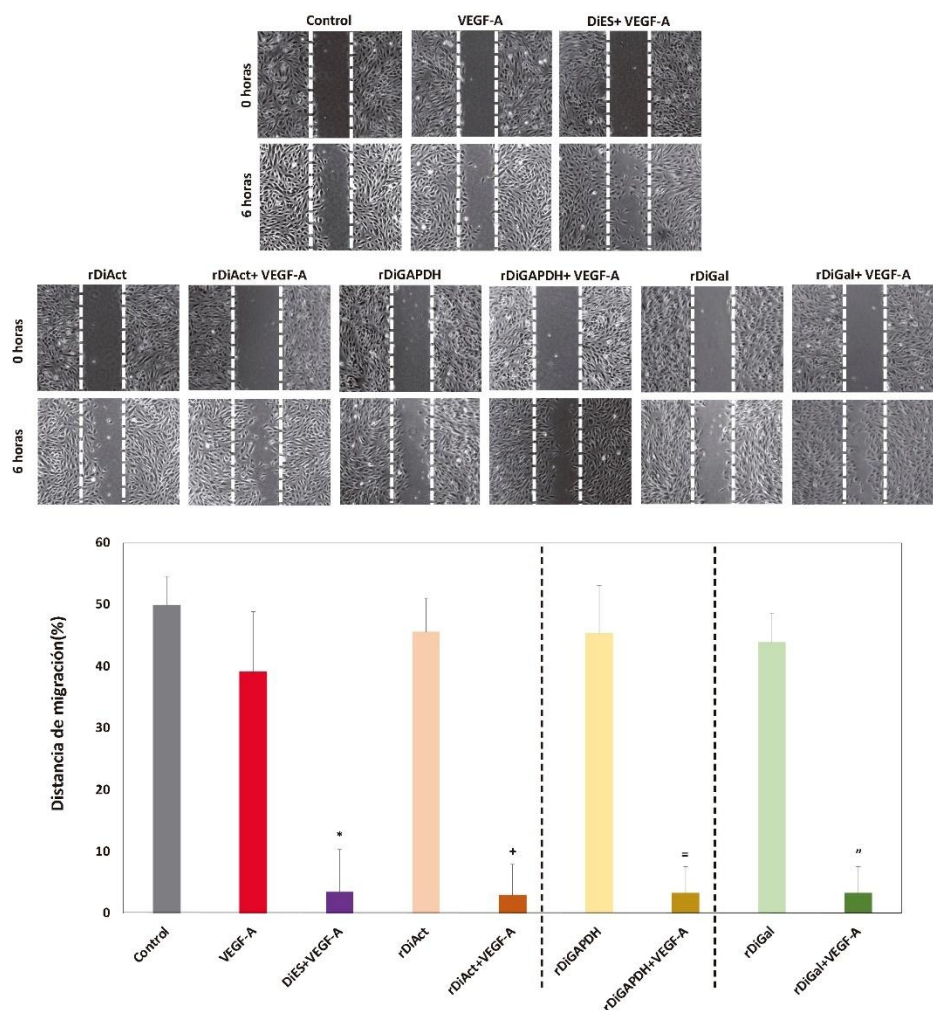
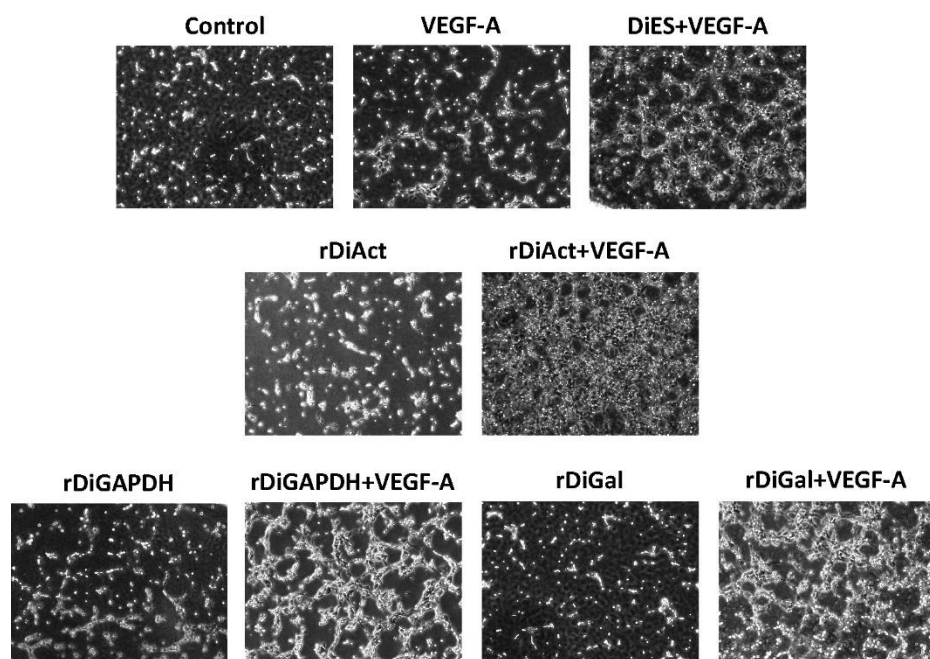


FIGURA 13. Imágenes representativas y efecto de los diferentes tratamientos sobre la migración celular en cultivos no estimulados Control (●) y cultivos estimulados con VEGF-A (●), DiES+VEGF-A (●), DiAct (●), DiAct+VEGF-A (●), rDiGAPDH (●), rDiGAPDH+VEGF-A (●), rDiGal (●), rDiGal+VEGF-A (●). La cuantificación se llevó a cabo midiendo la distancia de migración celular en comparación con el control (células no tratadas) hasta 6 horas después de la estimulación. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes. Los símbolos (*,+,=,") indican respectivamente diferencias significativas con un $p < 0,05$ entre DiES+VEGF-A vs Control, VEGF-A, DiAct, rDiGAPDH y rDiGal (*); rDiAct+VEGF-A vs Control, VEGF-A y DiAct (+); entre rDiGAPDH+VEGF-A vs Control, VEGF-A y rDiGAPDH (=); y entre rDiGal+VEGF-A vs Control, VEGF-A y rDiGal (").

3.2.6. Efecto de las moléculas recombinantes rDiAct, rDiGAPDH, rDiGal del antígeno excretor/secretor de *Dirofilaria immitis* en la formación de pseudocapilares

La capacidad de formación de pseudocapilares se evaluó analizando las uniones celulares (conexiones) y el conjunto celular (fuerzas convergentes de las diferentes ramificaciones celulares) que surgieron en cultivos celulares estimulados y no estimulados (Figura 14). El tratamiento con DiES+VEGF-A (control positivo) produjo un aumento significativo durante las 3 primeras horas en comparación con los cultivos celulares estimulados con VEGF-A y las proteínas rDiAct, rDiGAPDH, rDiGal ($p<0,01$) y los cultivos no estimulados (Control). Un hecho similar fue observado con los tratamientos rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH+VEGF-A y rDiGal+VEGF-A en comparación con los cultivos celulares estimulados con VEGF-A y las proteínas rDiAct, rDiGAPDH, rDiGal y los cultivos no estimulados (Control) respectivamente ($p<0,01$). No se detectaron diferencias significativas entre los cultivos celulares estimulados con VEGF-A, las proteínas rDiAct, rDiGAPDH y rDiGal y las células no tratadas (Control) durante las 3 primeras horas, obteniéndose valores similares.



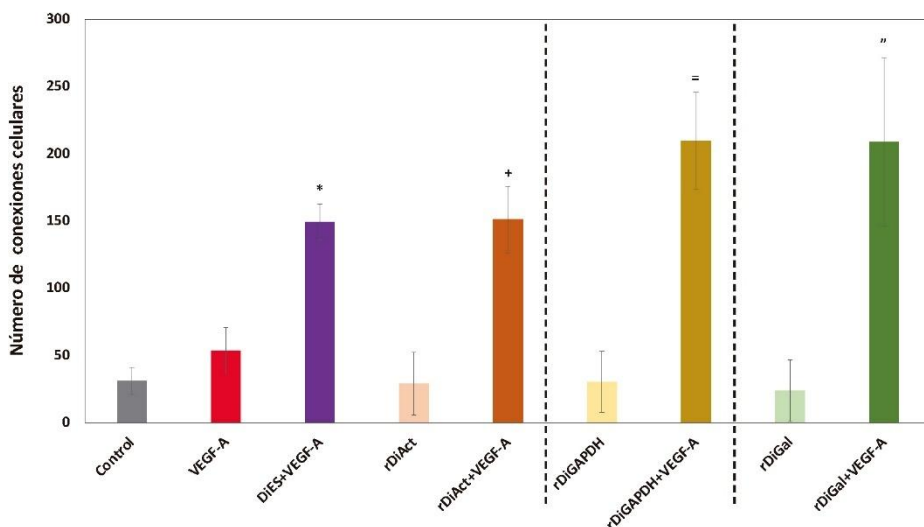


FIGURA 14. Imágenes representativas y efecto de los diferentes tratamientos sobre la formación de pseudocapilares (número de conexiones y set celulares) en cultivos no estimulados Control (●) y cultivos estimulados con VEGF-A (●), DiES+VEGF-A (●), DiAct (●), DiAct+VEGF-A (●), rDiGAPDH (●), rDiGAPDH+VEGF-A (●), rDiGal (●), rDiGal+VEGF-A (●) durante las primeras 3 horas e imágenes representativas. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (DE) de 3 experimentos independientes. Los símbolos (*,+,=,") indican respectivamente diferencias significativas con un $p < 0,01$ entre DiES+VEGF-A vs Control, VEGF-A, DiAct, rDiGAPDH y rDiGal (*); rDiAct+VEGF-A vs Control, VEGF-A y DiAct (+); entre rDiGAPDH+VEGF-A vs Control, VEGF-A y rDiGAPDH (=); y entre rDiGal+VEGF-A vs Control, VEGF-A y rDiGal (").

4. DISCUSIÓN

La angiogénesis es un proceso endotelial que se desencadena tras la estimulación por procesos obstructivos, hipoxia, inflamación o lesiones tisulares, dando lugar a un aumento del crecimiento endotelial vascular, la proliferación y la diferenciación celular (Hershey *et al.*, 2001; Eilken y Adams, 2010; Richarz *et al.*, 2017). En la dirofilariosis cardiopulmonar, la presencia de vermes adultos de *D. immitis* en la arteria pulmonar provoca cambios en el endotelio vascular que conducen a pérdida de elasticidad, endarteritis proliferativa, hipertensión, edema y tromboembolismo pulmonar, entre otras afecciones, lo que conduce a una inflamación de los vasos e hipoxia (McCall *et al.*, 2008; Venco *et al.*, 2011; Simón *et al.*, 2012; Morchón *et al.*, 2018).

Estudios previos han demostrado que tanto los antígenos somáticos de *D. immitis* como la proteína recombinante *Wolbachia Surface*

Major (rWSP) son capaces de promover procesos inflamatorios causando vasoconstricción y quimiotaxis de células inmunes en un modelo in vitro de células endoteliales (Morchón *et al.*, 2008, Simón *et al.*, 2008), así como una fuerte respuesta inflamatoria cuando los vermes adultos mueren y se liberan sus antígenos en perros infectados (tanto del parásito como de *Wolbachia*) (Morchón *et al.*, 2012). Sin embargo, el antígeno excretor/secretor (DiES) es capaz de estimular la vasodilatación al aumentar la producción de PGE2 y limitando la trans migración de monocitos a los tejidos vasculares, facilitando de esta manera también la supervivencia del parásito (Morchón *et al.*, 2010), y de activar el sistema fibrinolítico del hospedador y limitar la formación de coágulos (González-Miguel *et al.*, 2012), del mismo modo que el antígeno asociado a proteínas de superficie del parásito (DiCut) (González-Miguel *et al.*, 2013). Ni DiES ni DiCut contienen antígenos de *Wolbachia* (Simón *et al.*, 2012, Morchón *et al.*, 2014) por lo que DiES y DiCut podrían estar relacionados con mecanismos que promueven la supervivencia de *D. immitis* en el endotelio vascular. Además, se ha demostrado la actividad profibrinolítica de cuatro proteínas de DiES en su estado recombinante como son la actina, galectina, bis-fosfato aldolasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada (González *et al.*, 2015, 2016).

Hay pocos estudios que aborden el proceso angiogénico de la dirofilariosis cardiopulmonar canina. Existen estudios en los que el antígeno somático del verme adulto de *D. immitis* (DiSA) promueve la producción de moléculas pro-angiogénicas en las células endoteliales de acuerdo con la producción de VEGF-A (Zueva *et al.*, 2019), así como la estimulación del mecanismo anti-angiogénico por *Wolbachia* y la inhibición de la formación de pseudocapilares (Zueva *et al.*, 2020). Sin embargo, en cultivos estimulados con DiSA extraído de vermes adultos procedentes de perros tratados con doxiciclina (tDiSA) la producción de VEGF-A no se vio alterada, además de producirse una disminución en la capacidad de formación de pseudocapilares, mostrando de esta manera potencial antiangiogénico (Zueva *et al.*, 2019). Por otro lado, DiES y DiCut ejercen un papel proangiogénico reportado en un modelo in vitro de células endoteliales al estimular la producción de factores proangiogénicos y procesos celulares relacionados como la proliferación y migración celular y la formación de pseudocapilares (Machado *et al.*, 2023) al igual que el antígeno somático de *Dirofilaria repens* (DrSA) (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2023).

Existen estudios en otras filarias en los que se ha evidenciado la remodelación de vasos linfáticos y sanguíneos mediante cultivos de

células endoteliales linfáticas en presencia de vermes vivos o antígenos de *Wuchereria bancrofti*, los cuales activaron la remodelación de los vasos linfáticos, provocando la proliferación y diferenciación celular. Estos acontecimientos se han relacionado con procesos que facilitan la irrigación vascular en tejidos dañados (Wysmołek *et al.*, 1994). Sin embargo, algunos autores han demostrado que la angiogénesis y/o linfangiogénesis puede ser inducida por diversos factores derivados de monocitos adultos activados por vermes (Dennis *et al.*, 2011; Bennuru *et al.*, 2010; Narasimhan *et al.*, 2018).

El objetivo de este estudio fue analizar, profundizar e individualizar el papel en la angiogénesis de tres proteínas específicas del antígeno excretor/secretor de *D. immitis* (DiES) en su estado recombinante, como son la actina (rDiAct), la galectina (rDiGal), y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada (DirGAPDH), y que participan también en la fibrinólisis (González-Miguel *et al.*, 2016).

Para recrear el proceso angiogénico producido por la fricción mecánica de los vermes adultos vivos de *D. immitis* sobre los vasos sanguíneos y teniendo en cuenta que la molécula VEGF-A es la molécula clave y la primera que se produce tras la hipoxia endotelial (Karamysheva, 2008), se trataron células endoteliales con rDiAct, DirGAPDH y rDiGal con y sin VEGF-A. Como controles se utilizaron células no estimuladas (Control) y células estimuladas con DiES+VEGF-A (1 µg/ml cada una) (control positivo) (Machado *et al.*, 2023) en las mismas condiciones.

Los resultados obtenidos muestran que rDiAct, rDiGAPDH y rDiGal promueven la producción de factores proangiogénicos junto con VEGF-A y de otros procesos celulares directamente relacionados como la proliferación y migración celular y la formación de pseudocapilares, sin alterar la viabilidad celular.

Se analizaron los efectos de estos antígenos sobre la producción de VEGF-A, el principal factor angiogénico, y otras moléculas pro-angiogénicas (sVEGFR-2 y mEndoglina) y anti-angiogénicas (VEGFR-1/sFlt1 y sEndoglina). Por un lado, rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH+VEGF-A y rDiGal+VEGF-A fueron capaces de estimular la producción de VEGF-A en células endoteliales. Se ha observado un resultado similar en células endoteliales estimuladas con antígeno somático y excretor/secretor de *D. immitis*, antígeno somático de *D. repens* y de *Wolbachia* en condiciones de hipóxicas (Simón *et al.*, 2012; Morchón *et al.*, 2008; Zueva *et al.*, 2019, 2020; Machado *et al.*, 2023; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2023).

Además, los resultados mostraron un aumento en la producción de sVEGFR-2, un receptor soluble de VEGF-A que promueve la vía pro-angiogénica, cuando las células endoteliales fueron estimuladas con rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH+VEGF-A y rDiGal+VEGF-A, de la misma forma que su control positivo (DiES+VEGF-A), un proceso que se produce en situaciones similares en las que se produce daño vascular (Melincovici *et al.*, 2018; Katoh, 2016; Peach *et al.*, 2018). Sin embargo, ni rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH+VEGF-A y ni rDiGal+VEGF-A alteraron la producción de VEGFR-1/sFlt1, siendo un factor anti-angiogénico, tal y como se ha descrito en otros estudios (Shibuya, 2015; Zhang *et al.*, 2002).

Por otro lado, solo la estimulación de rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH+VEGF-A y rDiGal+VEGF-A provocaron un aumento significativo de la producción de mEndoglina, y no de sEndoglina, en el presente modelo celular endotelial. La mEndoglina es la forma unida a membrana relacionada con procesos pro-angiogénicos, mientras que la sEndoglina en la forma soluble relacionada con mecanismos anti-angiogénicos y procesos proinflamatorios (Ollauri-Ibáñez *et al.*, 2017). La supresión de endoglina en HUVECs activa la inhibición de la angiogénesis *in vitro* (Liu *et al.*, 2014). Por tanto, nuestros resultados demuestran que rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH+VEGF-A y rDiGal+VEGF-A son capaces de activar la vía pro-angiogénica, lo que podría facilitar la supervivencia de vermes adultos de *D. immitis*.

Por último, se estudió el efecto de rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH+VEGF-A y rDiGal+VEGF-A sobre la proliferación celular, así como la migración celular y la formación de pseudocapilares, procesos directamente relacionados con la angiogénesis (Gerhardt *et al.*, 2003; Tahergorabi y Khazaei, 2012; Hazarika *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2014). rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH+VEGF-A y rDiGal+VEGF-A produjeron un aumento en la proliferación y migración celular, así como la formación de pseudocapilares en el presente modelo de células endoteliales. El aumento de los niveles de VEGF-A tras la estimulación es beneficioso para la angiogénesis, que promueve el aumento tanto la proliferación endotelial como la migración (Mühleder *et al.*, 2021, Byrne *et al.*, 2005), procesos implicados en la vascularización tumoral y en la activación de mecanismos inflamatorios (Laurenzana *et al.*, 2015, Aguilar-Cazares *et al.*, 2019). Además, la formación de pseudocapilares que se asemejan a pequeños vasos sanguíneos en formación durante la angiogénesis (Francescone *et al.*, 2011; Beloglazova *et al.*, 2022), no se alteró cuando las células endoteliales fueron estimuladas con rDiAct, rDiGAPDH y

rDiGal sin VEGF-A, de la misma forma que sucede con el extracto antigénico y excretor/secretor de *D. immitis* (simulando los vermes muertos y vivos respectivamente en el endotelio vascular) (Zueva *et al.*, 2019; Machado *et al.*, 2023) e incluso fue inhibida por *Wolbachia* (Zueva *et al.*, 2020), lo que podría confirmar que DiES y las tres moléculas rDiAct+VEGF-A, rDiGAPDH+VEGF-A y rDiGal+VEGF-A facilitarían la supervivencia de los vermes adultos de *D. immitis*, ya que, a su muerte, este proceso se altera.

En conclusión, en este estudio se individualiza y se demuestra la capacidad que tienen tres proteínas del antígeno excretor/secretor de *D. immitis* (actina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada y galectina) para activar la producción de algunos factores pro-angiogénicos, un aumento de la proliferación celular, y estimulan la migración celular y la formación de pseudocapilares, al mismo tiempo que son capaces de interaccionar con el sistema fibrinolítico del hospedador y evitar la formación de coágulos, en un modelo in vitro de células endoteliales. Teniendo en cuenta que estos procesos ocurren en perros con dirofilariosis cardiopulmonar, en los que los vermes adultos producen procesos inflamatorios obstructivos e isquemia, y que los antígenos somáticos de *D. immitis* y *Wolbachia* promueven la producción de factores anti-angiogénicos, los presentes resultados sugieren que los antígenos excretores/secretores de vermes adultos de *D. immitis* y la moléculas rDiAct, rDiGAPDH y rDiGal podrían favorecer la supervivencia del parásito en el endotelio vascular mediante la estimulación de procesos pro-angiogénicos en los vasos sanguíneos.

5. REFERENCIAS

- [1] Aguilar-Cazares, D., Chávez-Domínguez, R., Carlos-Reyes, A., López-Camarillo, C., Hernández de la Cruz, O.N., López-González, J.S. 2019. Contribution of Angiogenesis to Inflammation and Cancer. *Front Oncol*, 9, 1399.
- [2] Ames, M.K., Atkins, C.E. 2020. Treatment of dogs with severe heartworm disease. *Vet Parasitol*, 283, 109131.
- [3] Barriga, O. O. 1982. Dirofilariasis. En: Steele J. H., Schultz M. G. (Eds.), Handbook Series in Zoonoses, section C. *Parasitic zoonoses*, vol. II, CRC Press Inc, USA, 93–110.
- [4] Beloglazova, I., Zubkova, E., Dergilev, K., Goltseva, Y., Parfyonova, Y. 2022. New Insight on 2D In-vitro Angiogenesis Models: All That Stretches Is Not a Tube. *Cells*, 11(20), 3278.

- [5] Bennuru, S., Maldarelli, G., Kumaraswami, V., Klion, A.D., Numan, T.B. 2010. Elevated levels of plasma angiogenic factors are associated with human lymphatic filarial infections. *Am J Trop Med Hyg*, 83(4), 884-890.
- [6] Betsholtz, C. Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. 2004. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15, 215-228.
- [7] Byrne, A.M., Bouchier-Hayes, D.J., Harmey, J.H. 2005. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF-A). *J Cell Mol Med*, 9(4), 777-794.
- [8] Cancrini, G., Kramer, L. 2001. Insect vectors of *Dirofilaria* spp. En: Simón F., Genchi C. (Eds.), Heartworm infection in humans and animals, Ediciones Universidad de Salamanca, España, 63-82.
- [9] Cancrini, G., Magi, M., Gabrielli, S., Arispici, M., Tolari, F., Dell'Omodarme, M., Prati, M. C. 2006. Natural vectors of dirofilariasis in rural and urban areas of the Tuscan region, central Italy. *J Med Entomol*, 43, 574-579.
- [10] Coultas, L., Chawengsaksophak, K., Rossant, J. 2005. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*, 438(7070), 937-945.
- [11] Dejana, E., Spagnuolo, R., Bazzoni, G. 2001. Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration. *Thromb Haemost*, 86(1), 308-315.
- [12] Dejana E. 2004. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(4), 261-270.
- [13] Dennis, R., Schubert, U., Bauer, C. 2011. Angiogenesis and parasitic helminth- associated neovascularization. *Parasitol*, 138(4), 426-439.
- [14] Dillon, A.R., Warner, A.E., Brawner, W., Hudson, J., Tillson, M. 2008. Activity of pulmonary intravascular macrophages in cats and dogs with and without adult *Dirofilaria immitis*. *Vet, Parasitol*, 158, 171-176.

- [15] Diosdado, A., Simón, F., Morchón, R., González-Miguel, J. 2020. *Dirofilaria immitis* possesses molecules with anticoagulant properties in its excretory/secretory antigens. *Parasitology*, 147(5), 559-565.
- [16] Eilken, H.M., Adams, R.H. 2010. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22:617–625.
- [17] Fenn, K., Blaxter, M. 2004. Are filarial nematode *Wolbachia* obligate mutualist symbionts? *Trends Ecol Evol*, 19(4), 163–166.
- [18] Francescone, R.A. 3rd, Faibish, M., Shao, R. 2011. A Matrigel-based tube formation assay to assess the vasculogenic activity of tumor cells. *J Vis Exp*, 55, 3040.
- [19] Gallardo-Vara, E., Tual-Chalot, S., Botella, L.M., Arthur, H.M., Bernabeu, C. 2018. Soluble endoglin regulates expression of angiogenesis-related proteins and induction of arteriovenous malformations in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Dis Model Mech*, 11, dmm034397.
- [20] García-Caballero, M., Sokol, L., Cuypers, A., Carmeliet, P. 2022. Metabolic Reprogramming in Tumor Endothelial Cells. *Intern J Mol Sci*, 23(19), 11052.
- [21] García-Guasch, L., Caro-Vadillo, A., Manubens-Grau, J., Carretón, E., Morchón, R., Simón, F., Kramer, L. H., Montoya-Alonso, J. A. 2013. Is *Wolbachia* participating in the bronchial reactivity of cats with heartworm associated respiratory disease? *Vet Parasitol*, 196(1-2), 130–135.
- [22] Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M., Cringoli, G. 2009. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Vet Parasitol*, 163(4), 286–292.
- [23] Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., Betsholtz, C. 2003. VEGF- A guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*, 161, 1163-1177.
- [24] González-Miguel, J., Morchón, R., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso J.A., Simón, F. 2012. Excretory/secretory antigens

from *Dirofilaria immitis* adult worms interact with the host fibrinolytic system involving the vascular endothelium. *Mol Biochem Parasitol*, 181, 134-140.

- [25] González-Miguel, J., Morchón, R., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F. 2013. Surface associated antigens of *Dirofilaria immitis* adult worms activate the host fibrinolytic system. *Vet Parasitol*, 196(1-2), 235-240.
- [26] González-Miguel, J., Morchón, R., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F. 2015. Can the activation of plasminogen/plasmin system of the host by metabolic products of *Dirofilaria immitis* participate in heartworm disease endarteritis? *Parasit, Vectors*, 8, 194.
- [27] González-Miguel, J., Siles-Lucas, M., Kartashev, V., Morchón, R., & Simón, F. 2016. Plasmin in Parasitic Chronic Infections: Friend or Foe? *Trends Parasitol*, 32(4), 325–335.
- [28] Gregory, AL, Xu, G., Sotov, V., Letarte, M. 2014. Review: the enigmatic role of endoglin in the placenta. *Placenta*, 35, S93-S99.
- [29] Hazarika, S., Dokun, A.O., Li, Y., Popel, A.S., Kontos, C.D., Annex, B.H. 2007. Impaired angiogenesis after hindlimb ischemia in type 2 diabetes mellitus: differential regulation of vascular endothelial growth factor receptor 1 and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1. *Circ Res*, 101(9), 948-956.
- [30] Herbert, S. P., Stainier, D. Y. 2011. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(9), 551–564.
- [31] Herold, J., Kalucka, J. 2021. Angiogenesis in Adipose Tissue: The Interplay Between Adipose and Endothelial Cells. *Front Physiol*, 11, 624903.
- [32] Hershey, J.C., Baskin, E.P., Glass, J.D., Hartman, H.A., Gilberto, D.B., Rogers, I.T., Cook, J.J. 2001. Revascularization in the rabbit hindlimb: dissociation between capillary sprouting and arteriogenesis. *Cardiovasc Res*, 49, 618-625.
- [33] Jerckic, M., Rivas-Elena, J.V., Santibáñez, J.F., Prieto, M., Rodríguez-Barbero, A., Pérez-Barriocanal, F., Pericacho, M., Arévalo,

- M., Vary, C.P.H., Letarte, M., Bernabeu, C., López-Novoa, J.M. 2006. Endoglin regulates cyclooxygenase-2 expression and activity. *Circ Res*, 99, 248–256.
- [34] Karamysheva, A.F. 2008. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)*. 73(7), 751-762.
- [35] Kotani, T., Powers, K. G. 1982. Developmental stages of *Dirofilaria immitis* in the dog. *Am J Vet Res*, 43(12), 2199–2206.
- [36] Katoh, M. Therapeutics Targeting F.G.F. 2016. Signaling Network in Human Diseases. *Trends Pharmacol, Sci*, 37(12), 1081-1096.
- [37] Kramer, L., Simón, F., Tamarozzi, F., Genchi, M., Bazzocchi, C. 2005. Is *Wolbachia* complicating the pathological effects of *Dirofilaria immitis* infections? *Vet Parasitol*, 133(2-3), 133–136.
- [38] Lamb, T. J., Le Goff, L., Kurniawan, A., Guiliano, D. B., Fenn, K., Blaxter, M. L., Read, A. F., Allen, J. E. 2004. Most of the response elicited against *Wolbachia* surface protein in filarial nematode infection is due to the infective larval stage. *J Infect Dis*, 189(1), 120–127.
- [39] Laurenzana, A., Fibbi, G., Margheri, F., Biagioni, A., Luciani, C., Del Rosso D., Chillà, A. 2015. Endothelial Progenitor Cells in Sprouting Angiogenesis: Proteases Pave the Way. *Curr Mol Med*, 15(7), 606-620.
- [40] Liu, Z., Lebrin, F., Maring, J.A., van den Driesche, S., van der Brink, S., van Dinther, M., *et al.* 2014. Endoglin is dispensable for vasculogenesis, but required for vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *PloS one*, 9, e86273.
- [41] Machado, C. D. C., Alarcón-Torrecillas, C., Pericacho, M., Rodríguez-Escolar, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J. A., Morchón, R. 2023. Involvement of the excretory/secretory and surface-associated antigens of *Dirofilaria immitis* adult worms in the angiogenic response in an in-vitro endothelial cell model. *Vet Parasitol*, 318, 109939.
- [42] McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L. 2008. Heartworm disease in animals and humans. *Adv Parasitol*, 66, 193-285.

- [43] Melincovici, C.S., Boşca, A.B., Şuşman, S., Mărginean, M., Miha C., Istrate, M., Moldovan, I.M., Roman, A.I., Miha, C.M. 2018. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol* 59(2), 455-467.
- [44] Montoya-Alonso, J. A., Morchón, R., García-Rodríguez, S. N., Falcón-Cordón, Y., Costa-Rodríguez, N., Matos, J. I., Rodríguez Escolar, I., Carretón, E. 2022. Expansion of Canine Heartworm in Spain. *Animals*, 12(10), 1268.
- [45] Morchón, R., Bazzocchi, C., López-Belmonte, J., Martín-Pacho, J. R., Kramer, L. H., Grandi, G., Simón, F. 2007. iNOs expression is stimulated by the major surface protein (rWSP) from Wolbachia bacterial endosymbiont of *Dirofilaria immitis* following subcutaneous injection in mice. *Parasitol Intern*, 56(1), 71-75.
- [46] Morchón, R., Rodríguez-Barbero, A., Velasco, S., López-Belmonte, J., Simón, F. 2008. Vascular endothelial cell activation by adult *Dirofilaria immitis* antigens. *Parasitol Intern*, 57, 441-446.
- [47] Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Velasco, S., Rodríguez-Barbero, A., Simón, F. 2010. Adult *Dirofilaria immitis* excretory/secretory antigens upregulate the production of prostaglandin E2 and downregulate monocyte transmigration in an "in-vitro" model of vascular endothelial cell cultures. *Vet Parasitol*, 170, 331-335.
- [48] Morchón, R., Carretón, E., Grandi, G., González-Miguel, J., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F., Genchi, C., Kramer, L.H. 2012. Anti-Wolbachia Surface Protein antibodies are present in the urine of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis* with circulating microfilariae but not in dogs with occult infections. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12(1), 17-20.
- [49] Morchón, R., González-Miguel, J., Carretón, E., Kramer, L.H., Valero, L., Montoya-Alonso, J.A., Simón, F., Siles-Lucas, M. 2014. Proteomic analysis of the somatic and surface compartments from *Dirofilaria immitis* adult worms. *Vet Parasitol*, 203(1-2), 144-152.
- [50] Morchón, R., Montoya-Alonso, J.A., Rodríguez-Escolar, I., Carretón, E. 2022. What Has Happened to Heartworm Disease in Europe in the Last 10 Years? *Pathogens*, 11, 1042.

- [51] Morchón, R., Rodríguez-Escolar, I., Lambraño, R. E. H., Agudo, J. Á. S., Montoya-Alonso, J. A., Serafín-Pérez, I., Fernández-Serafín, C., Carretón, E. 2023. Assessment Heartworm Disease in the Canary Islands (Spain): Risk of Transmission in a Hyperendemic Area by Ecological Niche Modeling and Its Future Projection. *Animals*, 13(20), 3251.
- [52] Morchón, R., Rodríguez Escolar, I., Collado Rodríguez, M., Pérez Pérez, P., Balmori de la Puente, A. Dirofilariosis. En: *Biología y diagnóstico de enfermedades parasitarias humanas relevantes en España*. Ediciones Universidad de Salamanca, 2024; pp. 139-147.
- [53] Morchón R, González-Miguel J. Atlas de parasitología para estudiantes de la USAL. Revelation Status, 2017; p. 150.
- [54] Mühleder, S., Fernández-Chacón, M., García-González, I., Benedito, R. 2021. Endothelial sprouting, proliferation, or senescence: tipping the balance from physiology to pathology. *Cell Mol Life Sci*, 78(4), 1329-1354.
- [55] Muñoz-Chápuli R. (2011). Evolution of angiogenesis. *Int J Dev Biol*, 55(4-5), 345–351.
- [56] Narasimhan, P.B., Akabas L, Tariq, S., Huda, N., Bennuru, S., Sabzevari, H., Hofmeister, R., Nutman, T.B., Tolouei Semnani, R. 2018. Similarities and differences between helminth parasites and cancer cell lines in shaping human monocytes: Insights into parallel mechanisms of immune evasion. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(4), e0006404.
- [57] Ollauri-Ibáñez, C., López-Novoa J.M., Pericacho, M. 2017. Endoglin-based biological therapy in the treatment of angiogenesis-dependent pathologies. *Expert Opin Biol Ther*, 17(9), 1053-1063.
- [58] Orihel, T. C. 1961. Morphology of the larval stages of *Dirofilaria immitis* in the dog. *J Parasitol*, 47, 251-262.
- [59] Patan, S. 2004. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res*, 117, 3–32. Peach, C.J., Mignone, V.W., Arruda, M.A., Alcobia, D.C., Hill, S.J., Kilpatrick, L.E., Woolard, J. 2018. Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGF-AR2. *Int J Mol Sci*, 19(4), 1264.

- [60] Pérez Rodríguez, M.D.P., Alarcón-Torrecillas, C., Pericacho, M., Rodríguez- Escolar, I., Carretón, E., Morchón, R. 2023. Effect of somatic antigens of *Dirofilaria repens* adult worms on angiogenesis, cell proliferation and migration and pseudo-capillary formation in human endothelial cells. *Parasit Vectors*, 16(1), 105.
- [61] Phng, L.K., Gerhardt, H. 2009. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell*, 16(2), 196-208.
- [62] Quiroz-Romero, H. 1984. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Editorial Limusa, p: 876.
- [63] Richarz, N. A., Boada, A., Carrascosa, J. M. 2017. Angiogenesis in Dermatology - Insights of Molecular Mechanisms and Latest Developments. *Actas dermo-sifiliograficas*, 108(6), 515–523.
- [64] Rodríguez-Escolar, I., Hernández-Lambrano, R. E., Sánchez-Agudo, J. Á., Collado, M., Pérez-Pérez, P., Morchón, R. 2023. Current Risk of Dirofilariosis Transmission in the Iberian Peninsula (Spain and Portugal) and the Balearic Islands (Spain) and Its Future Projection under Climate Change Scenarios. *Animals*, 13(11), 1764.
- [65] Sawyer T. K. 1965. Molting and exsheathment in vitro of third-stage *Dirofilaria immitis*. *J Parasitol*, 51, 1016-1017.
- [66] Shibuya, M. 2015. VEGF-A-VEGF-AR System as a Target for Suppressing Inflammation and other Diseases. *Endocr. Metab. Immune. Disord Drug Targets*, 15(2), 135-144.
- [67] Simón, F., Morchón, R., Rodríguez-Barbero, A., López-Belmonte, J., Grandi, G., Genchi, C. 2008. *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia*-derived antigens: its effect on endothelial mammal cells. *Vet Parasitol*, 158(3), 223-231.
- [68] Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. 2012. Human and animal dirofilariosis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clin Microbiol Rev*, 25, 507-544.
- [69] Simón, L., Afonin, A., López-Díez, L. I., González-Miguel, J., Morchón, R., Carretón, E., Montoya-Alonso, J. A., Kartashev, V., Simón, F. 2014. Geo-environmental model for the prediction

of potential transmission risk of *Dirofilaria* in an area with dry climate and extensive irrigated crops. The case of Spain. *Vet Parasitol*, 200(3-4), 257–264.

- [70] Simón, F., González-Miguel, J., Diosdado, A., Gómez, P. J., Morchón, R., Kartashev, V. 2017. The Complexity of Zoonotic Filariasis Episystem and Its Consequences: A Multidisciplinary View. *BioMed Res Intern*, 2017, 6436130.
- [71] Simón, F., Diosdado, A., Siles-Lucas, M., Kartashev, V., González-Miguel, J. 2022. Human dirofilariosis in the 21st century: A scoping review of clinical cases reported in the literature. *Transbound Emerg Dis*, 69(5), 2424–2439.
- [72] Sironi, M., Bandi, C., Sacchi, L., Di Sacco, B., Damiani, G., Genchi, C. 1995. A close relative of the arthropods endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Mol Biochem Parasitol*, 74, 223-227.
- [73] Tahergorabi, Z., Khazaei, M. 2012. A review on angiogenesis and its assays. *Iran J Basic Med Sci*, 15(6), 1110-1126.
- [74] Van, R.N., Piek, J.J., Buschmann, I., Hoefer, I., Voskuil, M., Schaper, W. 2001. Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res*, 49, 543-553.
- [75] Varejckova, M., Gallardo-Vara, E., Vicen, M., Vitverova, B., Fikrova, P., Dolezelova, E., Rathouska, J., Prasnicka, A., Blazickova, K., Micuda, S., Bernabeu, C., Nemeckova, I., Nachtigal, P. 2017. Soluble endoglin modulates the pro-inflammatory mediators NF-κB and IL-6 in cultured human endothelial cells. *Life Sci*, 175, 52–60.
- [76] Venco, L., Genchi, C., Simón, F. 2011. La filariosis cardiopulmonar (*Dirofilaria immitis*) en el perro. La filariosis en las especies domésticas y en el hombre. Barcelona, Spain: Merial Laboratorios, 19-60.
- [77] Wyszomolek, M.E., Długosz, E., Wiśniewski, M. 2022. The Immunological Role of Vascular and Lymphatic Endothelial Cells in Filarial Infections. *Animals (Basel)*, 12(4), 426.
- [78] Yang, Z., Eton, D., Zheng, F., Livingstone, A. S., Yu, H. 2005. Effect of tissue plasminogen activator on vascular smooth muscle cells. *J Vas Surg*, 42(3), 532–538.

- [79] Zhang, W., Ran, S., Sambade, M., Huang, X., Thorpe, P. 2002. A monoclonal antibody that blocks VEGF-A binding to VEGF-AR2 (KDR/Flk-1) inhibits vascular expression of Flk-1 and tumor growth in an orthotopic human breast cancer model. *Angiogenesis*, 5(1-2), 35-44.
- [80] Zueva, T., Morchón, R., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A., Santana, A., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., Rodríguez-Barbero, A., Simón, F. 2019. Angiogenic response in an in-vitro model of dog microvascular endothelial cells stimulated with antigenic extracts from *Dirofilaria immitis* adult worms. *Parasit Vectors*, 12, 315.
- [81] Zueva, T., Morchón, R., Carretón, E., Ollauri-Ibáñez, C., Pericacho, M., Rodríguez Barbero, A., Simón, F. 2020. Angiogenesis in cardiopulmonary dirofilariosis: does the *Wolbachia* surface protein have a pro- or anti- angiogenic effect? *J. Helminthol*, 94, e 162.

**XI PREMIO FUNDACIÓN CESFAC
“MIGUEL ÁNGEL DÍAZ YUBERO”**

**CAPOTA DE ALMENDRA:
UNA MATERIA PRIMA PARA UNA NUTRICIÓN SOSTENIBLE**

ADRIANA RECALDE GARCETE¹

MARÍA DOLORES CARRO²

TRINIDAD DE EVAN³

RESUMEN

El uso de subproductos agroindustriales en alimentación animal tiene un gran interés, ya que puede reducir los costes, contribuir a la sostenibilidad de la ganadería y potenciar la economía circular en el sector agroalimentario. España es uno de los principales productores mundiales de almendra y la capota de almendra (CA) es el principal subproducto de esta industria. La CA es la cubierta exterior del fruto, y podría usarse en las dietas de los rumiantes al tratarse de un subproducto fibroso. La CA se utiliza ampliamente en la alimentación de vacas lecheras en Estados Unidos y otros países, pero su uso en España es muy limitado y existen pocos datos sobre su composición y valor nutritivo. Además, se ha sugerido que la CA podría contener compuestos bioactivos que reducen las emisiones de metano de los rumiantes. En este trabajo se analizó la

¹ Estudiante de doctorado en Nutrición animal, UPM.

² Catedrática de Universidad, Departamento de Producción Agraria, UPM.

³ Contratada Posdoctoral con cargo a Proyecto de Generación de Conocimiento 2021 (Referencia PID2021-124648 OB-C21).

composición química y contenido energético de 36 muestras de CA recogidas en España y se observó una alta variabilidad, por lo que se recomienda analizar su composición antes de su utilización práctica. En pruebas *in vitro* no se observaron efectos antimetanogénicos de la CA. Adicionalmente, se evaluó el efecto de incluir 6 y 12% de CA en el pienso de corderos de cebo y no se observaron efectos negativos en el rendimiento productivo. Sin embargo, el uso de CA aumentó el contenido en ácidos grasos poliinsaturados de la carne, haciendo su perfil lipídico más saludable para el consumo humano, pero también aumentó la oxidación lipídica de la carne durante su almacenamiento.

ABSTRACT

The use of agroindustrial by-products in animal feeding is increasing interest, because it can reduce feeding costs, contribute to the sustainability of livestock farming, and promote the circular economy in the agri-food sector. Spain is one of the main producers of almonds worldwide and the almond hulls are the main by-product of this industry. The almond hulls are the outer covering of the fruit, and they could be used in ruminant diets because they are a fibrous by-product. The almond hulls are widely used in dairy cows feeding in the United States and other countries, but their use in Spain is still very limited and there is scant data on their composition and nutritional value. Furthermore, it has been suggested that almond hulls could contain bioactive compounds that reduce methane emissions from ruminants. In this work, we examined the chemical composition and energy content of 36 samples of almond hulls collected in Spain, and a high variability was observed. Therefore, it is recommended to analyze their composition before using almond hulls in practical feeding. No antimethanogenic effects of almond hulls were observed in *in vitro* trials. Additionally, the effect of including 6 and 12% of almond hulls in the concentrate of fattening lambs was evaluated, and no negative effects on lamb productive performance were observed. The use of almond hulls increased the polyunsaturated fatty acid content of the meat, making its lipid profile healthier for human consumption, but also increased lipid oxidation during meat storage.

1. INTRODUCCIÓN

El Plan de Acción de Economía Circular de la Unión Europea (UE) pretende reducir la presión sobre los recursos naturales y crear un crecimiento y empleo sostenibles para alcanzar el objetivo de neutralidad

climática de la UE para 2050 y detener la pérdida de biodiversidad (Comisión Europea, 2021a). Uno de los apartados de este plan se centra en “Residuos y Reciclado” y pretende reutilizar los residuos en el mayor grado posible, a través de la mejora de su gestión y la innovación en su reciclado. Al igual que otros sectores productivos, la producción ganadera está haciendo un gran esfuerzo por contribuir a estos objetivos, siendo el reciclado de residuos vegetales en la alimentación animal una práctica cada vez más frecuente. En España se generan una gran cantidad de restos vegetales, como por ejemplo los subproductos producidos en las empresas del sector agroalimentario y los residuos y desechos o desríos generados en las cosechas agrícolas. Usar estos materiales en alimentación animal presenta varias ventajas, ya que puede reducir el coste de las dietas, la competencia entre la alimentación animal y la humana, y la importación de materias primas de otros países, lo que disminuiría la huella de carbono de los productos animales, especialmente si se utilizan subproductos de producción local. Además, algunos de estos materiales contienen compuestos bioactivos beneficiosos para la salud de los animales o que pueden mejorar la calidad de los productos animales. Por último, el reciclado de estos materiales en la alimentación animal reduce la contaminación medioambiental provocada por su acumulación. En resumen, la incorporación de subproductos y residuos vegetales puede mejorar la sostenibilidad de la alimentación animal e impulsar la economía circular en el sector agroalimentario (Molina-Alcaide y Carro, 2022). Sin embargo, la utilización práctica de subproductos y restos vegetales requiere conocer su valor nutritivo y las condiciones idóneas para su inclusión en la dieta de los animales.

En los últimos años el cultivo del almendro ha experimentado un gran aumento en nuestro país, situándolo como el tercer productor mundial tras Estados Unidos y Australia. La pepita o grano constituye solo una pequeña parte del fruto (15% del total), por lo que el resto son subproductos que están formados por pieles, cáscara dura y capota de almendra (CA). La CA es la cubierta exterior de la pepita y la cáscara dura, que puede representar alrededor del 50% del peso del fruto total en base a materia fresca (Barral-Martínez *et al.*, 2021). La CA es un material fibroso que contiene nutrientes, por lo que podría ser una alternativa a materias primas convencionales en las dietas de los rumiantes. Mientras que este subproducto se utiliza ampliamente en la alimentación de vacas lecheras en Estados Unidos y otros países no europeos, aún no se utiliza rutinariamente en Europa, y apenas existen datos sobre el valor nutritivo de la CA generada en España. Este aspecto es importante, porque se ha

demostrado que la composición de la CA se ve afectada por numerosos factores, entre los que destacan las condiciones de cultivo y la variedad de almendra (DePeters *et al.*, 2020). Además, algunos estudios indican que la CA contiene compuestos que pueden reducir las emisiones de metano de los rumiantes, aunque este aspecto no está plenamente demostrado (Durmic *et al.*, 2014; Williams *et al.*, 201). El metano es un gas de efecto invernadero 80 veces más potente que el dióxido de carbono en un horizonte temporal de 20 años, aunque su vida atmosférica es relativamente baja y oscila entre 10 y 12 años (Comisión Europea, 2021b). Dada la importancia de reducir las emisiones de metano es prioritario identificar materias primas con potencial antimetanogénico. Por ello, los objetivos específicos de este trabajo son:

- Analizar la variabilidad del valor nutritivo para rumiantes de la CA generada en España y su posible efecto antimetanogénico.
- Evaluar los efectos de la inclusión de CA en el pienso de corderos de cebo sobre su rendimiento productivo y la calidad de la carne.

Para lograr estos objetivos, se llevaron a cabo varias pruebas de laboratorio y se realizó una prueba de cebo de corderos. Todos los animales utilizados en este trabajo se manejaron de acuerdo a las directrices españolas para la protección de animales de experimentación y todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por la Dirección General de Ganadería y Agricultura de la Comunidad de Madrid (Número de aprobación PROEX 212.2/22).

2. ANÁLISIS DEL VALOR NUTRITIVO Y POTENCIAL ANTI-METANOGÉNICO DE LA CAPOTA DE ALMENDRA ESPAÑOLA

2.1. Material y métodos

Se obtuvieron un total de 36 muestras de CA procedentes de diferentes explotaciones de almendros durante las campañas de 2019, 2020, 2021, 2022 y 2023 siguiendo el procedimiento de recolección americana. Este sistema consiste en el uso de vibradores de tronco (buggy) que hacen caer los frutos al suelo. Esto permite el secado de la almendra al aire y una vez alcanzado su grado de humedad óptimo, se barren los frutos y se apilan en hileras para su recogida y transporte a fábrica, donde se realiza el descapotado y se genera la CA. Las muestras procedían de las variedades Marta, Guara, Soleta, Lauranne y Penta. Una vez en el laboratorio,

las muestras se limpiaron para eliminar restos (cáscaras de almendra, palitos, hojas, polvo) y se secaron a baja temperatura (50 °C; 72 h) antes de su análisis.

Se analizó el contenido en materia seca, cenizas, fibra bruta (FB) y grasa (extracto etéreo) de las muestras utilizando los procedimientos de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005), mientras que el contenido en fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y lignina se determinó según Van Soest *et al.* (1991). Para medir el contenido en nitrógeno (N) se utilizó el método de combustión Dumas y el contenido en proteína bruta se calculó como $N \times 6,25$. El contenido en azúcares totales se determinó por espectrofotometría según el ensayo de Folin-Ciocalteu (Yemm y Willis, 1959). Para estimar el contenido energético de las muestras, estas se incubaron *in vitro* con líquido ruminal para medir la producción de gas a las 24 horas de incubación. El líquido ruminal utilizado se obtuvo de cuatro ovejas Lacaune fistuladas en el rumen y se mezcló con la solución tampón de Goering y Van Soest (1970) en proporción 1:4. Las incubaciones *in vitro* se realizaron en viales de vidrio de 120 ml en los que se pesaron 500 mg de cada muestra y se añadieron 50 ml de la mezcla de fluido ruminal y medio de cultivo. Los viales se cerraron, se incubaron a 39°C y se midió la cantidad de gas producido a las 24 horas con un medidor de presión (Delta Ohm DTP704-2BGI; Herter Instruments SL, Barcelona, España) y una jeringa de plástico.

El contenido de energía metabolizable (EM) de las muestras de capota de almendra se estimó a partir del contenido de proteína bruta y grasa (ambos expresados como g / kg de materia seca) y la cantidad de gas producido a las 24 horas de incubación por cada 300 mg de materia seca incubada (Gas) utilizando la ecuación propuesta por Menke y Steingass (1988): $EM = 2,43 + 0,1206 \times \text{Gas} + 0,0069 \times \text{Proteína bruta} + 0,0187 \times \text{Grasa}$. Los contenidos en energía neta para mantenimiento, lactación y cebo se estimaron a partir de las ecuaciones del sistema americano NRC (2001) para la CA.

Para analizar el posible potencial antimetanogénico de la CA se formularon cuatro dietas para rumiantes lecheros de producción media, una sin CA (dieta control) y tres dietas en las que se sustituyeron ingredientes por 8, 16 o 24% de CA. La CA sustituyó parcialmente al heno de alfalfa y al maíz y se incluyó urea en las dietas que contenían CA para conseguir dietas isonitrogenadas. (Tabla 1).

Ítem	Control	CA8	CA16	CA24
Ingredientes (% materia fresca)				
Heno de alfalfa	60,0	53,4	46,9	40,3
Capota de almendra	-	8,0	16,0	24,0
Urea	-	0,18	0,35	0,55
Maíz	15,0	13,4	11,8	10,2
Cebada	8,5	8,5	8,5	8,5
Harina Soja 46,5	3,0	3,0	3,0	3,0
Salvado de trigo	2,5	2,5	2,5	2,5
Pulpa de remolacha	9,0	9,0	9,0	9,0
Otros ingredientes ¹	2,00	2,00	2,00	2,00
Composición química (%) ²				
Materia seca	91,8	91,8	90,9	90,5
Materia orgánica	91,4	91,5	91,5	91,6
Proteína bruta	14,7	14,7	14,7	14,8
Fibra neutro detergente	40,9	40,9	40,5	40,1
Grasa	3,22	3,58	3,94	4,30

TABLA 1. Ingredientes y composición química de dietas sin capota de almendra (Control) y con capota incluida al 8 (CA8), 16 (CA16) y 24% (CA24) de la dieta.

¹ Otros ingredientes: jabón cálcico (1,0%), carbonato cálcico (0,5%) y premezcla vitamínico-mineral (0,5%) en las dos dietas.

² La composición química está expresada en g/100 g de materia seca, excepto el contenido en materia seca.

La muestra de CA utilizada en las dietas contenía 92,3, 6,83, 36,7, 26,6, 4,58 y 23,8 g de materia orgánica, proteína bruta, fibra neutra detergente, fibra ácida detergente, grasa y azúcares totales por 100 g de materia seca, respectivamente. Todas las dietas se formularon para satisfacer las necesidades nutritivas de rumiantes lecheros de producción media según el sistema de alimentación del INRA (Sauvant *et al.*, 2018) y para tener un contenido similar en proteína bruta y fibra neutro detergente.

Las dietas experimentales se incubaron *in vitro* siguiendo la misma metodología descrita para las muestras de CA, pero al finalizar la incubación se tomó una muestra del gas producido en un tubo de vacío

para medir posteriormente su concentración en metano por cromatografía de gases (Martínez *et al.*, 2010). Posteriormente se abrieron los viales, se midió el pH del contenido y se tomaron muestras para determinar la concentración en ácidos grasos volátiles (AGV) y amoníaco. La concentración en AGV se determinó por cromatografía de gases según el procedimiento descrito por Tejido *et al.* (2005) y la concentración en amoníaco según el método colorimétrico descrito por Weatherburn (1957).

Los datos obtenidos en la incubación *in vitro* de las dietas se analizaron mediante un análisis de varianza utilizando un modelo mixto que incluía el efecto fijo del pienso y el efecto aleatorio del inóculo ruminal. Los posibles efectos lineales y cuadráticos de la inclusión de CA en el pienso se analizaron mediante contrastes polinomiales. Cuando se detectó un efecto significativo de la inclusión de CA, las medias para cada dieta se compararon mediante el test de Tukey. Para todos los análisis estadísticos, la significancia se estableció en valores de $P < 0,05$, y los valores de $P < 0,10$ se consideraron tendencias. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el PROC MIXED del paquete estadístico SAS (2017).

2.2. Resultados y discusión crítica

En la Tabla 2 se muestran los valores medios de composición química y contenido energético de las muestras españolas de CA y de muestras americanas analizadas por el laboratorio Dairy One (<https://apps.dairyone.com/feedcomposition>). El contenido medio en cenizas, proteína bruta, grasa (extracto etéreo) y azúcares totales fue ligeramente mayor en la CA española que en las muestras americanas. Por el contrario, las muestras españolas de CA tuvieron menores contenidos en fibra neutro detergente, fibra ácido detergente, lignina y fibra bruta que las muestras americanas. En los dos casos, la fibra de la CA estuvo muy lignificada, ya que la lignina supuso de media el 31,3 y 32,0% de la fibra neutro detergente para las muestras españolas y americanas, respectivamente. Estos resultados reflejan la variabilidad de la composición de la CA, que se ve influenciada tanto por la variedad de almendra como por las condiciones de cultivo (DePeters *et al.*, 2020).

El contenido en energía metabolizable y energía neta para mantenimiento y cebo de las muestras nacionales fue mayor que el de las muestras americanas, pero el contenido en energía neta para lactación fue similar (Tabla 2). Estos datos muestran que la CA es una buena fuente de

energía para rumiantes, que podría sustituir tanto a los forrajes (debido a su contenido en fibra), como a los concentrados (por su aporte energético). Sin embargo, su valor proteico es reducido debido a su bajo contenido en proteína y la baja disponibilidad (NRC, 2001).

Ítem	Muestras españolas	Muestras Americanas ²
Composición química ¹		
Cenizas	9,48	8,41
Proteína bruta	6,84	5,89
Extracto etéreo	4,03	3,16
Fibra bruta	16,5	19,2
Fibra neutro detergente (FND)	34,2	38,8
Fibra ácido detergente	24,7	32,2
Lignina	10,7	12,4
Relación Lignina / FND (%)	31,3	32,0
Azúcares totales	26,9	24,4
Contenido energético para rumiantes (Kcal / kg de materia seca)		
Energía metabolizable	2074	1920
Energía neta para mantenimiento (ENm)	1390	1221
Energía neta para lactación (ENl)	1280	1334
Energía neta para cebo (ENc)	852	657

TABLA 2. Composición química y contenido energético para rumiantes de muestras de capota de almendra españolas y americanas.

¹ Composición química expresada en g / 100 g de materia seca, excepto cuando se indican otras unidades.

² Valores medios de muestras comerciales analizadas entre 2004 y 2022 en Estados Unidos por el laboratorio Dairy One (<https://apps.dairystone.com/feedcomposition>).

Por otra parte, como se puede observar en la Figura 1 la composición química de las muestras de CA fue muy variable. Esta amplia variabilidad se reflejó también en el contenido en energía metabolizable (1722 – 2357 Kcal /kg materia seca) y energía neta para mantenimiento (1143 – 1591 Kcal /kg materia seca), lactación (1046 – 1472 Kcal /kg materia seca) y cebo (671 – 1006 Kcal /kg materia seca). Por ello, es

necesario el análisis de la composición química de la CA antes de su utilización práctica.

% materia seca

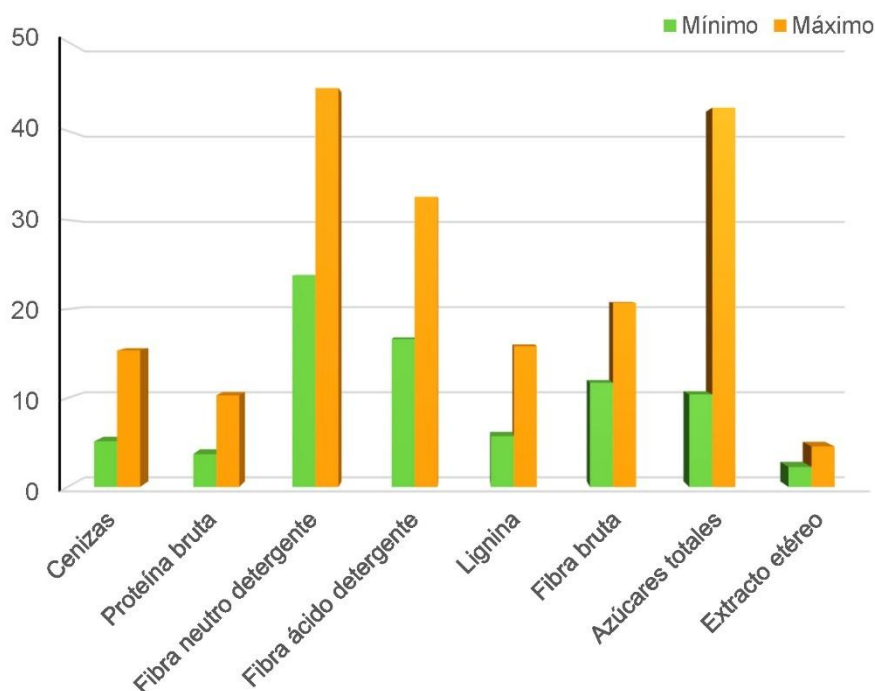


FIGURA 1. Valores máximos y mínimos para las distintas fracciones químicas analizadas en las muestras de capota de almendra de origen nacional.

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en las incubaciones *in vitro* de las dietas que contenían cantidades crecientes de CA. La inclusión de CA en el pienso produjo un aumento lineal ($P < 0,001$) del pH final y una reducción lineal ($P < 0,001$) de la producción de AGV, lo que en conjunto indica una menor fermentación de los piensos con CA.

También se observaron cambios en el perfil de AGV, con una reducción de la proporción de acético y un aumento de la proporción de propiónico, lo que provocó una disminución lineal ($P < 0,001$) de la relación acético / propiónico. Además, las proporciones de valérico disminuyeron linealmente ($P < 0,001$) al incluir CA en el pienso, lo que podría estar relacionado con una reducción de la degradación de la proteína o la desaminación de los aminoácidos, ya que el valérico es un producto de

degradación de la prolina (Dehority *et al.*, 1958). Estos resultados son consistentes con la reducción de las concentraciones de amoníaco observadas al incluir CA en el pienso, ya que el amoníaco es un producto final de la degradación de las proteínas en el rumen. Sin embargo, la inclusión de CA en los piensos no afectó ni la producción de metano ni a la relación metano / AGV, lo que indica que la CA utilizada no contenía compuestos antimetanogénicos.

Ítem ¹	Control	CA8	CA16	CA24	EEM ²	P =	
						Lineal	Cuadrático
pH	6,87 ^a	6,86 ^a	6,89 ^b	6,90 ^b	0,005	<0,001	0,244
AGV totales (mmol/ g)	6,69 ^c	6,40 ^b	6,09 ^a	6,11 ^a	0,078	<0,001	0,078
Proporción molar AGV (mol/100 mol)							
Acético (Ac)	64,6 ^c	64,1 ^{bc}	63,3 ^{ab}	62,6 ^a	0,39	0,003	0,863
Propiónico (Pr)	19,2 ^a	20,2 ^b	20,6 ^b	21,5 ^c	0,18	<0,001	0,843
Butírico	11,9	11,5	12,3	12,1	0,25	0,311	0,636
Isobutírico	1,20	1,06	1,08	1,07	0,095	0,395	0,496
Isovalérico	1,78	1,65	1,67	1,65	0,041	0,076	0,204
Valérico	1,26 ^b	1,54 ^c	1,12 ^a	1,12 ^a	0,024	<0,001	<0,001
Ac/Pr (mol/mol)	3,36 ^c	3,18 ^b	3,07 ^{ab}	2,91 ^a	0,049	<0,001	0,786
Amoníaco (mg/l)	223 ^b	188 ^a	183 ^a	191 ^a	3,6	<0,001	<0,001
Metano (ml)	50,2	46,7	46,1	47,2	1,55	0,204	0,176
Metano/AGV (ml/mol)	7,50	7,28	7,57	7,76	0,315	0,471	0,530

TABLA 3. Parámetros fermentativos de las dietas sin capota de almendra (Control) y con capota incluida al 8 (CA8), 16 (CA16) y 24% (CA24) de la dieta tras su incubación *in vitro* con líquido ruminal durante 24 horas.

^{a,b,c} Dentro de la misma fila, las medias con diferente superíndice son diferentes (P<0,05)

¹ AGV: ácidos grasos volátiles.

3. PRUEBA DE CEBO DE CORDEROS

3.1. Material y métodos

Se formularon tres piensos experimentales: uno sin CA (control) y otros dos que incluían 6 (CA6) o 12% (CA12) de CA (en materia fresca). Todos los ingredientes se molieron y se granularon (4 mm). Los

tres piensos contenían los mismos ingredientes, a excepción que las cantidades de cebada y salvado de trigo en el pienso control se redujeron en los piensos CA6 y CA12 y se reemplazaron con 6,0 y 12,0% de CA, respectivamente. Además, se incluyó urea en los piensos con CA y se aumentó la cantidad de jabón cálcico en los piensos para obtener dietas isonitrogenadas e isoenergéticas. Los ingredientes de los piensos experimentales, la composición química y el perfil de ácidos grasos de los piensos, la paja de cebada y CA se muestran en la Tabla 4.

Antes de preparar los piensos, la CA se analizó para determinar su concentración en microorganismos aerobios (ISO 4833-1:2013), *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2:2017), coliformes (ISO 4832-2006), levaduras y mohos (NF V 08-059-2002), *Escherichia coli* (ISO 16649-2:2001), *Staphylococcus coagulans* positivo (QMP_51_10_x), *Salmonella spp.* (ISO 6579-1:2017) y *Listeria monocytogenes* (QMP_504_AI_51_24_x) utilizando métodos clásicos de recuento de colonias. No se detectaron *Salmonella spp.* ni *Listeria monocytogenes* y los recuentos de otros microorganismos estuvieron por debajo de los límites recomendados en materias primas para alimentación animal.

Se utilizaron 30 corderos de raza Manchega ($12,5 \pm 0,26$ kg de peso inicial; 15 machos y 15 hembras) que se distribuyeron en tres grupos homogéneos según el peso vivo y sexo, y cada grupo fue asignado a uno de los tratamientos experimentales (Control, CA6 y CA12). Los corderos se alojaron en corrales individuales (1 m x 1 m) provistos de suelo de slat. Cada corral estaba equipado con dos comederos independientes (para paja y pienso) y un bebedero automático, y la sala estaba climatizada (20 - 22°C). Los corderos recibieron diariamente pienso y paja de cebada *ad libitum*, y tuvieron acceso continuo y libre a agua fresca.

El consumo de alimento se controló dos veces por semana y los corderos se pesaron una vez por semana. Los corderos se sacrificaron en un matadero comercial cuando alcanzaron aproximadamente 23,0 kg de PV en los días 46 y 48 de la prueba y se sacrificaron cinco corderos de cada tratamiento cada día. Las canales se pesaron tanto inmediatamente después del sacrificio como después de 24 horas de oreo en una cámara a 4°C. Asimismo, se midió el pH del músculo *Longissimus dorsi* utilizando un electrodo de penetración adaptado a un pH-metro portátil con sonda de temperatura (Hanna Instruments pH meter HI-9025; Hanna Instruments SL, Éibar, España).

Ítem	Piensos			Paja	Capota de almendra
	Control	CA6	CA12		
Ingredientes (g/100 g material fresca)					
Maíz	33,0	33,0	33,0		
Trigo	10,0	10,0	10,0		
Cebada	22,0	18,8	15,6		
Harina de soja 47%	11,0	11,0	11,0		
Harina de girasol	8,0	8,0	8,0		
Salvado de trigo	12,0	8,0	4,0		
Capota de almendra	-	6,0	12,0		
Urea	-	0,17	0,35		
Jabón cálcico	1,40	2,40	3,40		
Carbonato cálcico	1,30	1,30	1,30		
Bicarbonato sódico	0,80	0,80	0,80		
Sal	0,30	0,30	0,30		
Premezcla vitamínico-mineral	0,20	0,20	0,20		
Composición química					
Materia seca (g/100 g)	89,0	88,6	88,0	92,1	84,7
Cenizas	4,9	4,7	6,7	7,8	16,2
Proteína bruta	14,5	14,4	14,2	5,7	6,4
Extracto etéreo	3,4	4,6	5,5	1,8	34,7
Fibra neutro detergente	19,9	20,2	20,2	68,6	27,9
Fibra ácido detergente	6,9	8,5	9,5	42,2	16,7
Lignina	1,5	2,5	3,5	7,5	5,4
Ácidos grasos (% total ácidos grasos)					
Saturados	28,5	32,2	34,9	48,8	20,9
Monoinsaturados	27,4	29,8	31,9	4,18	1,07
Poliinsaturados	44,1	37,9	33,2	34,4	29,5

TABLA 4. Ingredientes de los piensos experimentales, composición química (% de la materia fresca) y perfil de ácidos grasos de piensos sin capota de almendra (Control) y con 6 (CA6) o 12% (CA12) de capota de almendra, paja de cebada y capota de almendra incluida en los piensos.

Transcurridas las 24 horas de oreo se midió de nuevo el pH y se diseccionaron los dos músculos *Longissimus dorsi* de cada cordero. El músculo del lado derecho se congeló y posteriormente se liofilizó para analizar la composición química y el perfil de ácidos grasos. El músculo del lado izquierdo se dividió en dos porciones. Una de las porciones se

congeló inmediatamente para determinar su concentración en sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo con el procedimiento descrito por Maraschiello *et al.* (1999), expresando los resultados como mg de malondialdehído (MDA) / kg de carne. En la otra porción se midió el color y se colocó en bandejas de poliestirén, que se envolvieron con una película de plástico de uso alimentario permeable al oxígeno y se almacenaron durante 6 días en una cámara oscura a una temperatura de 2°C. Transcurridos 6 días se determinó el color de las muestras y se congeló para determinar posteriormente su concentración en TBARS para analizar la evolución de la oxidación lipídica de la carne. El perfil de ácidos grasos se analizó mediante cromatografía de gases siguiendo el método descrito por Andrés *et al.* (2019).

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza como un modelo mixto en el que el pienso, el sexo y la interacción pienso x sexo se consideraron efectos fijos. Debido a que no se detectaron efectos del sexo ni interacciones pienso x sexo, se muestran únicamente los efectos del pienso. Cuando se detectó un efecto significativo de la inclusión de CA, las medias se compararon mediante el test de Tukey. El nivel de significación estadística se estableció en $P < 0,05$, y los valores de $P < 0,10$ se consideraron tendencias.

3.2. Resultados y discusión crítica

No hubo diferencias entre grupos en el peso final ($P = 0,372$) ni en el consumo de pienso ($P = 0,349$), paja ($P = 0,883$) o el consumo total de alimento ($P = 0,331$) de los corderos (Tabla 5). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Scerra *et al.* (2022), quienes tampoco observaron efectos sobre estos parámetros cuando se incluyó un 15 o un 30% de CA en el pienso de corderos de raza Sarda reemplazando parcialmente la cebada y el maíz. Tampoco se detectaron efectos del tipo de pienso en el índice de conversión ($P = 0,274$), el peso de la canal caliente ($P = 0,735$) y fría ($P = 0,655$) y el rendimiento de la canal ($P = 0,194$), pero la ganancia media diaria tendió ($P = 0,092$) a reducirse al incluir CA en el pienso.

Como se muestra en la Tabla 6, la inclusión de CA en el pienso no influyó en el contenido en agua, cenizas, proteína o grasa de la carne de los corderos ($P = 0,393$, $0,459$, $0,235$ y $0,187$, respectivamente). El pH del *Longissimus dorsi* tendió a verse afectado por la alimentación de los corderos en la medida efectuada tras el sacrificio ($P = 0,083$) y tras

24 horas de oreo ($P = 0,052$), pero en todos los casos los valores estuvieron en el rango considerado normal para la carne de cordero.

Ítem	Pienso			EEM ¹	P =
	Control	CA6	CA12		
Peso final (kg)	23,5	22,8	22,1	0,654	0,372
Consumo (g/d)					
Pienso	768	740	718	23,3	0,349
Paja	52,1	52,5	50,0	3,76	0,883
Total	820	793	768	23,7	0,331
Ganancia media diaria (g/d)	238	222	198	11,8	0,092
Índice de conversión (g /g)	3,55	3,59	3,96	0,184	0,274
Peso canal caliente (kg)	10,9	10,7	10,6	0,34	0,735
Peso canal fría (kg)	10,7	10,4	10,4	0,32	0,655
Rendimiento de la canal (%)	45,8	45,7	46,9	0,45	0,194

TABLA 5. Peso final, consumo de pienso y paja, ganancia media diaria, índice de conversión, y peso y rendimiento de la canal de corderos de cebo alimentados con un pienso control sin capota de almendra (Control) y con piensos con 6 (CA6) o 12% (CA12) de capota de almendra.

¹ EEM: error estándar de la media ($n = 10$).

Los valores de oxidación lipídica en el momento del sacrificio fueron similares para todos los corderos ($P = 0,474$; Tabla 6), pero tras 6 días de almacenamiento la carne de los corderos CA12 presentó mayores ($P < 0,05$) concentraciones de malondialdehído que la de los corderos CA6 (0,247 vs. 0,214 mg /kg de carne). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las concentraciones de TBARS en todas las muestras estuvieron por debajo de 0,50 mg de malondialdehído / kg de carne, que es el valor mínimo propuesto para la detección del sabor rancio (Lanari *et al.*, 1995).

La Figura 2 muestra las proporciones de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en la carne de los tres grupos de corderos. No hubo diferencias ($P = 0,338$) entre grupos en la proporción de ácidos grasos saturados. En comparación con el grupo Control, la

proporción de ácidos grasos monoinsaturados disminuyó ($P < 0,05$) y la de ácidos grasos poliinsaturados aumentó ($P < 0,05$) en los corderos que recibían los piensos CA6 y CA12. Además, es importante mencionar que la proporción de ácidos grasos n-6 fue mayor en la carne de los corderos alimentados con CA que en la de los corderos control, pero no hubo diferencias entre grupos en la relación n-6 / n-3 (12,4, 13,0 y 13,4 para el grupo Control, CA6 y CA12, respectivamente). Los ácidos grasos poliinsaturados se consideran más saludables que los ácidos grasos saturados para los humanos, ya que proporcionan protección contra la osteoartritis, el cáncer y los trastornos autoinmunes (Kapoor *et al.*, 2021). Estos resultados indican un perfil potencialmente más saludable de la carne de corderos alimentados con CA que en los corderos control.

Ítem	Pienso				P =
	Control	CA6	CA12	EEM ¹	
Composición química (%)					
Agua	73,8	73,5	74,3	0,59	0,393
Cenizas	1,04	0,99	1,05	0,031	0,459
Proteína	21,2	22,2	21,7	0,42	0,235
Extracto etéreo	3,96	3,31	2,95	0,371	0,187
pH					
pH <i>Longissimus dorsi</i> 0 h	6,73	6,73	6,88	0,047	0,083
pH <i>Longissimus dorsi</i> 24 h	5,64	5,73	5,63	0,028	0,052
TBARS (mg malondialdehído / kg carne)					
Día 0	0,199	0,192	0,196	0,0039	0,474
Día 6	0,228 ^a	0,214 ^a	0,247 ^b	0,0077	0,034

TABLA 6. Composición química, pH a las 0 y 24 horas del sacrificio y concentración en sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) medida al sacrificio y tras 6 días de almacenamiento de la carne de corderos de cebo alimentados con paja de cebada y con un pienso control (Control), con 6 (CA6) o 12 (CA12) % de CA.

^{a,b} Dentro de la misma fila, las medias con diferente superíndice son diferentes ($P<0,05$).

¹ EEM: error estándar de la media (n = 10).

% total ácidos grasos

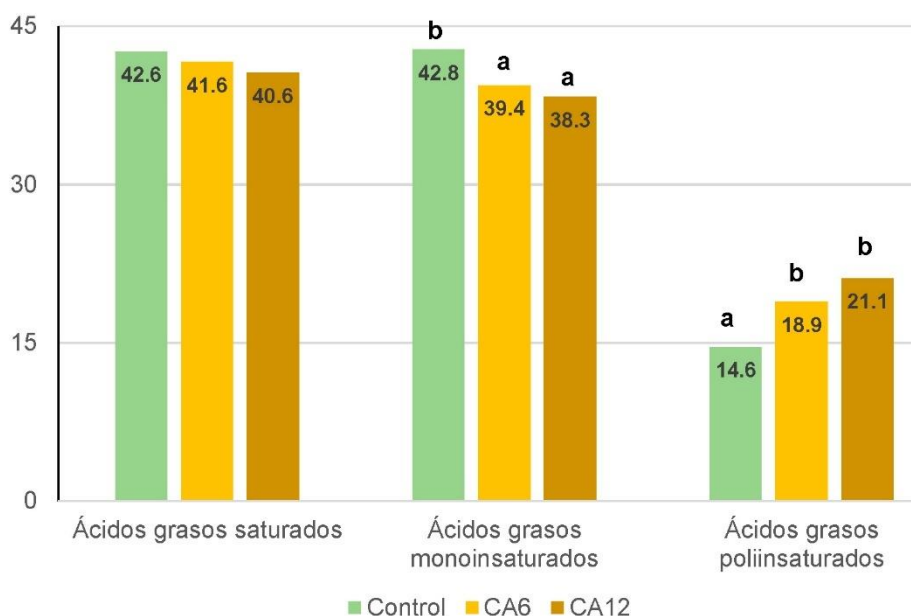


FIGURA 2. Perfil de ácidos grasos (g /100 g ácidos grasos totales) en la carne de corderos de cebo alimentados con un pienso sin capota de almendra (Control), con 6 (CA6) o 12% (CA12) de capota de almendra. Diferentes letras entre columnas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre grupos.

4. CONCLUSIONES

- 1) La composición química y el contenido energético de la capota de almendra producida en España es muy variable y pueden verse afectados por la variedad de almendra y por las condiciones de cultivo. Por ello, es necesario analizar la composición de la capota antes de su inclusión en las dietas de los animales.
- 2) La inclusión de capota de almendra en las dietas de rumiantes puede tener efectos variables sobre su fermentación ruminal, pero en el presente estudio no se observaron efectos antimetanogénicos.
- 3) Los resultados *in vivo* indican que es posible incluir un 12% de CA en el pienso de corderos de cebo sin afectar negativamente a su rendimiento productivo. Además, la utilización de capota de almendra modificó las proporciones de ácidos grasos de la carne hacia un perfil más saludable para el consumo humano al aumentar la proporción de ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo, la utilización de capota

de almendra también puede aumentar la oxidación lipídica de la carne durante su almacenamiento.

- 4) El uso de capota de almendra como materia prima alternativa en la alimentación de los rumiantes contribuiría a su reciclado y a la sostenibilidad de las explotaciones ganaderas. Además, podría presentar beneficios económicos, pero esto dependerá no solo del precio de la capota de almendra sino también del precio de las materias primas a las que sustituya.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Andrés, S., Jaramillo, E., Mateo, J., Caro I., Carballo D.E., López, S., Giráldez F.J. 2019. Grain grindi ereals in complete pelleted diets for growing lambs: Effects on animal performance, carcass and meat quality traits. *Meat. Sci.*, 157: 107-874.
- [2] AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2005. Official Methods of Analysis, 18th ed.; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA.
- [3] Barral-Martínez, M., Fraga-Corral, M., García-Pérez, P., Simal-Gandara, J., Prieto, M.A. 2021. Almond By-Products: Valorization for Sustainability and Competitiveness of the Industry. *Foods* 10, 1793.
- [4] Comisión Europea. 2021a.
https://environment.ec.europa.eu/strategy/circular-economy-action-plan_en
Último acceso: 20.10.2024.
- [5] Comisión Europea. 2021b.
https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/SPEECH_21_5770
Último acceso: 20.10.2024.
- [6] De Evan T., Cabezas A., de la Fuente Vázquez J., Carro, M. D. 2020. Feeding Agro-Industrial By-Products to Light Lambs: influence on growth performance, diet digestibility, nitrogen balance, ruminal fermentation and plasma metabolites. *Animals* 1:10(4), 600.

- [7] Dehority B.A., Johnson R.R., Bentley O.G., Moxon A.L. 1958. Studies on the metabolism of valine, proline, leucine and isoleucine by rumen microorganisms *in vitro*. *Arch. Biochem. Bioph.*, 78, 15-27.
- [8] DePeters, E.J., Swanson K.L., Bill H.M., Asmus J., Heguy J.M. Nutritional composition of almond hulls. 2020. *Appl. Anim. Sci.* 36 (6), 761-770.
- [9] Durmic Z., Moate P.J., Eckard R., Revell D.K., Williams R., Vercoe P.E. 2014. *In vitro* screening of selected feed additives, plant essential oils and plant extracts for rumen methane mitigation. *J Sci Food Agric.* 94(6), 1191-1196.
- [10] Goering M.K., Van Soest P.J. 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications). In *Agricultural Handbook; Agriculture Handbook No. 379; Agricultural Research Services: Washington, DC, USA.*
- [11] Kapoor B., Kapoor D., Gautam S. 2021. Dietary Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs): Uses and Potential Health Benefits. *Curr. Nutr. Rep.*, 10: 232–242.
- [12] Lanari M.C., Schaefer D.M., Scheller K.K. 1995. Dietary vitamin E supplementation and discoloration of pork bone and muscle following modified atmosphere packaging. *Meat Sci.* 41: 237–250.
- [13] Lobón S., Joy M., Casasús I., Rufino-Moya P.J., Blanco, M. 2020. Field Pea can be Included in Fattening Concentrate without Deleterious Effects on the Digestibility and Performance of Lambs. *Animals*, 10(2), 243.
- [14] Maraschiello C., Sárraga C., García Regueiro J.A. 1999. Glutathione peroxidase activity, TBARS, and α -tocopherol in meat from chickens fed different diets. *J. Agric. Food Chem.* 47: 867–872.
- [15] Martínez M.E., Ranilla M.J., Tejido M.L., Ramos S., Carro M.D. 2010. The effect of the diet fed to donor sheep on *in vitro* methane production and ruminal fermentation of diets of variable composition. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 158, 126–135.
- [16] Menke K.H., Steingass H. 1988. Estimation of the Energetic Feed Value Obtained from Chemical Analysis and *In Vitro* Gas Production Using Rumen Fluid. *Anim. Res. Dev.*, 28, 7–55.

- [17] Molina-Alcaide E., Carro M.D. 2022.
<https://theconversation.com/subproductos-agroindustriales-y-residuos-de-cosecha-para-reducir-la-dependencia-de-los-cereales-en-los-piensos-182374>
Último acceso: 31/10/2024.
- [18] NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle (8th Revised Edition). 2021. Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture and Natural Resources, National Research Council. National Academies Press, Washington, DC, USA.
- [19] SAS Institute. 2017. SAS/STAT®Users Guide; Version 9.3; SAS Inst. Inc.: Cary, NC, USA.
- [20] Sauvant D., Delaby L., Noziere P. 2018. INRA Feeding System for Ruminants; Noziere, P., Sauvant, D., Delaby, L., Eds. Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands.
- [21] Scerra M., Bognanno M., Foti F., Caparra P., Cilione C., Mangano F., Natalello A., Chies L. 2022. Influence of almond hulls in lamb diets on animal performance and meat quality. *Meat Science* 192, 108903.
- [22] Tejido M.L., Ranilla M.J., García-Martínez R., Carro M.D. 2005. *In vitro* Microbial Growth and Rumen Fermentation of Different Diets as Affected by the Addition of Disodium Malate. *Anim. Sci.*, 81, 31–38.
- [23] Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber and Non Starch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.
- [24] Weatherburn M.W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.*, 39, 971–974.
- [25] Williams S.R.O., Deighton M.H., Jacobs J.L., Wales W.J., Moate P.J. 2014.
- [26] Almond hulls and citrus pulp can be used as supplementary feeds for dairy cows, but neither has any methane mitigation potential. *Dairy Sci. Symp.* 5, 273-275.

- [27] Yemm, E.W., Willis, A.J. 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.* 157, 508–514.

**XI PREMIO FUNDACIÓN CESFAC
“CARLOS DE BLAS BEORLEGUI”**

**CONTROL DE SALUD INTESTINAL MEDIANTE
BIOMARCADORES: CLAVE DE LA SANIDAD EN
LA PRODUCCIÓN PORCINA**

MANUEL TOLEDO CASTILLO¹

ANABEL FERNÁNDEZ BRAVO²

ANDREA MARTÍNEZ MARTÍNEZ³

ELENA GOYENA SALGADO⁴

EMILIO JOSÉ RUÍZ FERNÁNDEZ⁵

SIMÓN GARCÍA LEGAZ⁶

JOSÉ MANUEL PINTO CARRASCO⁷

¹ Doctor en Veterinaria y Veterinario jefe de producción, Agropecuaria Casas Nuevas SA.

² Veterinaria de producción, Agropecuaria Casas Nuevas SA.

³ Veterinaria de producción, Agropecuaria Casas Nuevas SA.

⁴ Doctora en Medicina Veterinaria por la Universidad de Murcia.

⁵ Veterinario de producción, Agropecuaria Casas Nuevas SA.

⁶ Veterinario de producción, Agropecuaria Casas Nuevas SA.

⁷ Ingeniero agrónomo, SAT Hnos. Chico SL.

RESUMEN

A consecuencia de la adaptación de la producción a los nuevos escenarios del sector como son la retirada del zinc, la creación de explotaciones sostenibles y la reducción del uso de antibióticos, los criterios de sostenibilidad de las explotaciones han cambiado. Actualmente, el mayor criterio de sostenibilidad es la sanidad de una explotación y el uso eficiente de los recursos necesarios para la producción alimentaria, siendo además una competencia importante dentro de la actividad veterinaria.

Por lo tanto, en este trabajo proponemos considerar que la salud intestinal no tiene importancia solo a nivel digestivo, sino que la reducción de la disbiosis y la inflamación intestinal en los cerdos, produce alteraciones en la respuesta inmune a nivel sistémico, debido a la interconexión de las mucosas (eje intestino-pulmón). Como consecuencia a esto, en los casos de disbiosis intestinal se genera una respuesta inmunitaria poco robusta y una respuesta inflamatoria más intensa, lo que condiciona no solo los resultados productivos de los animales, sino su evolución sanitaria.

ABSTRACT

As a result of adapting production to the new scenarios in the sector such as the withdrawal of zinc, the creation of sustainable farms, and the reduction of antibiotic use, the sustainability criteria of farms have changed. Currently, the greatest sustainability criterion is the health of a farm and the efficient use of resources needed for food production, which is also an important competency within veterinary activity.

Therefore, in this work, we propose considering that intestinal health is not only important at the digestive level but that the reduction of dysbiosis and intestinal inflammation in pigs produces alterations in the immune response at the systemic level due to the interconnection of mucous membranes (gut-lung axis). As a consequence of this, in cases of intestinal dysbiosis, a weak immune response and a more intense inflammatory response are generated, which affects not only the productive results of the animals but also their health evolution.

1. DEFINICION DE NUEVOS ESCENARIOS DE PRODUCCIÓN PORCINA

En estos últimos años la industria porcina está sufriendo numerosos cambios en cuanto a la sanidad; ya que se ha tenido que eliminar el

óxido de zinc de los piensos de primeras edades de los lechones y se ha tenido, a la vez, que reducir el uso de antibióticos. Esto último era totalmente necesario para empezar abordar un gran problema como son las resistencias a los antimicrobianos. Por todo esto, es necesario realizar cambios importantes en nuestra manera de entender la producción. Lógicamente, tendremos un mayor uso de los métodos biológicos y tendremos que disponer de herramientas de monitorización sanitaria que nos mejoren la detección de las incidencias sanitarias, para que podamos abordarlas en momentos más tempranos.

El cebo de ganado porcino, a nivel sanitario, es el espejo de la granja de reproductoras, ya que el cebo solo manifiesta las patologías que tenemos en las granjas de reproductoras. Por ello, el trabajo en las granjas de reproductoras se está centrando en reducir la transmisión horizontal de las enfermedades para limitar la transmisión vertical a los lechones, y por lo tanto, tener la menor prevalencia posible de enfermedad. Lo que se busca es que estas incidencias sanitarias no se manifiesten en el periodo de cebo. De esta manera, lo que tendremos es una producción sostenible, ya que producimos de una forma más eficiente al tener que usar menos recursos, como es el menor uso de antibióticos posibles.

Estamos en unos momentos de cambios en la producción. Añadido a nuevos desafíos sanitarios, los cuales hay que superar para mantener nuestra producción, (y seguir siendo rentables) ya que somos productores de alimentos.

Los grandes cambios, a nuestro parecer, van a venir en primer lugar, del control de las patologías digestivas como eje de control de la sanidad, y en segundo lugar, minimizar el consumo de antibióticos, ya que, en la fase de cebo, debido al peso de los animales, es donde más cantidad de antibióticos se suelen usar.

En cuanto a la fase del destete, es un gran desafío para los lechones derivado de enfrentarse a numerosos cambios de alojamiento, alimentación, jerarquía, etc. a los que tienen que hacer frente sin el uso de herramientas que se usaban habitualmente en esta fase. De esta forma, buscamos mejorar las condiciones de esta fase y que se produzcan de forma paulatina los cambios a los que se enfrentan los lechones, evitando estrés y alteraciones en la sanidad de los animales.

2. EL MICROBIOMA INTestinal

Definimos como microbiota al conjunto de microorganismos que residen en un nicho determinado. En cuanto al concepto microbioma es

más completo, ya que incluye, no solo a los microorganismos, sino a sus metabolitos y sus genes en un nicho determinado. Para este trabajo emplearemos siempre el concepto microbiota como eje para su control y reducción de alteraciones tanto digestivas como respiratorias.

El microbiota intestinal del porcino es un ecosistema tremendamente complejo en ganado porcino. En el periodo de cebo existen tres patologías que agrupan el 90% de las que cursan en estos animales. Dos de estas, ileitis y salmonelosis, afectan al íleon, y la disentería que afecta al colon. Todas ellas son capaces de alterar de manera notable la microbiota, y en el caso de salmonella provoca una fuerte reacción inflamatoria.

Los cambios y las disbiosis son capaces de producir, no solo alteraciones a nivel digestivo, si no provocar alteraciones a nivel respiratorio induciendo una reducción de la respuesta inmune y un incremento de la respuesta inflamatoria ante patógenos respiratorios que están presentes en los animales, pero que necesitan un factor desencadenante para que la clínica aparezca.

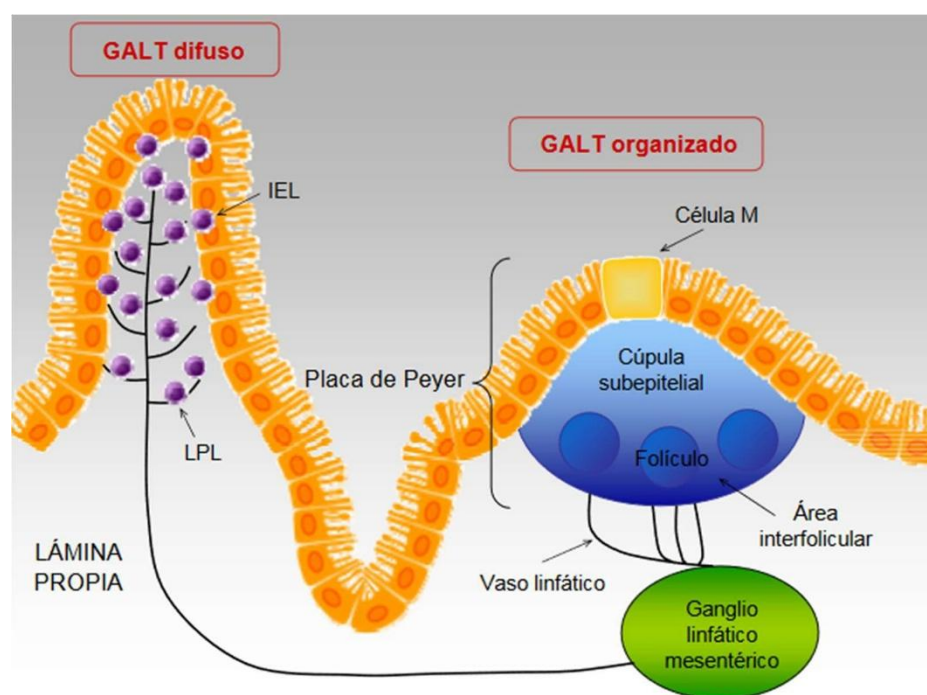


FIGURA 1. Tejido linfoide asociado a la mucosa.

3. EJE INTESTINO PULMON

La mucosa intestinal está altamente correlacionada con otros órganos, como la glándula mamaria y el pulmón, y por lo tanto, los cambios que se pueden producir a nivel local tienen repercusiones a nivel general. Estas alteraciones surgen de varias maneras. En primer lugar, son capaces de alterar la respuesta inmune, al igual que la respuesta inflamatoria. En segundo lugar, las citoquinas producidas en el intestino pueden alterar la respuesta inflamatoria en el pulmón.

Debemos tener una nueva visión de cómo la influencia de los procesos respiratorios puede alterar el microbiota intestinal y así cambiar la sanidad intestinal de los animales. Por supuesto que este eje es bidireccional, y el factor clave es como las patologías intestinales tienen una fuerte influencia en la intensidad y la duración de los procesos clínicos respiratorios a nivel de campo. El nuevo escenario es que la reducción de antibióticos en producción ejerce un cambio importante en el microbiota intestinal, ya que las patologías digestivas que anteriormente estaban ocultas por los tratamientos para el control de enfermedades, ya no lo están. De esta manera, el incremento de la incidencia de patologías digestivas como ileitis, disentería, etc. están más vigentes que nunca.

Nuestras percepciones en el campo, es que las granjas, en gran medida, tienen patologías digestivas que suelen estar subclínicas, como puede ser el caso de *Lawsonia* o de *Brachyspira*, pero en un momento determinado pueden hacer que un proceso respiratorio tenga una mayor duración e intensidad.

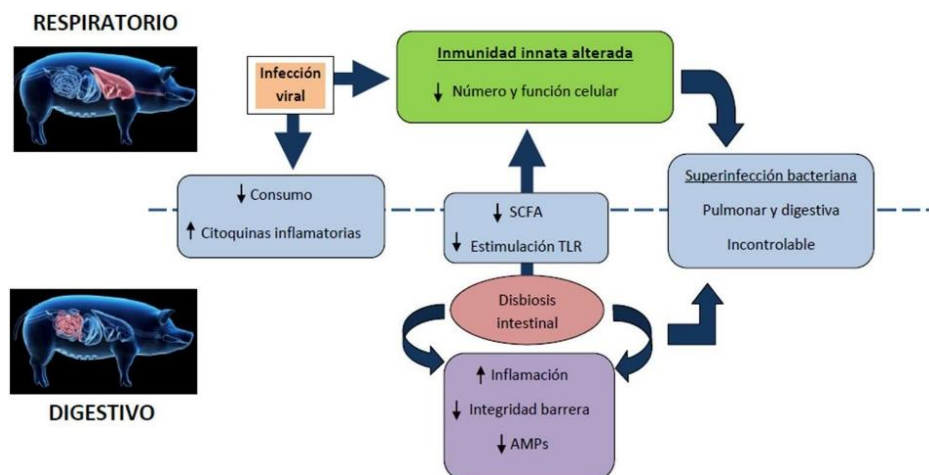


FIGURA 2. Eje intestino pulmón y alteraciones que se producen debidas a la disbiosis digestiva y las alteraciones respiratorias que se observan.

Como podemos observar en la figura 2, la importancia de la comunicación de las mucosas radica en la alteración inmunitaria y en la respuesta inflamatoria que es mucho más intensa.

4. BIOMARCADORES SALIVARES

La saliva es un fluido biológico que toma cada vez más importancia en las pruebas diagnósticas veterinarias. Desde hace unos años, se utiliza ampliamente para la determinación de patógenos, siendo una muestra muy sencilla de conseguir y sin generar estrés a los animales.

En la actualidad, existen numerosos análisis que pueden ser determinados en la saliva que nos aportan información sobre todo del estado de salud y bienestar que gozan nuestros animales. Con toda probabilidad, una mezcla de ellos nos puede determinar el estatus sanitario de nuestros animales y serían marcadores importantes para el control de las patologías en las granjas de producción. Pero, sobre todo, para la monitorización sanitaria, ya que tendríamos datos específicos del estado general de la granja y de las incidencias sanitarias que ocurren. Con esto, podemos llegar a la raíz del problema, y llegar a establecer medidas de control adecuadas.

La combinación de varios biomarcadores y sus interacciones es la manera de tener una información completa de nuestra población y lo que está aconteciendo en ella. La gran ventaja es que podemos determinar procesos subclínicos, y por lo tanto, tenemos un buen margen para anticipar soluciones antes de que la clínica, con todas sus consecuencias, aparezca en la población.

Existen una serie de biomarcadores, que son los más utilizados como indicadores de las analíticas correspondientes. Estos son:

- **Haptoglobina** es una proteína de fase aguda que se incrementa en los procesos inflamatorios sean estos infecciosos o no. Es un buen indicador de que el animal está sufriendo un proceso que cursa con inflamación, y por lo tanto puede determinar procesos subclínicos. Está altamente incrementada en los procesos inflamatorios. No se ve influenciada por los efectos del estrés térmico, por lo tanto, para la determinación de intensidad de un proceso infeccioso es una buena herramienta.
- **Inmunoglobulinas G inespecíficas (IgG)** son las que se desencadenan en un proceso infeccioso, así que se incrementan cuando el

animal desarrolla una respuesta inmune contra ese patógeno. Se ve incrementada en los casos de enfermedades sistémicas, y es un gran indicador para diferenciar entre poblaciones con una enfermedad infecciosa de las que no la tienen. Casi siempre lo vemos correlacionado cuando hay incrementos con clínica en la población. Existen procesos respiratorios inespecíficos con disnea, tos y reducción del consumo de pienso que generan una reducción del crecimiento de nuestros animales.

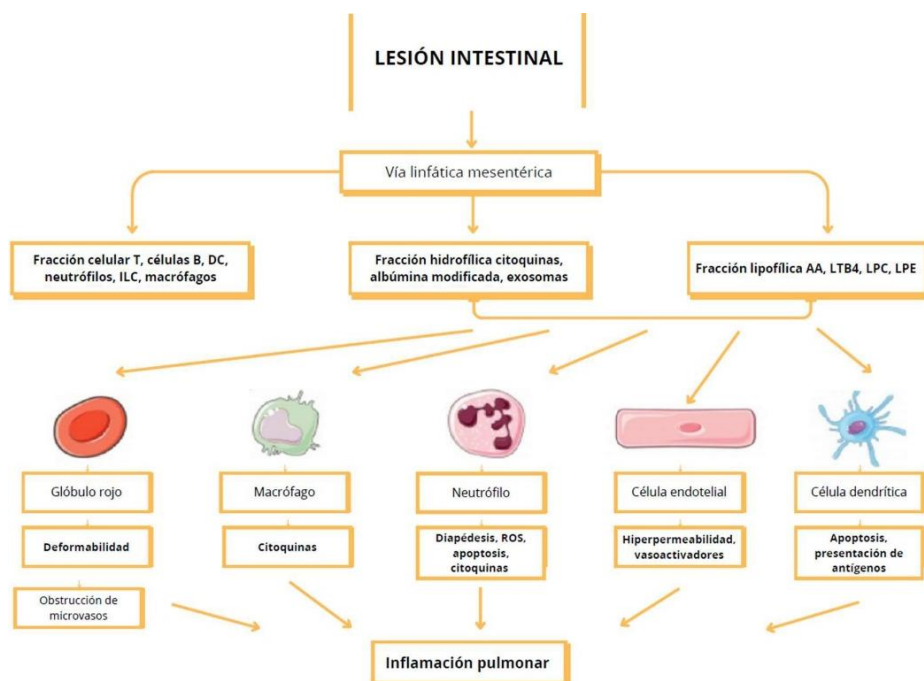


FIGURA 3. Mecanismos por los cuales la inflamación intestinal ejerce una influencia en la respuesta inmune y en la inflamación pulmonar.

- **ADA** es el adenosín desaminase. Es un indicador de la respuesta inmune celular y de la inflamación. Sus niveles elevados serán los que indique una activación del sistema inmune a nivel celular y de la inflamación.

Por lo tanto, la combinación de las tres nos ayudará a establecer la evolución sanitaria durante el cebo de los animales, y poder establecer medidas de control en los procesos que afecten al cebo.

La dinámica de los biomarcadores nos ofrece una visión de la prevalencia y la clínica de las enfermedades en los cebaderos. En las líneas

de cebo definidas ocurren los procesos clínicos que generan una cantidad de bajas muy constantes y es necesario realizar una serie de medidas de control para atajar esos procesos. Esta dinámica de los biomarcadores nos puede servir para establecer medidas de control en la granja de reproductoras y ver su alcance en los cebos. Debemos esperar cambios, puesto que sirve de gran ayuda en la monitorización sanitaria de las granjas, pero también, para valorar las actuaciones que realizamos en la granja de reproductoras y sus repercusiones sanitarias en las fases posteriores.

5. OBJETIVOS

El objetivo es determinar si una vacuna contra *Lawsonia intracellularis*, ejerce una influencia positiva, no solo en los parámetros productivos, ya que eso está absolutamente demostrado. La idea del trabajo es verificar que esta alteración digestiva que produce la *Lawsonia intracellularis* ejerce alteraciones en el comportamiento de las enfermedades respiratorias que afectan a los cebos. Como consecuencia de esto, el tiempo de curación de la población era mayor y las repercusiones sanitarias también lo son. De esta manera, se provoca que la clínica respiratoria sea mucho más recidivante por alteraciones inmunitarias derivadas de la disbiosis intestinal.

Hay que tener en cuenta, que la *Lawsonia intracellularis* es una bacteria intracelular obligada y que tiene una prevalencia muy alta en las granjas de cerdos de España. Su incidencia clínica es la hipertrofia del íleon, pero también provoca una disbiosis intestinal. La vacunación desplaza la infección por salmonella, que se trata de un patógeno que no solo tiene interés en producción porcina, sino también en seguridad alimentaria.

¿Qué criterios de valoración vamos a efectuar?

Como consecuencia de la recirculación de *Lawsonia intracellularis* en la población, mediremos la cantidad de los biomarcadores que hemos descrito, y su alteración, nos dirá la influencia en los parámetros técnicos del cebo en cuanto a la ganancia media diaria (GMD) e índice de conversión (IC). También el porcentaje de bajas y el coste de medicación. Este último es un criterio de sostenibilidad muy importante en producción porcina.

6. MATERIAL Y METODOS

Se tomarán dos poblaciones de 630 cerdos de los cuales se procederá al marcado con doble crotal de 15 animales. Todos ellos son machos

enteros de cruce comercial de cerda LWxLD y el finalizador Pietrain. La granja de origen es una granja de reproductoras en fase 1 con 2.700 reproductoras en una zona de alta densidad (Fuente Álamo en Murcia). De los dos grupos, uno será el grupo vacunado y el otro el grupo control.

Todos los lechones han sido vacunados contra Circovirus porcino tipo 2 y contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. El grupo vacunado, además, se ha vacunado en el mismo momento, a los 23 días de vida, con *Lawsonia intracelularis* vacuna inactivada.

El destete de los animales se realiza a los 28 días de vida y son trasladados a unas transiciones independientes de las naves de reproductoras. Allí estarán 6 semanas y entrarán a dos cebos iguales, pero separados más de 1 km. de distancia. Las características de los dos cebaderos son iguales en cuanto a tipo de tolva, aislamiento, calidad de agua, número de bebederos, etc.

Los lechones se crotalan a la entrada al cebadero con una edad de 10 semanas de vida con doble crotal. Se procede a la toma de muestras en cuatro momentos del engorde.

- Entrada al engorde.
- Al mes de la entrada.
- A los dos meses de la entrada.
- A los tres meses de la entrada.

A todos se les realiza cuatro tomas, tanto de saliva como de sangre. Las de saliva se realiza antes para no estresar al animal, y posteriormente la muestra de sangre.

La analítica de los biomarcadores salivares se realizó en la Universidad de Murcia. La recogida de muestras se hace y se enviaba en el mismo día, por lo que las muestras se congelaron para realizar todas las determinaciones analíticas en el mismo momento.

Sobre todos los datos, se ha realizado el análisis estadístico para comprobar si había diferencias significativas entre el grupo vacunado y el grupo control.

Las analíticas de seroconversión a *Lawsonia* se realizaron en el laboratorio Biofarm Biotechnology en España, y las analíticas de biomarcadores salivares se realizaron en el laboratorio SALILAB-UMU dirigido por Dr. José Joaquín Cerón.

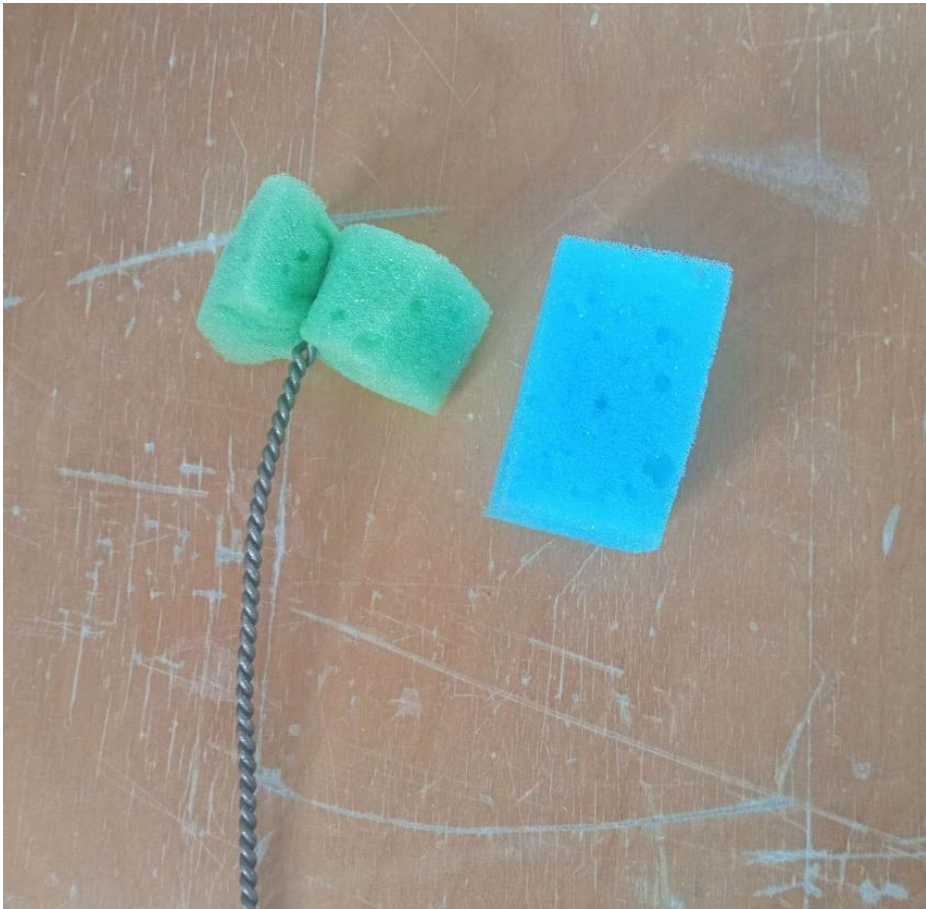


FIGURA 4. Foto de la esponja y dispositivo para que conseguir la saliva de los cerdos.

7. RESULTADOS

7.1. Dinámica de seroconversión

- **Primer muestreo a las 10 semanas de vida (entrada al cebo, T1).** Se detecta una diferencia altamente significativa en cuanto a porcentaje de positivos entre ambos grupos (chi cuadrado de Pearson =9,130; $p=0,003$). La proporción de positivos es mayor en el grupo vacunado.

En este primer muestreo la dinámica de seroconversión contra lawsonia sigue el patrón que nos permite afirmar que no tenemos recirculación hasta las 10 semanas de vida, solo aparece el grupo vacunado, como es lógico debido a la vacuna.

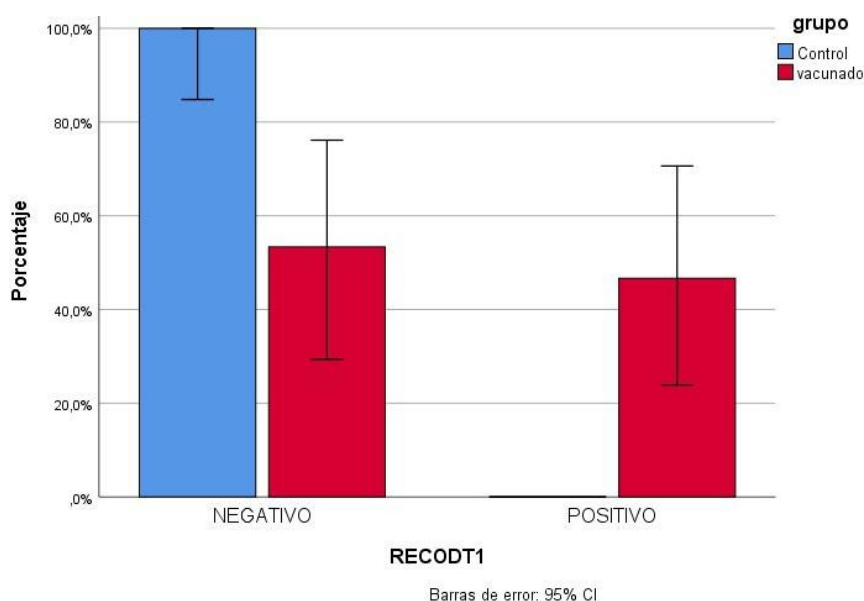


FIGURA 5. Presencia de positivos y negativos en ambos grupos T1.

- **Segundo muestreo (al mes de entrar, T2).** En la segunda toma de muestras se detecta una diferencia significativa en cuanto a porcentaje de positivos entre ambos grupos (chi cuadrado de Pearson =3,968; $p=0,046$). La proporción de positivos es mayor en el grupo vacunado.

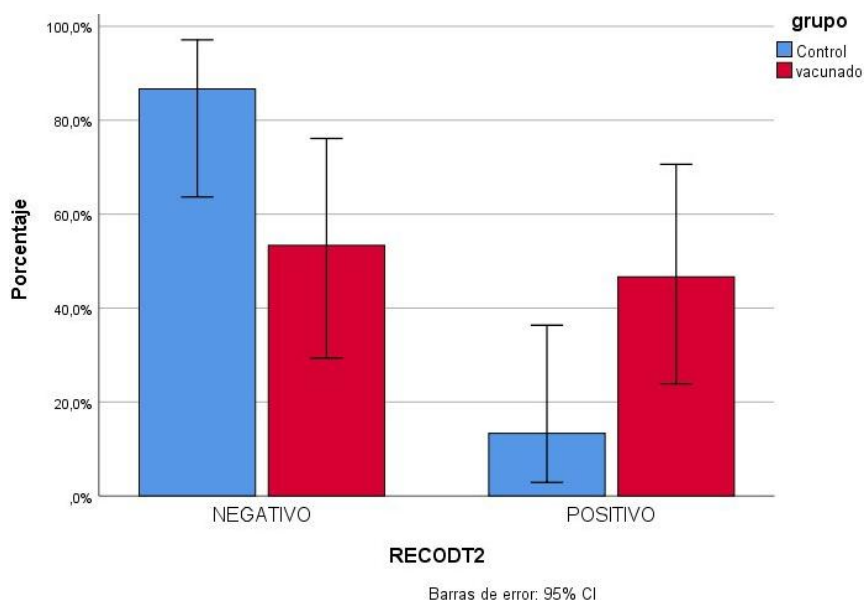


FIGURA 6. Presencia de positivos y negativos en ambos grupos T2.

En esta segunda toma el grupo control empieza a seroconvertir como consecuencia de la circulación de lawsonia entre los individuos de la población.

- **Tercer muestreo (a los dos meses de entrar, T3).** En esta toma no se encuentra diferencias significativas entre el grupo vacunado y el grupo control.

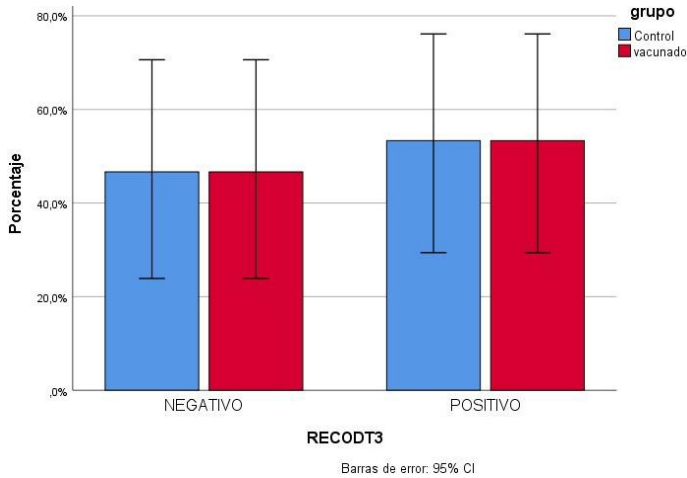


FIGURA 7. Presencia de positivos y negativos en ambos grupos T3.

- **Cuarto muestreo (a los tres meses de entrar, T4).** Se detecta una diferencia altamente significativa en cuanto al porcentaje de positivos entre ambos grupos (chi cuadrado de Pearson =12,128; $p<0,001$). La proporción de positivos es mayor en el grupo vacunado.

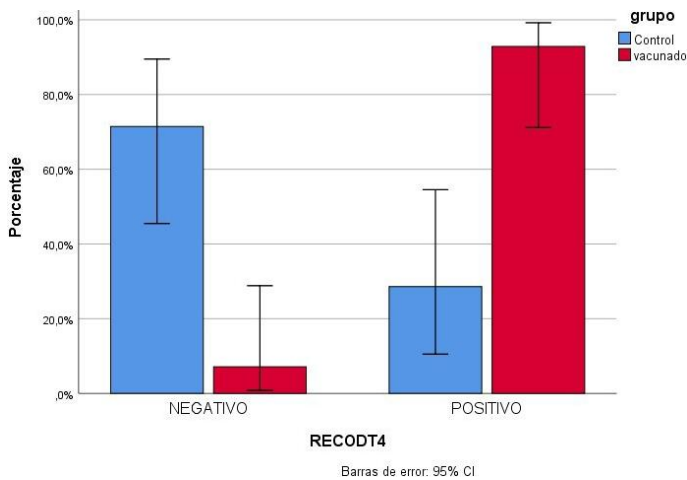


FIGURA 8. Presencia de positivos y negativos en ambos grupos T4.

Se detectan una diferencia altamente significativa. En el grupo vacunado ya han seroconvertido todos los animales. En cambio, en el grupo control se sigue con la seroconversión. Esto tiene una consecuencia: que la transmisión de la enfermedad en el efectivo ocurre de una manera muy lenta, y que, por lo tanto, tenemos una coexistencia de animales infectados y animales susceptibles en la misma población.

La consecuencia clínica es que no hay un momento de infección contra lawsonia. Ocurre durante un largo periodo de tiempo, y eso tiene consecuencias en cuanto a la salud intestinal, que repercute de manera directa en los procesos respiratorios que observamos en el cebo, y que cursaban de manera recurrente.

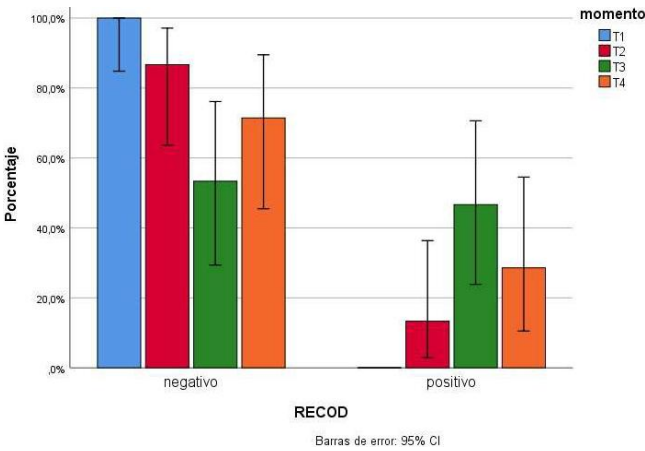


FIGURA 9. Presencia de positivos y negativos en el grupo no vacunado en el tiempo.

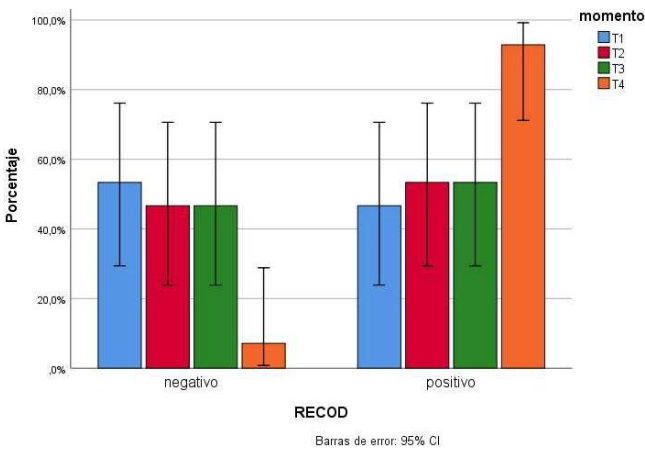


FIGURA 10. Presencia de positivos y negativos en el grupo vacunado en el tiempo.

Es evidente que la dinámica de recirculación de *Lawsonia* es totalmente diferente en el grupo vacunado y en el grupo control. Esto condiciona el estatus sanitario de la población, y como consecuencia, debemos encontrar una correlación entre la recirculación del patógeno, la reacción inmune y la inflamatoria de los animales.

7.2. Dinámica de los biomarcadores sanguíneos

- **Revisión de la haptoglobina (HP)**, es una proteína de fase aguda como dijimos que aparece en los procesos inflamatorios e infecciosos, responden a estímulos inflamatorios que aparecen y se elevan antes de que aparezca la enfermedad.

HP (ng/ml): dado que la variable no se distribuye normalmente, se aplica una transformación logarítmica ($\log_{10}$). Se detecta una interacción tiempo por grupo altamente significativa ($F=18,805$; $p<0,001$). El comportamiento de la variable en los diversos tiempos es diferente en función de la granja considerada.

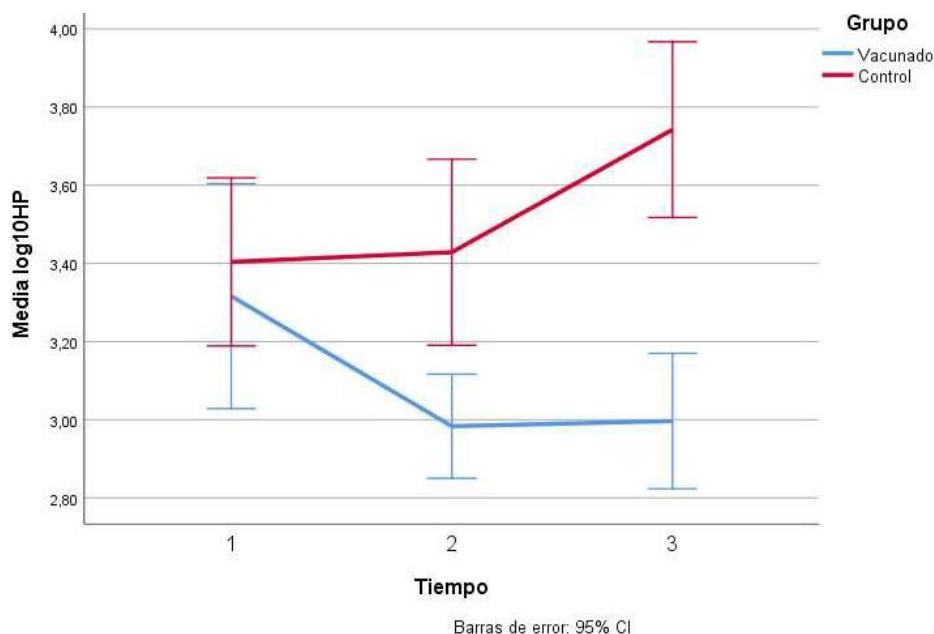


FIGURA 11. Cantidad de haptoglobina en los grupos a lo largo del tiempo.

Como podemos observar (Figura 11) en el T1 no encontramos ningún tipo de diferencia significativa entre las dos poblaciones, incluso en

estos momentos estábamos teniendo en ambas poblaciones una recirculación de PRRS y no produjo cambios importantes, probablemente debido a que la virulencia o la inmunidad de los animales era alta y no se produjo ningún tipo de acción inflamatoria. El T1 es un momento en el cual no se ha producido ninguna elevación de los niveles de haptoglobina ya que no se ha producido en la población ningún tipo de respuesta inflamatoria.

En el T2 y T3 es cuando se produce un incremento en el grupo control de la reacción inflamatoria. Es en parte debida a la recirculación en este periodo de la *Lawsonia*, pero también coincide con los momentos en los cuales se incrementaron los procesos respiratorios y fueron tratados con antibióticos ya que los animales manifestaron fiebre, tos y disnea.

- **Revisión de la inmunoglobulina G inespecífica (IGg)**, las cuales determinan la respuesta inmunitaria inespecífica.

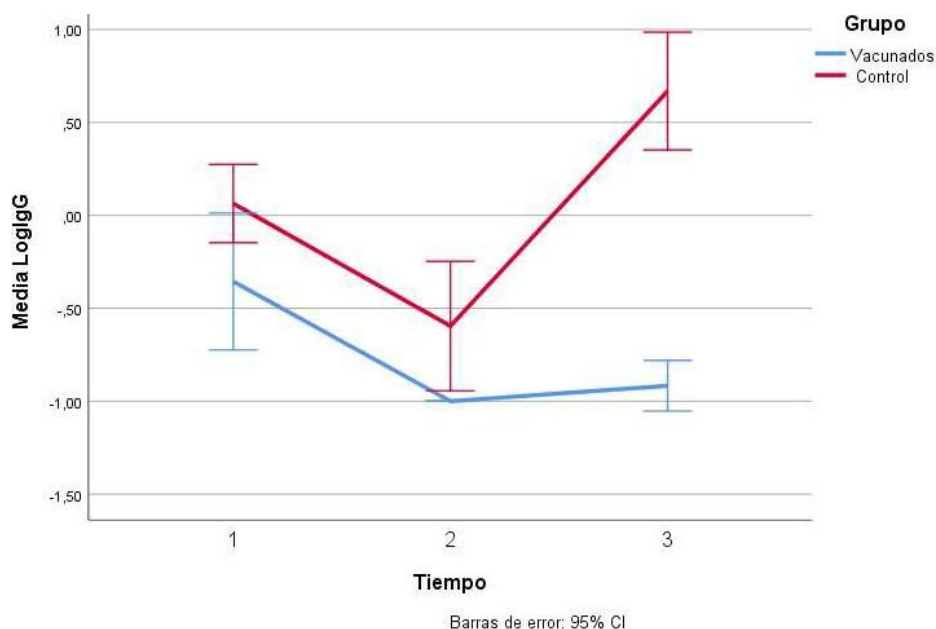


FIGURA 12. Cantidad de IGg en los grupos a lo largo del tiempo.

Como se observa en el grafico (Figura 12) el incremento de la inmunoglobulina G inespecífica está altamente correlacionada con la recirculación de *Lawsonia* en la población.

- **Revisión del adenosín desaminase (ADA)** en la saliva, determinante de la activación de la respuesta inmune de carácter celular.

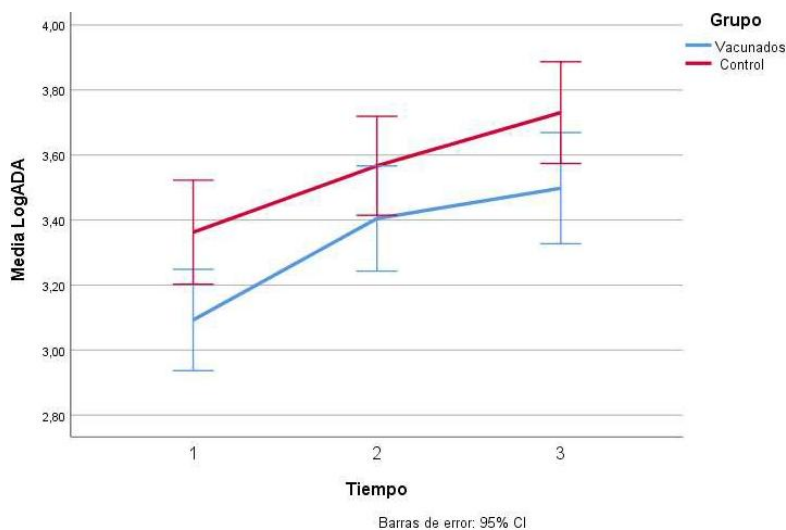


FIGURA 13. Cantidad de ADA en los grupos a lo largo del tiempo.

Se detectan diferencias altamente significativas entre los dos grupos, sea cual sea el tiempo considerado ($F=10,298$; $p=0,003$). Las medias en colonia (control) son significativamente superiores. Por lo tanto, la respuesta inmune celular es también más alta en el caso del grupo control.

Esta estimulación inmune da lugar a una disminución de los parámetros productivos, ya que los recursos de la alimentación se dedican a generar esta respuesta inmune.

7.3. Dinámica de la viremia de PRRS

Se evalúan, y se hace una PCR cuantitativa en los periodos, para comprobar la viremia de los lechones en el cebo a PRRS y su posible influencia en los resultados que hemos obtenido.

Observamos como la viremia que viene desde finales de la transición persiste en las dos tomas de muestras iniciales en el grupo control.

No hay diferencias entre la dinámica de la enfermedad en la población, ya que sigue el mismo patrón: a la segunda toma siguen estando virémicos y en el T3 y T4 están negativos.

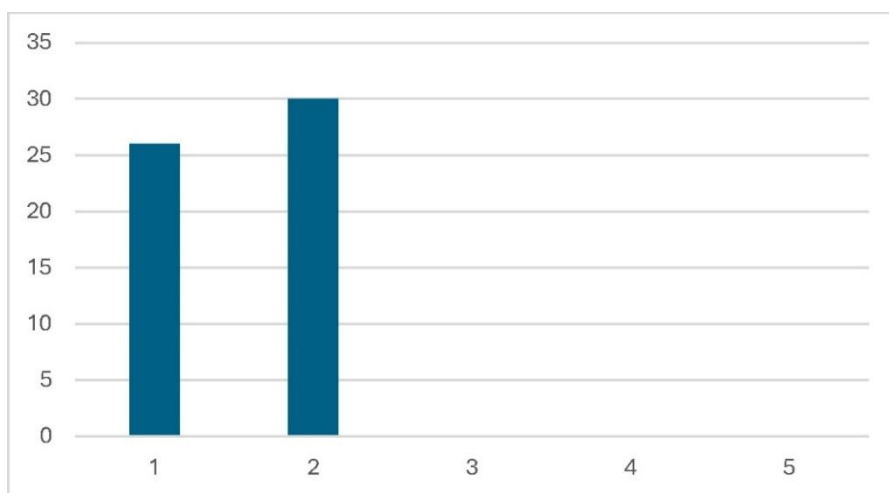


FIGURA 14. PCR cuantitativa de PRRS en el grupo control en el tiempo.

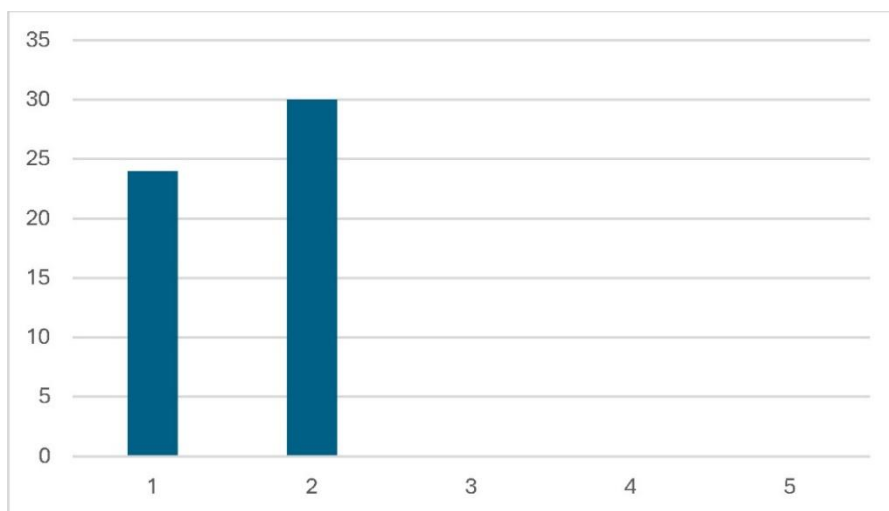


FIGURA 15. PCR cuantitativa de PRRS en el grupo vacunado en el tiempo.

Entendemos que no hay respuesta a los biomarcadores de inflamación y de inmunidad ya que los lechones eran positivos desde antes de entrar en el cebo, y, por lo tanto, no hay una respuesta inflamatoria e inmunitaria en la fase final de la viremia.

7.4. Mortalidad en las explotaciones

Solo consideraremos la mortalidad como un indicador de las diferentes patologías que ha tenido la población estudiada.

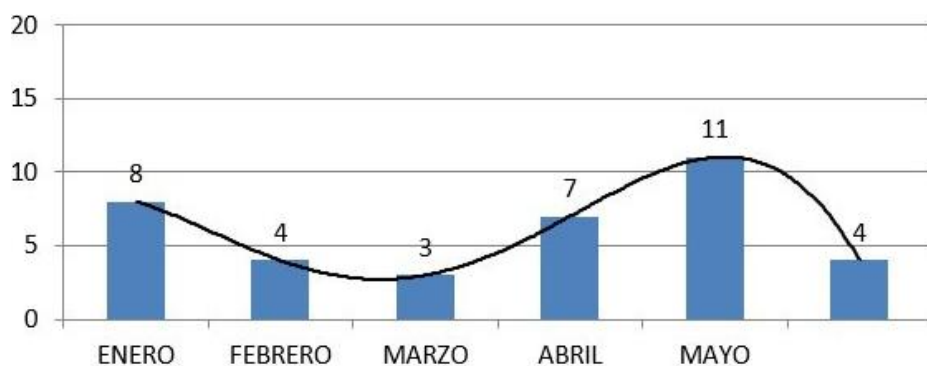


FIGURA 16. Cantidad de bajas en el grupo control en el tiempo.

En cuanto a las bajas producidas en el grupo control, se produce una distribución de las bajas en las cuales el final de periodo de cebo es cuando más bajas se tuvieron, y durante el resto tuvimos clínica digestiva y respiratoria que se aprecia en el consumo de antibióticos durante todo el cebo.

El último mes se incluyen los animales que han tenido que ser sacrificados por no tener su peso comercial, y por lo tanto, no poder ser comercializados debido a su falta de peso generado por los distintos procesos que han sufrido.

El porcentaje de bajas total de este cebadero se sitúa en el 5,8% (37 bajas en 630 animales entrados)

Las manifestaciones respiratorias tuvieron un fuerte impacto. El problema fundamental, como se puede observar en la Figura 16 es la persistencia del problema a lo largo del tiempo. Hay una constante en la granja que viene vinculada con la seroconversión de *Lawsonia*, esta seroconversión provoca en el intestino una hipertrofia del íleon y una disbiosis, de igual manera favorece la proliferación de *salmonella*, creando una fuerte inflamación intestinal que tiene una fuerte influencia, no solo a nivel intestino, creando una mala absorción de nutrientes, sino también una clínica de fuerte retraso en el crecimiento.

Estas alteraciones digestivas están muy relacionadas con la mordedura de rabos, ya que la inflamación intestinal provoca una alteración del comportamiento y maximiza la mordedura de rabo. Todo viene porque el cerdo quiere producir más saliva para contrarrestar las molestias digestivas.



FIGURA 17. Foto de mordedura de rabos en los cerdos con patología digestiva.

Las lesiones intestinales que provoca la ileitis genera una ansiedad a los cerdos que hace que tengan un comportamiento tendente a la mordedura de los rabos por el grado de nerviosismo que se genera.

En estos cebos tuvimos una patología respiratoria recurrente (*Pasteurella* y *Glaessrella*) que hacía que tuviéramos que abordar el tratamiento antibiótico de manera más frecuente.

En cuanto a las bajas en el grupo vacunado es totalmente diferente.

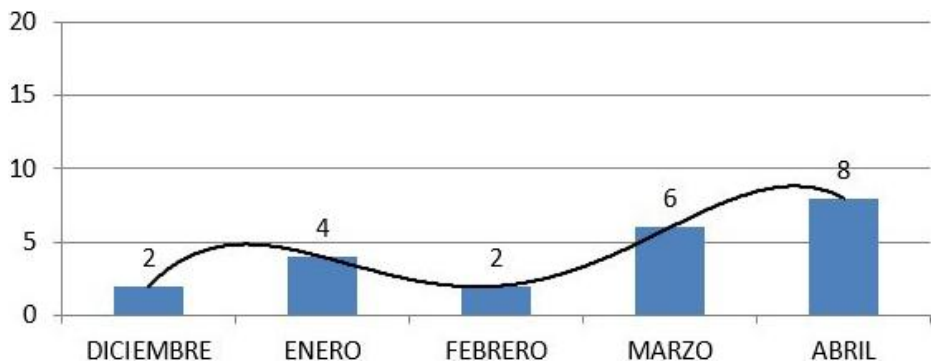


FIGURA 18. Cantidad de bajas en el grupo vacunados en el tiempo.

El porcentaje de bajas es de 3,81% (24 de 630 lechones entrados), lo que significa una bajada muy significativa en el grupo vacunado con respecto al grupo control. De igual manera, se observa como la distribución de las bajas es reducida y aunque hay una seroconversión a Lawsonia no hay manifestaciones clínicas de procesos respiratorios.

7.5. Datos zootécnicos

En este apartado no solo controlamos las bajas de los animales, sino también la ganancia media diaria (GMD). Este parámetro es una medida de salud de la población de cerdos: cuanto más crecen más sanos están. Por otra parte, también valoramos el índice de conversión (IC) que es un parámetro del coste de producción más importante en el cebo de ganado.

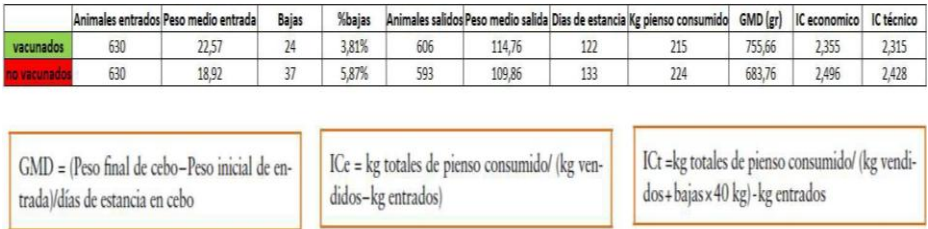


FIGURA 19. Datos zootécnicos de los dos grupos y formulas.

Sobre los resultados reflejados en este cuadro (Figura 19), podemos sacar una serie de conclusiones:

- Existen diferencias importantes en cuanto a las bajas: hay una diferencia de un 2%, aproximadamente, favorable al grupo vacunado que al grupo control.
- El factor más importante es el IC, el cual es de 141 gramos mejor en el grupo vacunado. En el caso del IC técnico, esta diferencia es de 113 gramos.
- Esto representa en caso de llevarlo al peso repuesto (92 kg x 0,141 gramos pienso extra), a consumir 12,9 kg de pienso extra más en el grupo de cerdos no vacunados. Es decir, un cerdo no vacunado necesita 12.9 kg más de pienso para llegar al mismo peso que un cerdo vacunado. Que al precio que está el pienso, esto supone 3,99 euros más por cada cerdo producido.
- En cuanto a la GMD, el grupo de no vacunados crecen 72 gramos menos que los animales del grupo vacunado. Es un parámetro muy

- Durante el engorde se produjeron un número mayor de procesos respiratorios inespecíficos de etiología múltiple en el grupo control asociados a la recirculación de *Lawsonia* que lógicamente creaba un ambiente de disbiosis intestinal que lo observábamos acompañado de clínica de tos en un porcentaje elevado de los animales y de disnea.

Una vez analizados los costes de medicación de los grupos, podemos concluir que:

- | MEDICACIÓN CHARCO | vacunado | | |
|-------------------|-------------|----------|-------------|
| DICIEMBRE | Tratamiento | Duración | Coste Tto € |
| | Amoxicilina | 4 días | 97,6 |
| | Florfenicol | 5 días | 186 |
| | Florfenicol | 5 días | 186 |
| ENERO | Tratamiento | Duración | Coste |
| | Doxiciclina | 4 días | 371,3 |
| FEBRERO | Tratamiento | Duración | Coste |
| | Lincomicina | 5 días | 241,5 |
| COSTE TOTAL | | 1082,4 | |
| Nº ANIMALES | | 630 | |
| COSTE/ ANIMAL | 1,72 | | |

control	MEDICACIÓN COLONIA		
DICIEMBRE	Tratamiento	Duración	Coste
	Amoxicilina	4 días	97,6
	Doxiciclina	4 días	185,69
ENERO	Tramienio	Duración	Coste
	Florfenicol	5 días	248
	Lincomicina	5 días	144,9
FEBRERO	Tratamiento	Duración	Coste
	Sulfamida	8 días	419
	Ketoprofeno	2 días	29,93
	Tianfenicol	5 días	507
	Tilvalosina	2 días	210,32
	Tilvalosina	2 días	210,32
	Tilvalosina	2 días	210,32
MARZO	Tratamiento	Duración	Coste
	Lincomicina	5 días	241,5
	Marbofloxacino	3 días	263,5
	Paracetamol	2 días	96,24
	Ketoprofeno	2 días	29,93
	Lincomicina	5 días	241,5
COSTE TOTAL		3135,75	
Nº ANIMALES		630	
COSTE/ ANIMAL	4,97738095		

151

7.7. Cargas y coste económico

- La gestión de cargas y vaciado de un cebadero es clave para conseguir la máxima rentabilidad de los animales. En este proceso intervienen muchos factores que se han de tener en cuenta. Uno de estos factores es la duración y la intensidad de los procesos infecciosos que pueden afectar a la población de animales.
- Como hemos determinado en el estudio, las consecuencias han sido un empeoramiento en la GMD y en el IC de los animales no vacunados. Pero hay otra consecuencia, que es la variabilidad de pesos que se origina como resultado de los procesos infecciosos que padece la población. Un aumento de la variabilidad de pesos dificulta enormemente el proceso de cargas y vaciado. Disminuir la desviación estándar en cuanto al peso es clave para disminuir los descuentos que aplican los mataderos por no estar dentro del rango de peso idóneo que marcan. La diferencia entre llevar a matadero lotes de cerdos homogéneos y con un peso correcto (dentro del rango marcado), o llevarlos con una variabilidad significativa puede suponer una diferencia de 4,5 €/cerdo.
- La mayor heterogeneidad también repercute en el número de veces que se entra a cargar en cada una de las cuadras del cebo. Cada vez que se realiza una carga, tendrá que existir un ayuno previo al transporte (12 h) lo que supondrá un aumento de estrés debido a la restricción de alimento y descenso de la productividad para los animales que permanezcan en la granja, pudiendo llegar a perder hasta 1 kg de peso si el ayuno es muy prolongado (24 h). Hay que tener en cuenta que cada vez que se retiran animales de una cuadra se produce el establecimiento de nuevas jerarquías (peleas, aumento del estrés).
- En definitiva, un mejor estatus sanitario a lo largo del proceso de engorde es sinónimo de mayor eficiencia de los animales y se traduce en una mayor rentabilidad final.

8. CONCLUSIONES

- La innovación de este estudio recae en establecer la importancia del control de la patología digestiva en una población y valorar la incidencia que tiene los procesos respiratorios que afectan a esa pirámide en cuanto a intensidad y duración de estos y las consecuencias económicas que nos plantean, pero sin olvidar que la eficiencia en

producción es un indicador de sostenibilidad y, por lo tanto, es la dirección hacia la que tienen que ir la producción.

- El cambio de mentalidad a la hora de abordar las patologías de las pirámides de producción, en cuanto a la importancia en sistemas sin medicación de los procesos entéricos, y de la importancia de las disbiosis que se producen por la presentación de patologías digestivas que suelen, en muchas ocasiones, ser subclínicas y no ser detectadas.
- La sostenibilidad de la producción está basada en la reducción de los antibióticos en producción con el control integral de la salud de nuestras granjas.
- El uso de biomarcadores, no solo para monitorizar la salud de las granjas, sino para valorar los cambios que realizamos y las repercusiones que estos tienen, son un sistema de detección temprana de enfermedades que nos ayuda a mejorar los procesos productivos.
- Debemos de ser conscientes de que nuevos abordajes a las patologías se están abriendo, el conocimiento cada vez mayor del papel del intestino en numerosas patologías, así como la interacciones que encontramos entre el intestino y otros órganos debido a la comunicación cruzada que existe. Son un campo nuevo de estudio que de principio nos permite elaborar protocolos de diagnóstico, pero sin duda son una ventana para poder modular la microbiota y establecer nuevas líneas de tratamiento en el control de la enfermedad en nuestros animales de producción.

9. BIBLIOGRAFIA

- [1] Enaud R, Prevel R, Ciarlo E, Beaufils F, Wieërs G, Guery B, Delhaes L. The Gut-Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter- Organ and Inter-Kingdom Crosstalks. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Feb 19;10:9.
- [2] Dickson RP, Erb-Downward JR, Falkowski NR, Hunter EM, Ashley SL, Huffnagle GB. The Lung Microbiota of Healthy Mice Are Highly Variable, Cluster by Environment, and Reflect Variation in Baseline Lung Innate Immunity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018 Aug 15;198(4):497-508.
- [3] Leite FLL, Singer RS, Ward T, Gebhart CJ, Isaacson RE. Vaccination Against *Lawsonia intracellularis* Decreases Shedding of

Salmonella enterica serovar Typhimurium in Co-Infected Pigs and Alters the Gut Microbiome. *Sci Rep*. 2018 Feb 12;8(1):2857.

- [4] Borewicz KA, Kim HB, Singer RS, Gebhart CJ, Sreevatsan S, Johnson T, Isaacson RE. Changes in the Porcine Intestinal Microbiome in Response to Infection with *Salmonella enterica* and *Lawsonia intracellularis*. *PLoS One*. 2015 Oct 13;10(10).
- [5] Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol*. 1977;31:107-33.
- [6] Zheng, L.; Shi, L.; Wu, X.; Hu, P.; Zhang, B.; Han, X.; Wang, K.; Li, X.; Yang, F.; Wang, Y.; *et al*. Advances in Research on Pig Salivary Analytes: A Window to Reveal Pig Health and Physiological Status. *Animals* 2024, 14, 374.
- [7] Tecles F, Rubio CP, Contreras-Aguilar MD, *et al*. Adenosine deaminase activity in pig saliva: analytical validation of two spectrophotometric assays. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2018;30(1):175-179.
- [8] Piirainen V, Gutiérrez AM, Heinonen M, König E, Valros A, Junnikkala S. Salivary and serum haptoglobin, adenosine deaminase, and immunoglobulin G in growing pigs. *Porcine Health Manag*. 2024 May 21;10(1):21.
- [9] WenJie Yang a, Abdur Rahman Ansari b, XiaoYu Niu a, WeiHua Zou c, MengQi Lu a, Ling Dong a, Fan Li a, YanHong Chen a, KeLi Yang d, Interaction between gut microbiota dysbiosis and lung infection as gut-lung axis caused by *Streptococcus suis* in mouse model.
- [10] Intestinal Regeneration: Regulation by the Microenvironment. Author links open overlay panelJoris H. Hageman 1 2, Maria C. Heinz 1 2, Kai Kretzschmar 2 3 4, Jelte van der Vaart 2 3, Hans Clevers 2 3 5, Hugo J.G. Snippert 1 2.
- [11] Lung immune tone via gut-lung axis: gut-derived LPS and short-chain fatty acids' immunometabolic regulation of lung IL-1 β , FFAR2, and FFAR3 expressionnd.

- [12] Valentin Sencio, Marina Gomes Machado, François Trottein; The lung– gut axis during viral respiratory infections: the impact of gut dysbiosis on secondary disease outcomes.
- [13] Ma Y, Yang X, Chatterjee V, Wu MH, Yuan SY. The Gut-Lung Axis in Systemic Inflammation. Role of Mesenteric Lymph as a Conduit.
- [14] Changes in saliva biomarkers of stress and immunity in domestic pigs exposed to a psychosocial stressor.
- [15] Escribano D, Gutiérrez AM, Tecles F, Cerón JJ; Changes in saliva biomarkers of stress and immunity in domestic pigs exposed to a psychosocial stressor.

**X PREMIO SUPER FEED-VETIA
“MARIANO ILLERA MARTÍN”**

**EL USO DE CANNABINOIDES EN INVESTIGACIÓN
ENDOCRINOLÓGICA Y ONCOLÓGICA**

BELÉN CRESPO CORTÉS¹

RESUMEN

El cannabidiol (CBD) es una sustancia química de la planta *Cannabis sativa*. La acción de este compuesto se está investigado por su potencial terapéutico. En los últimos años, el consumo de CBD está aumentando exponencialmente. Se ha observado que el CBD reduce los niveles de cortisol y altera la ruta esteroidea, siendo de interés para estudios en endocrinología. Por otro lado, se está investigando el efecto del CBD en el campo de la oncología. Se han demostrado acciones proapoptóticas en el cáncer de mama, reduciendo el desarrollo tumoral. Estos estudios preliminares pretenden investigar los efectos del CBD a nivel endocrinológico en ratones. Además de estudiar el papel del CBD como posible agente terapéutico en el cáncer de mama inflamatorio triple negativo (CMI-TN). Nuestros estudios revelan que el consumo de CBD podría resultar en alteraciones endocrinológicas que se podrían relacionar con

¹ Estudiante de doctorado, facultad de Veterinaria, UCM.

posibles problemas reproductivos en machos. Por otro lado, el CBD ejerce un efecto apoptótico y ralentiza el crecimiento tumoral alterando los niveles de andrógenos circulantes, por lo que la administración de CBD podría ser beneficiosa para el tratamiento del CMI-TN. Estos estudios asientan una buena base para futuras investigaciones sobre los posibles efectos del CBD en el campo de la endocrinología y la oncología.

ABSTRACT

Cannabidiol (CBD) is a chemical from the *Cannabis sativa* plant. The action of this compound is being investigated for its therapeutic potential. In recent years, the consumption of CBD is increasing exponentially. It has been observed that CBD reduces cortisol levels and alters the steroid pathway, being of interest for studies in endocrinology. On the other hand, the effect of CBD is being investigated in the field of oncology. Proapoptotic actions have been demonstrated in breast cancer, reducing tumor development. These preliminary studies aim to investigate the effects of CBD at the endocrinological level in mice. In addition to studying the role of CBD as a possible therapeutic agent in inflammatory triple negative breast cancer (TN-IBC). Our studies reveal that CBD consumption could result in endocrinological alterations that could be related to possible reproductive problems in males. On the other hand, CBD exerts an apoptotic effect and slows tumor growth by altering circulating androgen levels, so CBD administration could be beneficial for the treatment of TN-MIBC. These studies lay a good foundation for future research on the possible effects of CBD in the field of endocrinology and oncology.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El CBD en la actualidad

La *Cannabis Sativa L.* (cannabis) es una planta que contiene cannabinoides (Crippa *et al.*, 2018). El principal compuesto del cannabis y, el más conocido, es el Δ -9-tetrahidrocannabinol (THC), el cual es el responsable de los principales efectos psicoactivos (Crippa *et al.*, 2018). Sin embargo, existe otro compuesto presente en el *Cannabis* que no induce efectos psicotóxicos, el cannabidiol (CBD) (Swenson *et al.*, 2023). En el año 2018, la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) eliminó el CBD de la lista de drogas y desde entonces ha sido el suplemento herbal más vendido en E.E.U.U. (Qian *et al.*, 2024).

En los últimos años, el consumo de CBD está aumentando exponencialmente y los informes indican que, aproximadamente el 90% de la población estadounidense, se automedica para patologías diagnosticadas como trastornos del sueño y enfermedades psiquiátricas como la ansiedad y el deterioro neurológico (Kaufmann *et al.*, 2023; Stella, 2023). Es tanta la popularidad que ha alcanzado el consumo del CBD en los últimos años, que se han realizado diferentes cruces de *Cannabis Sativa* para mejorar su genética, dando como resultado la planta de cáñamo, que produce altos niveles de CBD y bajos niveles de THC (Stella, 2023).

Desde 1985, el CBD se ha empleado para tratar las náuseas y los vómitos asociados con la quimioterapia (Nichols and Kaplan, 2020). Además, el CBD purificado fue aprobado y comercializado con el nombre de Epidiolex®, en 2018 en E.E.U.U. y la Unión Europea, para el tratamiento de convulsiones epilépticas y convulsiones relacionadas con la esclerosis tuberosa (Qian *et al.*, 2024). Además, otro compuesto aprobado en Canadá y la Unión Europea en el 2000, fue el Sativex®, que se emplea para el tratamiento de la esclerosis múltiple y el dolor oncológico intratable (Nichols and Kaplan, 2020).

Dada su popularidad, el CBD está comenzando a ser objeto de muchos estudios englobados en distintas disciplinas científicas. Por un lado, se ha investigado su potencial terapéutico, ya que se ha demostrado que protege contra la inflamación, la ansiedad, la adicción y la isquemia cerebral entre otros (Rock *et al.*, 2012; Britch *et al.*, 2021). Además, el consumo de esta sustancia se ha asociado con la mejora en el déficit de la atención, la hiperactividad, déficits de comunicación, déficits de interacción social y déficits cognitivos (Stella, 2023).

Los efectos psicoactivos de los cannabinoides están mediados por los receptores de cannabinoides 1 (CB1) y 2 (CB2) (Qian *et al.*, 2024). Aunque el CBD no se considera un componente psicotóxico, se puede unir al sitio alostérico del CB1 y modular la activación del mismo (Tham *et al.*, 2018). Es por ello que, al interferir en receptores cerebrales, existe cierta controversia acerca de si el CBD se considera, o no, una sustancia psicotrópica. Un estudio en humanos afirmó que, incluso a dosis altas de consumo el CBD, no causa efectos similares al THC (Devinsky *et al.*, 2016). En contraposición, otro estudio mostró que el CBD en dosis bajas y altas influye en los comportamientos humanos y, por tanto, el CBD debe considerarse psicoactivo, ya que mejora la memoria episódica verbal en consumidores jóvenes (Hotz *et al.*, 2021; Stella, 2023). Sin

embargo, cabe destacar que el CBD no presenta un cuadro de efectos secundarios graves. Las pruebas de la eficacia terapéutica del CBD en múltiples ensayos clínicos humanos informaron solo algunos efectos secundarios leves y transitorios como son la somnolencia, la disminución del apetito, diarrea y fatiga (Stella, 2023).

Otro de los escenarios con gran peso en el mundo de la investigación y la clínica es la influencia del CBD para el tratamiento contra el abuso de drogas, especialmente la adicción de opioides, ya que se ha visto que reduce la ansiedad. El CBD podría agregarse al régimen de desintoxicación estándar y mitigar los síntomas relacionados con la abstinencia de varias drogas de abuso, incluidos los opioides, los psicoestimulantes y el consumo de alcohol (González-Cuevas *et al.*, 2018; Calpe-López *et al.*, 2019; Stella, 2023).

1.2. El uso del CBD en medicina veterinaria

El CBD no solo empieza a cobrar relevancia en medicina humana, sino que está compartiendo protagonismo con el mundo animal. La mayoría de los resultados sobre el efecto del CBD en animales se encuentran a nivel experimental, donde se ha afirmado que en fases preclínicas el CBD es beneficioso para tratar patologías cardiovasculares, respiratorias, oncológicas y como atenuadores del dolor en ratones, ratas y cobayas. Sin embargo, los estudios en conejos, gatos y perros son limitados y su uso en la clínica es poco conocido (Landa *et al.*, 2016; Stella, 2023). Gamble y colaboradores emplearon el CBD para tratar la osteoartritis en perros, resultando en una disminución del dolor y una mayor actividad en los individuos tratados (Gamble *et al.*, 2018). Otro estudio reveló que el consumo de CBD redujo las convulsiones totales y la frecuencia de estas en perros con epilepsia idiopática (Rozental *et al.*, 2023). El CBD parece tener resultados prometedores en estudios experimentales, por lo que su uso en la clínica veterinaria podría ser de gran interés para tratar diversas patologías.

Otro de los campos para los que se está empleando el CBD en animales de compañía, sobre todo en perros, y que está dando buenos resultados, es el control de la ansiedad y el estrés (Kogan *et al.*, 2019). Incluso existen fitomedicamentos de CBD, como Klean-Vet®, que ya se comercializan para atenuar el estrés en perros y gatos (Klean-Vet, 2024). Numerosas empresas comercializan diferentes alimentos y cápsulas que contienen cannabinoides no psicoactivos como el CBD para su uso en

mascotas. Las ventas de productos procedentes del *Cannabis* desarrollados para mascotas han aumentado un 1000% en el 2017, destacando empresas como *Medical Marijuana Inc*, *Stony Hill Corp* o *Vet Online Supply Inc* como desarrolladoras de productos comestibles que contienen CBD para consumo animal, como suplemento para facilitar la relajación o como antiinflamatorios tópicos u orales (Kogan *et al.*, 2019).

1.3. La utilización del CBD en la endocrinología humana y animal

La endocrinología desempeña un papel fundamental tanto en la salud humana como animal, ya que el sistema endocrino está involucrado en la regulación del metabolismo, el crecimiento y desarrollo, la respuesta a estímulos externos y la reproducción, entre otras muchas acciones (Schiffer *et al.*, 2019). Es bien sabido que los cannabinoides psicoactivos, como el THC, influyen a nivel cerebral produciendo alteraciones en el eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal; además, también producen alteraciones en los niveles de prolactina, oxitocina, hormonas tiroideas y la hormona del crecimiento, entre otras (Hillard, 2019). Sin embargo, existe un gran desconocimiento sobre la influencia del CBD en la endocrinología, por lo que está siendo objeto de estudio en la actualidad. Se ha documentado que el consumo de CBD reduce los niveles de cortisol en perros y humanos frente a situaciones de estrés (Hurd *et al.*, 2019; Flint *et al.*, 2024).

Con respecto a la influencia del CBD en la producción de hormonas esteroideas y sus receptores, se ha demostrado que este compuesto es capaz de alterar la síntesis de la ruta esteroidea. Guard y colaboradores en 2022 demostraron que el CBD, en líneas celulares humanas, produce una alteración en la homeostasis celular del colesterol (Guard *et al.*, 2022). Además, los cannabinoides pueden inhibir la familia de enzimas CYP450 y reducir los niveles proteicos de la aromatasa, inhibiendo su actividad en la célula (Almada *et al.*, 2020; Amaral *et al.*, 2021; Almeida *et al.*, 2023). Por lo tanto, la acción del CBD está relacionada con la alteración en los niveles de estrógenos y andrógenos. Varios estudios en una línea celular de cáncer de mama han demostrado que el CBD podría emplearse como inhibidor de la aromatasa para mejorar el tratamiento del carcinoma mamario (Amaral *et al.*, 2021; Almeida *et al.*, 2023). Además, reduce los niveles proteicos del receptor de estrógenos alfa (RE α) y aumenta los del receptor de estrógenos beta (RE β) (Amaral *et al.*, 2021; Almeida *et al.*, 2023). Por otro lado, la influencia del CBD en la producción de andrógenos ha sido menos estudiada, sin embargo, se ha

documentado en testículos de rata que la administración de CBD redujo los niveles de testosterona (T) (Watanabe *et al.*, 2005).

1.4. Efectos del uso del CBD en el comportamiento

El aumento de productos que contienen CBD pone de relieve la importancia de realizar estudios para incrementar el conocimiento de los posibles efectos neurológicos del CBD, ya que pueden alterar el comportamiento de los individuos (Calapi *et al.*, 2022). Se ha observado que el CBD reduce la actividad neurotransmisora paliando los déficits sociales similares al autismo en un modelo experimental de ratón, es decir, mejora el comportamiento social en los individuos tratados con CBD (Kaplan *et al.*, 2017). Otro estudio corroboró que el CBD ejerce efecto en el comportamiento tras observar que, en ratas con conductas ansiosas, el consumo de CBD normalizaba la conducta social y disminuía la hiperactividad (Gururajan *et al.*, 2012).

Varios estudios han confirmado que el CBD puede reducir la ansiedad de forma eficaz. El CBD interacciona con el receptor de serotonina (5-HT), el cual media los efectos analgésicos y ansiolíticos, reduciendo así los síntomas de estrés y ansiedad (Gregorio *et al.*, 2019; Austrich-Olivares *et al.*, 2022).

En la actualidad, se está investigando el poder del CBD para reducir el síndrome de abstinencia en el proceso de dejar de fumar. La administración oral aguda de CBD disminuye la ingesta de nicotina en ratones y atenúa los efectos somáticos relacionados con la abstinencia de nicotina (Cheeks *et al.*, 2024).

1.5. El CBD en los procesos oncológicos

Además de los efectos del CBD sobre procesos neurológicos, endocrinos, y conductuales, la investigación también se está centrado en su posible uso terapéutico en patologías oncológicas. Una de las ventajas del CBD es que su consumo alivia los efectos secundarios relacionados con la quimioterapia (O'Brien, 2022; Almeida *et al.*, 2023). Además, se está investigando su posible efecto como tratamiento antitumoral. Se ha demostrado que el CBD presenta acciones proapoptóticas y antiproliferativas en muchos tipos de cáncer, que incluyen la detención del ciclo celular, la inhibición de la quimiotaxis, la migración y la angiogénesis, así como la capacidad de modulación del microambiente tumoral reduciendo la secreción de citocinas y disminuyendo el reclutamiento de

macrófagos (Velasco *et al.*, 2016; Green *et al.*, 2022; O'Brien *et al.*, 2022). Parte de la actividad antitumoral del CBD se realiza a través de la regulación de las especies reactivas de oxígeno (ROS), el estrés oxidativo y la modulación inmunológica (Grimaldi y Capasso, 2011; Green *et al.*, 2022).

Los cambios de expresión y activación de los receptores de cannabinoides y su capacidad para formar heterodímeros funcionales con otros receptores alteran el potencial tumorogénico y las propiedades de señalización de la célula (Sledzinski *et al.*, 2018; O'Brien, 2022). Sin embargo, la activación de los receptores de cannabinoides CB1 y CB2, puede alterar otras muchas vías de transducción de señales intracelulares como son las proteínas MAPK, ERK1/2, PI3K, AKT, mTOR, entre otras, las cuales también influyen en los procesos del desarrollo tumoral (O'Brien, 2022; Plessis *et al.*, 2024).

Se ha observado que los receptores de cannabinoides se encuentran expresados en una amplia variedad de células, tanto en células normales como en células tumorales, encontrándose poco expresados en el adenocarcinoma de pulmón, en el carcinoma de tiroides, en el carcinoma invasivo de mama y en el cáncer de endometrio; en contraposición, se ha visto sobreexpresado en el colangiocarcinoma, el cáncer de mama receptor de hormonas positivo y en los gliomas (Moreno *et al.*, 2020; O'Brien, 2022). Específicamente, se ha descubierto que el CBD induce la muerte celular programada en las células de cáncer de mama sin necesidad de involucrar a los receptores de cannabinoides (Almeida *et al.*, 2022).

En el cáncer de mama, los estrógenos juegan un papel crucial en el desarrollo tumoral. En particular, el 17β -estradiol (E2) se une al RE α y RE β para mediar la transcripción de genes diana, que regulan la progresión tumoral (Kisková *et al.*, 2019). Otro receptor estrogénico menos conocido es el GPER o GPR30, el cual media los efectos celulares rápidos de los estrógenos (Hsu *et al.*, 2019). En el subtipo de cáncer de mama triple negativo (CMTN), los estrógenos podrían promover la progresión del cáncer de mama por la activación de GPER a través de vías de señalización MAPK y PI3K. Estas vías también se ven afectadas por la administración de CBD como se ha mencionado anteriormente, por lo que, el tratamiento con CBD podría influir en el desarrollo del CMTN (Kisková *et al.*, 2019; Dobovisek *et al.*, 2020).

Algunos estudios en líneas celulares de CMTN, muestran los beneficios de la administración del CBD para la ralentización de la

progresión tumoral. En células MDA-MB-231, una línea celular de CMTN, el CBD indujo la apoptosis a través de la activación directa e indirecta de los receptores CB2 (Caffarel *et al.*, 2012). En tumores de mama triple negativos, en general, se observan niveles elevados de CB2, lo que se relaciona con una mayor agresividad tumoral. Para tratar estos subtipos tumorales, diseñar compuestos dirigidos a vías asociadas con el CBD podría ser una opción de tratamiento prometedora (Kisková *et al.*, 2019).

En definitiva, como se ha mencionado en apartados anteriores, el CBD está involucrado en la alteración endocrinológica y, por lo tanto, su uso terapéutico podría obtener resultados beneficiosos (Almeida *et al.*, 2023).

Visto el papel del CBD en los distintos aspectos fisiológicos como son el comportamiento, la endocrinología e incluso en la oncología, este trabajo pretende explorar los efectos del CBD a nivel comportamental y endocrinológico en ratones sin patologías previas. Además, de estudiar el papel del CBD como posible agente terapéutico en el cáncer de mama inflamatorio triple negativo (CMI-TN). Para ello, se realizaron dos estudios: el primero fue un estudio preliminar sobre el impacto del consumo de CBD en la variación del peso corporal, el comportamiento, la endocrinología y la posible adicción generada por el CBD en ratones macho Balb/SCID sin patologías previas. El segundo fue un estudio experimental en ratones hembra Balb/SCID sobre la influencia de la administración del CBD en el CMI-TN a nivel de proliferación celular y crecimiento tumoral con el fin de evaluar si el CBD pudiera tener beneficios terapéuticos, ya que no se ha estudiado hasta la fecha los posibles beneficios de este compuesto en el CMI-TN.

2. ESTUDIO EXPERIMENTAL 1: EFECTOS DEL CBD EN EL COMPORTAMIENTO Y LA ENDOCRINOLOGÍA EN RATONES BALB/SCID

Este estudio tuvo como objetivo la evaluación de las posibles alteraciones comportamentales y endocrinológicas, la variación del peso corporal, y la posible adicción generada por el consumo de CBD en ratones macho Balb/SCID sin patologías previas; con el fin de comprender mejor los posibles efectos que puede generar el CBD cuando se consume sin prescripción médica.

Se realizó un estudio preliminar sobre el efecto del consumo diario de CBD (MMGenetics Innovation Ltd.) a dosis bajas, durante 12

semanas en 16 ratones macho Balb/SCID de 10 semanas de edad sin patologías previas. Los ratones se dividieron en dos grupos de seis y diez animales por grupo; control (agua de bebida sin CBD) y CBD (20 mg/kg/día diluido en agua de bebida), respectivamente.

Los ratones se alojaron individualmente en jaulas de policarbonato en condiciones controladas en un animalario especializado. Todos los ratones fueron alimentados con pellets de laboratorio y agua *ad libitum*. El tamaño muestral requerido para la comparación simultánea de las medias normales de los dos grupos (control y experimental), se determinó empleando el módulo del tamaño muestral del paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI. La selección de la dosis de CBD se determinó en base a la literatura (Brown and Winterstein, 2019; Austrich-Olivares *et al.*, 2022). El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Complutense de Madrid, España, aprobó los protocolos experimentales para este estudio (número: Proex 176/19). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Semanalmente se renovaba el agua de bebida para garantizar el buen estado de la dilución de CBD y se recogían parámetros relacionados con el comportamiento (muerde/no muerde, chilla/no chilla, salta/ no salta durante el manejo), el peso corporal y el consumo de agua en todos los ratones. Tras 12 semanas de experimento, se extrajo sangre por punción intracardiaca bajo anestesia con isoflurano al 4%, previo al sacrificio del animal.

Se midió la concentración de T, corticosterona (CT) y E2 en suero realizando un inmunoensayo enzimático (EIA) de amplificación validado previamente (Cáceres *et al.*, 2016). Las concentraciones hormonales se expresaron en ng/ml.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software IBM SPSS Statistics 28.0. Los resultados se expresaron como las medias $\pm$ desviación estándar (DE). Para el peso corporal, el consumo de agua y las concentraciones hormonales se realizó un test T de Student con el fin de estudiar las diferencias significativas entre el grupo control y el grupo al que se le administró el CBD. Los parámetros cualitativos que se analizaron mediante un análisis de regresión de Pearson. Se consideraron diferencias significativas p-valores menores de 0,05 ($p < 0.05$).

2.1. La adición de CBD produce una tendencia a ralentizar la ganancia de peso corporal y aumenta el consumo de agua

El peso corporal entre los ratones control y los administrados con CBD no varió significativamente a lo largo de las semanas (Figura 1A).

Al inicio del experimento los ratones pesaron $20,25 \pm 1,5$ g, alcanzando un peso de $27,3 \pm 1,21$ g en el grupo control y $26,3 \pm 1,64$ g en el grupo experimental. No obstante, cabe destacar que el grupo control presentó una ligera tendencia al incremento de peso corporal con respecto al grupo tratado con CBD.

Por otro lado, los ratones tratados con CBD tendieron a consumir más agua que el grupo control (Figura 1B). A partir de la semana seis de experimentación, se puede apreciar una tendencia de mayor consumo de agua en los ratones a los que se les administra CBD, obteniendo diferencias significativas con respecto al grupo control ($p < 0.05$) en la semana diez y once del experimento. Aunque en la última semana, el consumo de agua entre el grupo control y experimental fue muy similar.

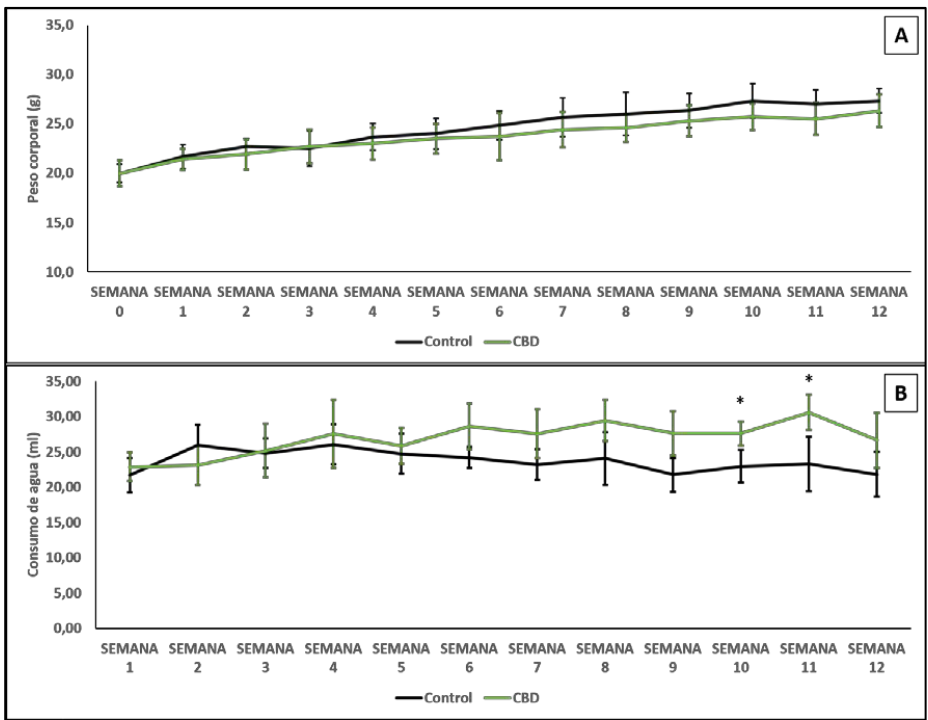


FIGURA 1. Media del peso corporal en gramos (g) (A) y consumo de agua (ml) (B) semanalmente entre el grupo control y el grupo experimental tratado con CBD $\pm$ DE. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el grupo control y experimental se indicaron con un asterisco (*).

Nuestros resultados mostraron que el consumo de CBD estaba relacionado con una tendencia a ralentizar la ganancia de peso corporal en

los ratones Balb/SCID con respecto a los ratones control. Estos resultados concuerdan con el estudio de Ignatowska-Jankowska y colaboradores (2011) que encontraron una asociación entre el consumo de CBD en ratas obesas y la disminución del peso corporal (Ignatowska-Jankowska *et al.*, 2011). El CBD reduce la actividad del receptor CB2 en el hipotálamo, regulando el control de la ingesta de alimentos; además, reduce la proliferación de los adipocitos en el tejido adiposo, favoreciendo la pérdida de peso (Galaj *et al.*, 2021). Por otro lado, varios estudios han confirmado que el CBD es un buen aliado para tratar enfermedades relacionadas con la adicción de drogas (Prud'homme *et al.*, 2015; Gasparyan *et al.*, 2021). No obstante, no se ha estudiado si el CBD, por sus características atenuadoras del dolor y el estrés, podría generar adicción en los consumidores. Nuestro estudio reveló que los ratones que consumieron CBD incrementaron significativamente el consumo de agua con respecto al control en las últimas semanas del experimento. Sin embargo, no se puede concluir con exactitud si el mayor consumo se debía a una posible adicción por el CBD o a otros factores que podrían estar interfiriendo en los resultados. Una mayor actividad de los ratones experimentales podría incrementar la necesidad de hidratación, o la afinidad por la palatabilidad del aceite de CBD podría resultar en un incremento del consumo de agua sin crear dependencia. Sería necesario realizar ensayos adicionales y aumentar el tiempo de experimentación para poder corroborar con certeza a qué se debe el consumo de agua elevado con respecto al control.

2.2. El consumo de CBD influye en el comportamiento de los individuos

La evaluación del comportamiento se realizó de manera observacional, midiendo los parámetros: Muerde/no muerde (Figura 2A), chilla/no chilla (Figura 2B) y salta/no salta (Figura 2C) durante el manejo. Previo al comienzo del tratamiento (semana 0), se evaluó el comportamiento de los individuos. Se pudo observar que los ratones presentaban un comportamiento activo al inicio del experimento debido al proceso de adaptación del manejo; sin embargo, una vez acostumbrados los ratones se encuentran, por lo general, tranquilos ante la presencia del humano. No obstante, aunque no se obtuvieron diferencias significativas, se pudo observar una tendencia de los ratones administrados con CBD de mayor agresividad, ya que aproximadamente el 30% de los individuos a partir de la semana siete del experimento comenzaron a lanzarse a morder cuando se introducía la mano en la jaula (Figura 2A). Sin embargo, ninguno de los individuos del experimento saltó o chilló en las últimas semanas del experimento (Figura 2B-C).

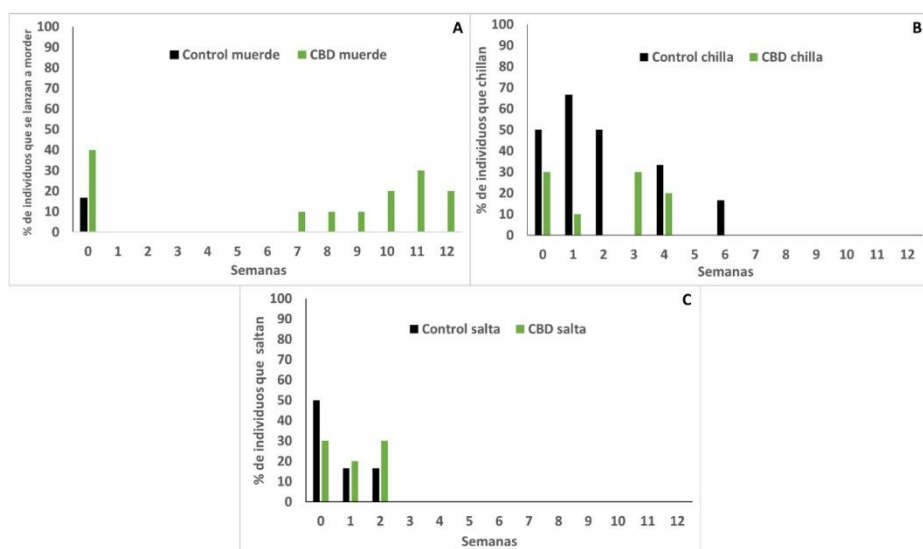


FIGURA 2. Número total de individuos control (negro) y experimental (verde) que se lanzaron a morder o no al introducir la mano en la jaula (A), que chillaron al introducir la mano en la jaula (B) y que intentaron saltar fuera de la jaula al introducir la mano (C), medidos semanalmente.

En la actualidad, no existen estudios sobre el consumo del CBD y el comportamiento, aunque se ha visto que el CBD puede actuar como antipsicótico en esquizofrenia y trastornos de la personalidad, se desconoce su efecto en las conductas comportamentales de individuos sin patologías (Schouten *et al.*, 2023). Nuestros resultados mostraron que los ratones que consumieron CBD durante las 12 semanas de experimentación, presentaron una tendencia a lanzarse a morder en el momento de manejo. Además, dentro de la jaula se presentaron más activos que el grupo control.

2.3. El CBD reduce los niveles de testosterona circulante.

Se midieron los niveles de T, CT y E2 de los ratones control y tratados con CBD con el fin de determinar si existían alteraciones a nivel endocrino. Los niveles hormonales de T y CT se vieron ligeramente alterados con la administración de CBD, aunque sin diferencias significativas con respecto al control (Figura 3). Los niveles de T disminuyeron con el consumo de CBD, mientras que los niveles de CT se vieron ligeramente aumentados. Por último, los niveles de E2 en suero en los ratones experimentales fueron similares al grupo control.

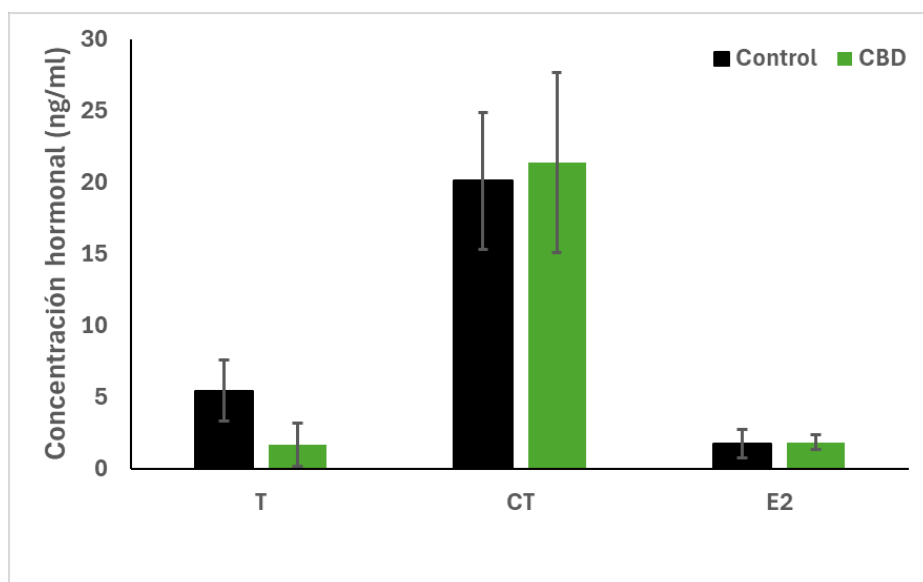


FIGURA 3. Media de concentración hormonal en suero (ng/ml) de los ratones control (negro) y el grupo experimental con CBD (verde) de testosterona (T), corticosterona (CT) y 17 β -estradiol (E2) a las doce semanas $\pm$ DE.

Según estudios, el CBD produce un desequilibrio en la homeostasis del colesterol, reduce la transcripción genética de la enzima CYP450, e influye en los niveles de estrógenos al reducir los niveles proteicos de la aromatasa (Almada *et al.*, 2020; Amaral *et al.*, 2021; Guard *et al.*, 2022). En cuanto a los niveles de E2 en los ratones tratados, estos fueron similares a los de los ratones control. Por lo que el CBD no parece afectar a los niveles de estrógenos como explican otros autores (Kisková *et al.*, 2019; Almeida *et al.*, 2023; Flint *et al.*, 2024).

Sin embargo, Watanabe y colaboradores (2005), documentaron una reducción de los niveles de T en testículos de ratas suministradas con CBD (Watanabe *et al.*, 2005). Niveles reducidos de T en plasma se han relacionado con la disfunción reproductiva en machos (Jin *et al.*, 2022). Nuestros resultados avalan que el CBD muestra una tendencia a reducir los niveles de T tal y como exponen otros autores (Watanabe *et al.*, 2005). Por lo que la disminución de los niveles de T producida por el consumo de CBD podría desencadenar en problemas reproductivos.

Por otro lado, altos niveles de CT en roedores están asociados al estrés (Vanderhoof *et al.*, 2024). Los niveles de CT fueron medidos al final del experimento, cuando los ratones ya estaban acostumbrados al

manejo, es por esto que posiblemente no se han encontrado diferencias significativas entre el grupo control y el grupo experimental.

Los resultados de este estudio preliminar revelan que el consumo de CBD puede alterar la endocrinología resultando en problemas reproductivos. Además, este compuesto influye en el comportamiento, aumentando la actividad y la tendencia a morder en los ratones. Por ello, sería interesante completar este el estudio con diversos análisis endocrinos relacionados con el comportamiento como son la dopamina, la oxitocina y la serotonina, que influyen en la sensación de satisfacción (Froemke and Young, 2021). Además, los niveles de estas hormonas también podrían darnos una visión más clara de si el aumento del consumo de agua con CBD se podría deber a la adicción generada por un aumento en los niveles de dopamina (Wise and Jordan, 2021).

3. ESTUDIO EXPERIMENTAL 2: EFECTO DEL CBD EN EL CÁNCER DE MAMA INFLAMATORIO TRIPLE NEGATIVO

Este segundo estudio tuvo como objetivo evaluar si la administración de CBD causaba efectos antiproliferativos en células de cáncer de mama inflamatorio triple negativo (CMI-TN) tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que el efecto de este compuesto no ha sido evaluado hasta la fecha en este subtipo tumoral.

Se emplearon dos líneas celulares de CMI-TN: IPC-366 y SUM149. Ambas líneas han sido objeto de estudio por sus homologías clínicas, biológicas, patológicas y moleculares (Uva *et al.*, 2009; Cáceres *et al.*, 2016; Raposo *et al.*, 2017; Alonso-Díez *et al.*, 2021). Ambas líneas celulares se cultivaron en un medio suplementado con una mezcla de nutrientes y se mantuvieron en estufa a 37°C y en una atmósfera humidificada con 5% de dióxido de carbono. Las células se observaban diariamente para determinar el crecimiento y la viabilidad celular.

El CBD puro se diluyó en dimetil sulfóxido (DMSO) hasta conseguir una concentración de 10mM y posteriormente se almacenó a 4 °C hasta su uso.

Se realizaron ensayos de sensibilidad para determinar si IPC-366 y SUM149 se veían afectadas por la adición de CBD. Para ello, se sembraron 103 células/pocillo en placas de poliestireno de 96 pocillos. Posteriormente, se añadieron a las células diluciones seriadas de CBD (partiendo de una dosis de $6,4 \times 10^{-10}$ M hasta una dosis de 10^{-5} M) y se incubaron en estufa durante 72 h.

Transcurrido este tiempo, se añadió bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT) a todos los pocillos. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 568 nm con un lector de placas automático, y los resultados se procesaron con el software GraphPad Prism 6.01, obteniendo un valor de concentración efectiva media (CE-50) para cada línea celular.

Además, se realizaron ensayos de viabilidad celular para evaluar el efecto del CBD en la proliferación celular *in vitro*. Para ello, se sembraron 104 células/pocillo en placas de poliestireno de 96 pocillos en medio de cultivo que contenía 0 μ M, 1 μ M, 10 μ M y 100 μ M de CBD. Las células se cultivaron durante 24 h y posteriormente, se añadió MTT y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 568 nm con un lector de placas automático.

Por otro lado, se realizaron ensayos de crecimiento tumoral *in vivo*. 20 ratones Balb/SCID hembra de 6-8 semanas de edad se alojaron en las mismas condiciones ambientales que los ratones empleados en el ensayo experimental 1. A estos ratones se les inoculó una suspensión de 10⁶ células de IPC-366 (n = 10 ratones) y de SUM149 (n = 10 ratones) diluidas en PBS entre la cuarta y quinta mama (“mammary fat pad”). Una vez que el tumor comenzaba a ser palpable, los tumores se midieron cada dos días con un calibrador y el volumen del tumor se calculó mediante: $\text{volumen} = ((\text{largo}) \times (\text{ancho})^2)/2$. En cuanto los tumores alcanzaban un volumen de 100 mm³, los ratones se dividieron de forma aleatoria en dos grupos por cada línea celular: Grupo control inoculados con solución salina (n = 5 ratones/grupo) y grupo experimental al que se le administró intraperitonealmente CBD a una concentración de 1mg/kg (n = 5 ratones/grupo) (Eeswara, *et al.*, 2023). El tratamiento se llevó a cabo en días alternos durante dos semanas. El tamaño de la muestra se determinó mediante el paquete estadístico Statgraphics Centurion versión XVI. El Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad Complutense de Madrid, España, aprobó los protocolos experimentales para este estudio (número: Proex 176/19).

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Al final del tratamiento, los animales fueron sacrificados mediante una dosis letal de anestésico, previo al sacrificio, los animales fueron anestesiados con isoflurano al 4%, y se procedió a la extracción de sangre por punción intracardiaca. En la necropsia, se extirpó el tumor que fue conservado a -20°C

para posteriores estudios. Los tumores recolectados fueron homogeneizados en PBS y se emplearon para medir concentraciones hormonales.

Se midieron las concentraciones hormonales de T y dihidrotestosterona (DHT) tanto en los sueros como en los homogeneizados tumorales, mediante un EIA competitivo previamente validado para la especie (Cáceres *et al.*, 2016).

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el software IBM SPSS Statistics 28.0. Los resultados se expresaron como las medias $\pm$ DE. Para el ensayo de viabilidad celular se realizó un análisis de varianza (ANOVA) unidireccional. Para el crecimiento tumoral, las determinaciones de hormonas en suero y homogeneizado tumoral se realizó una prueba U de Mann-Whitney. Se consideraron diferencias significativas p-valores menores de 0,05 ($p < 0.05$).

3.1. Las líneas celulares de CMI-TN son sensibles al CBD

Los resultados mostraron que las líneas celulares de CMI-TN fueron sensibles al CBD. Aunque ambas líneas celulares mostraron un rango de sensibilidad parecido, IPC-366 (Figura 4A) resultó ser ligeramente menos sensible que SUM149 (Figura 4B).

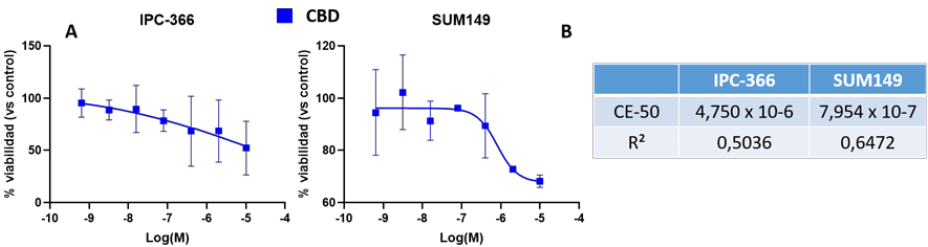


FIGURA 4. Resultados de sensibilidad celular del CBD en IPC-366 (A) y SUM149 (B). Los resultados están expresados gráficamente con el porcentaje de viabilidad celular $\pm$ DE en función del logaritmo de la molaridad (log(M)). Además, se indica la CE-50 y el R² en la tabla.

Según diversos estudios, las líneas celulares de CMTN son sensibles al CBD a partir de concentraciones entre 1 μ M y 10 μ M (Shrivastava *et al.*, 2011; Seltzer *et al.*, 2020). Curiosamente, nuestros resultados muestran que las líneas de CMI- TN también son sensibles al CBD dentro de los mismos rangos de concentración. Por lo que la adición del CBD en el carcinoma inflamatorio podría resultar en un efecto beneficioso.

3.2. El CBD reduce la viabilidad celular en las líneas celulares del CMI-TN

Los resultados de viabilidad celular muestran que el CBD a dosis de 100 μ M reduce significativamente la viabilidad celular tanto en IPC-366 como en SUM149 (Figura 5). Todas las dosis de CBD empleadas redujeron significativamente la viabilidad celular en SUM149 (Figura 5B), presentando una mayor sensibilidad a la adición de CBD que IPC-366 (Figura 5A).

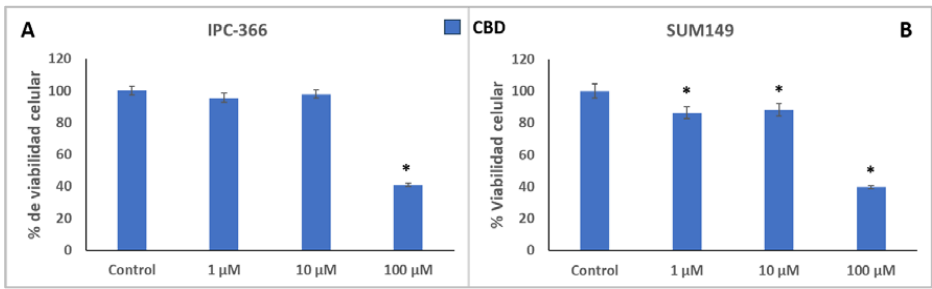


FIGURA 5. Resultados de viabilidad celular. En el gráfico se representa el porcentaje de viabilidad celular $\pm$ DE con respecto a las distintas dosis de CBD en IPC-366 (A) y SUM149 (B).

Los efectos anti-cancerígenos del CBD son dosis-dependientes en el cáncer de mama, es decir, a dosis más altas, los efectos de este componente son mayores (Nahler, 2022). Se ha observado que el CBD induce la apoptosis en las líneas celulares de CMTN por múltiples vías como son la autofagia, la detención del ciclo celular o la apoptosis (Caffarel *et al.*, 2012; Seltzer *et al.*, 2020). Nuestros resultados muestran que el CBD en la línea celular humana, SUM149, también es dosis-dependiente, ya que, a dosis más altas de este compuesto, se ha observado una mayor reducción de la viabilidad celular. No obstante, el CBD a dosis altas induce la apoptosis en ambas líneas celulares, por lo que la administración de CBD podría ser útil para favorecer la apoptosis en el CMI-TN tanto canino como humano.

3.3. La administración de CBD muestra una tendencia a ralentizar el crecimiento tumoral en el CMI-TN

Los ratones xenoinjertados con IPC-366, a los que se les inoculó CBD intraperitonealmente, mostraron una tendencia a la ralentización del crecimiento tumoral desde el día diez hasta el final del experimento

(Figura 6A). Sin embargo, en el caso de los xenoinjertados con SUM149, solamente al final del tratamiento se observó un menor tamaño tumoral con la administración de CBD (Figura 6B). En ambos grupos el CBD produce una ralentización del crecimiento tumoral, aunque sin diferencias significativas con respecto a los ratones control (Figura 6).

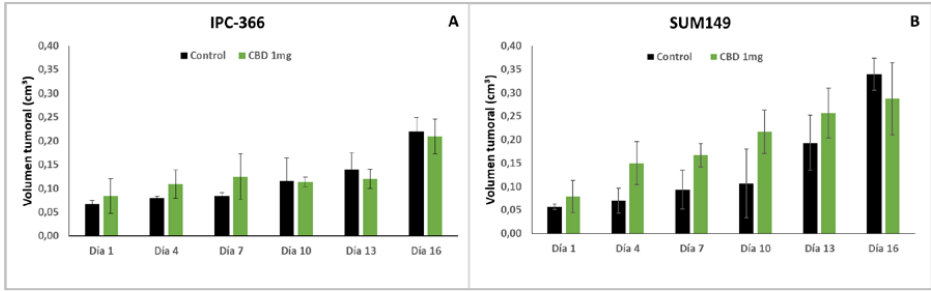


FIGURA 6. Crecimiento tumoral representado como media del volumen tumoral (cm³) cada tres días durante dos semanas de los ratones xenoinjertados con IPC-366 (A) y SUM149 (B) control sin CBD y los ratones experimentales con CBD a 1 mg $\pm$ DE.

Aunque *in vitro* los resultados del CBD parecen ser prometedores, *in vivo* no se observó una reducción de la progresión tumoral. Existen escasos estudios sobre la farmacocinética, la absorción y la biodisponibilidad del CBD dependiendo de las pautas de administración (Schaiquevich *et al.*, 2020; Sholler *et al.*, 2021; O’Sullivan *et al.*, 2024). El CMI-TN se caracteriza por ser altamente agresivo y de rápido crecimiento (Crespo *et al.*, 2024). Es por ello que, el efecto del CBD en este subtipo tumoral, por la vía de administración y la dosis empleada, podría ser limitado.

Sin embargo, como se mostrará en el siguiente apartado, el CBD produjo un aumento de los niveles de andrógenos circulantes. Estudios anteriores han dilucidado que, un aumento de los niveles de andrógenos *in vivo* se relaciona con una ralentización del crecimiento tumoral y una menor tendencia a generar metástasis en tumores de CMI-TN tanto canino como humano (Cáceres *et al.*, 2018; Crespo *et al.*, 2024). Es por ello que, el CBD podría potenciar la ralentización del crecimiento tumoral si se administra junto a un agente anti- hormonal.

3.4. El CBD produce un aumento en los niveles de andrógenos *in vivo*

Tras observar que el efecto del CBD *in vivo* fue ligeramente mayor en la línea celular IPC-366, que en SUM149, se estudió la concentración

de andrógenos en suero y homogeneizado tumoral en la línea celular canina. Los niveles de andrógenos: T y DHT, aumentaron tanto en suero como en el homogeneizado tumoral con la administración de CBD (Figura 7A-D), aunque sin diferencias significativas del grupo tratado con respecto al grupo control.

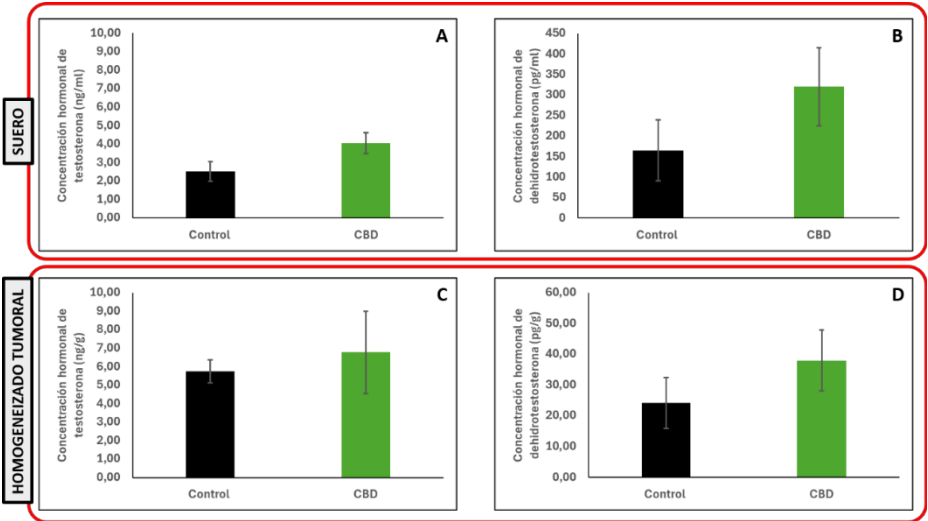


FIGURA 7. Media de la concentración hormonal de T (ng/ml) (A) y DHT (pg/ml) (B) en suero, y T (ng/g) (C) y DHT (pg/g) (D) en homogeneizado tumoral de los ratones xenotrasplantados con IPC-366.

Según estudios previos en el CMI-TN, el aumento de los niveles de andrógenos, tanto en suero como intratumoralmente, se ha relacionado con una ralentización del crecimiento tumoral y una menor probabilidad de metástasis (Caceres *et al.*, 2018). Nuestros resultados están en consonancia con estos últimos hallazgos, ya que la administración de CBD produjo un aumento de los niveles de andrógenos, junto con una tendencia a ralentizar el crecimiento tumoral. Por lo que la coadministración de CBD con un agente terapéutico anti-hormonal, que se está probando en la actualidad como posible tratamiento para el CMI-TN (Cáceres *et al.*, 2018; Crespo *et al.*, 2023; Crespo *et al.*, 2024), podría potenciar la reducción del crecimiento tumoral en este subtipo de cáncer de mama. Por otro lado, sería de interés completar este estudio *in vivo* con los niveles hormonales de estrógenos, con el fin de determinar el efecto endocrinológico completo del CBD en el CMI-TN.

4. CONCLUSIONES

La investigación sobre los efectos del CBD en la endocrinología, el comportamiento y la terapia de diferentes patologías, incluyendo las oncológicas, está en auge debido al incremento de su consumo en los últimos años. Además, este campo de investigación no se centra solo en el ser humano, si no que se ha probado su beneficio en patologías animales obteniendo buenos resultados. Sin embargo, el estudio de los efectos del CBD en individuos sin patologías previas sigue siendo un campo bastante desconocido. Nuestros estudios revelan que el consumo de CBD en este grupo podría resultar en alteraciones endocrinológicas que podrían desencadenar problemas reproductivos en machos. Además, el consumo de CBD parece influir ligeramente en el comportamiento, aunque son necesarios más estudios para clarificar este aspecto.

Por otro lado, la adición del CBD podría ser de gran interés para el tratamiento del CMI-TN humano y canino. Nuestros resultados avalan el efecto apoptótico *in vitro* del CBD en este subtipo tumoral. Además, la administración de este compuesto produce alteraciones en los niveles de andrógenos que se han relacionado con una ralentización del crecimiento tumoral. Por lo que la administración de CBD junto con compuestos anti-hormonales podría potenciar la reducción del crecimiento tumoral en el CMI-TN. Pensamos que los resultados obtenidos en este trabajo asientan una buena base para futuras investigaciones sobre los posibles efectos del CBD en el campo de la oncología.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Almada, M; Amaral, C; Oliveira, A; Fernandes, PA; Ramos, MJ; Fonseca, BM; Correia-da-silva, G; Texeira, N. Cannabidiol (CBD) but not tetrahydrocannabinol (THC) dysregulate in vitro decidualization of human endometrial stromal cells by disruption of estrogen signaling. *Rep Toxicology*. 2020. 93(2020):75-82. DOI: 10.1016/j.reprotox.2020.01.003.
- [2] Almeida, CF; Teixeira, N; Correia-da-Silva, G; Amaral, C. Cannabinoids in Breast Cancer: Differential Susceptibility According to Subtype. *Molecules*. 2022. 27(1):156. DOI: 10.3390/molecules27010156.
- [3] Almeida, CF; Teixeira, N; Valente, MJ; Vinggaard, AM; Correia-da-Silva, G; Amaral, C. Cannabidiol as a Promising Adjuvant

- Therapy for Estrogen Receptor-Positive Breast Tumors: Unveiling Its Benefits with Aromatase Inhibitors. *Cancers (Basel)*. 2023. 15 (9):2517. DOI: 10.3390/cancers15092517.
- [4] Alonso-Díez, A; Cáceres, S; Peña, L; Crespo, B; Illera, JC. Anti-Angiogenic Treatments Interact with Steroid Secretion in Inflammatory Breast Cancer Triple Negative Cell Lines. *Cancers*. 13(15): 3668. DOI: 10.3390/cancers13153668.
 - [5] Amaral, C; Trouille, FM; Almeida, CF; Correia-da-Silva, G; Teixeira, N. Unveiling the mechanism of action behind the anti-cancer properties of cannabinoids in ER+ breast cancer cells: Impact on aromatase and steroid receptors. *J Steroid Bio Mol Biol*. 2021. 210 (2021):105876. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2021.105876.
 - [6] Austrich-Olivares, A; García-Gutiérrez, MS; Illescas, L; Gasparyan, A; Manzanares, J. Cannabinoid CB1 Receptor Involvement in the Actions of CBD on Anxiety and Coping Behaviors in Mice. *Pharmaceuticall (Basel)*. 2022. 15(4):473. DOI: 10.3390/ph15040473.
 - [7] Britch, SC; Babalonis, S; Walsh, SL. Cannabidiol: Pharmacology and Therapeutic Targets. *Psychopharmacology (Berl)*. 2021. 238 (1): 9-28. DOI: [10.1007/s00213-020-05712-8](https://doi.org/10.1007/s00213-020-05712-8).
 - [8] Brown, JD and Winterstein, AG. Potential Adverse Drug Events and Drug–Drug Interactions with Medical and Consumer Cannabidiol (CBD) Use. *J Clin Med*. 2019. 8(7):989. DOI: 10.3390/jcm8070989.
 - [9] Cáceres, S; Peña, L; Silván, G; Illera, MJ; Woodward, WA; Reuben, JM; Illera, JC. Steroid Tumor Environment in Male and Female Mice Model of Canine and Human Inflammatory Breast Cancer. *BioMed Res Int*. 2016. 2016:8909878. DOI: 10.1155/2016/8909878.
 - [10] Cáceres, S; Monsalve, B; Peña, L; de Andres, PJ; Alonso-Díez, A; Illera, MJ; Woodward, WA; Reuben, JM; Silvan, G; Illera, JC. In vitro and in vivo effect of flutamide on steroid hormone secretion in canine and human inflammatory breast cancer cell lines. *Vet Comp Oncol*. 2018. 16(1):148-158. DOI: 10.1111/vco.12324.

- [11] Caffarel, MM; Andradas, C; Pérez-Gómez, E; Guzmán, M; Sánchez, C. Cannabinoids: A new hope for breast cancer therapy? *Cancer Treat Rev.* 2012. 38(7):911-918. DOI: 10.1016/j.ctrv.2012.06.005.
- [12] Calapi, F; Cardia, L; Calapi, G; Mauro, DD; Trimarchi, F; Ammendolia, I; Mannucci, C. Effects of Cannabidiol on Locomotor Activity. *Life (Basel).* 2022. 12(5):652. DOI: 10.3390/life12050652.
- [13] Calpe-López, C; García-Pardo, MP; Aguilar, MA. Cannabidiol Treatment Might Promote Resilience to Cocaine and Methamphetamine Use Disorders: A Review of Possible Mechanisms. *Molecules.* 2019. 24(14):2583. DOI: 10.3390/molecules24142583.
- [14] Cheeks, SN; Buzzi, B; Valdez, A; Mogul, AS; Damaj, MI; Fowler, CD. Cannabidiol as a potential cessation therapeutic: Effects on intravenous nicotine self-administration and withdrawal symptoms in mice. *Neuropharmacology.* 2024. 15(246):109833. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2023.109833.
- [15] Crespo, B; Cáceres, S; Silván, G; Illera, MJ; Illera, JC. The inhibition of steroid hormones determines the fate of IPC-366 tumor cells, highlighting the crucial role of androgen production in tumor processes. *Res Vet Sci.* 2023. 161:1-14. DOI: 10.1016/j.rvsc.2023.05.014.
- [16] Crespo, B; Illera, JC; Silván, G; López-Plaza, P; Herrera de la Muela, M; Puente Yagüe, M; Díaz del Arco, C; de Andrés, PJ; Illera, MJ; Cáceres, S. Bicalutamide Enhances Conventional Chemotherapy in *In Vitro* and *In Vivo* Assays Using Human and Canine Inflammatory Mammary Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci.* 2024. 25(14):7923. DOI: 10.3390/ijms25147923.
- [17] Crippa, JA; Guimaraes, FS; Campos, AC; Zuardi, AW. Translational Investigation of the Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD): Toward a New Age. *Front Immunol.* 2018. 9: 2009. DOI: [10.3389/fimmu.2018.02009](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02009).
- [18] Devinsky, O; Marsh, E; Friedman, D; Thiele, E; Laux, L; Sullivan, J; Miller, I; Flamini, R; Wilfong, A; Filoux, F; Wong, M; Tilton, N; Bruno, P; Bluvstein, J; Hedlund, J; Kamens, R; Maclean, J; Nangia, S; Singhal, NS; Wilson, CA; Patel, A; Cilio MR. Cannabidiol in

- patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. *The Lancet*. 15(3):270-278. DOI: 10.1016/S1474-4422(15)00379-8.
- [19] Dobovisek, L; Krstanovic, F; Borstnar, S; Debeljak, N. Cannabinoids and Hormone Receptor-Positive Breast Cancer Treatment. 2020. *Cancers (Basel)*. 12(3):525. DOI: 10.3390/cancers12030525.
 - [20] Eeswara, A; Pacheco-Spiewak, A; Jergova, S; Sagen, J. Combined non- psychoactive Cannabis components cannabidiol and β -caryophyllene reduce chronic pain via CB1 interaction in a rat spinal cord injury model. *PLoS One*. 2023. 18(3):e0282920. DOI: 10.1371/journal.pone.0282920.
 - [21] Flint, HE; Hunt, ABG; Logan, DW; King, T. Daily dosing of cannabidiol (CBD) demonstrates a positive effect on measures of stress in dogs during repeated exposure to car travel. *J Anim Sci*. 2024. 102:skad414. DOI: 10.1093/jas/skad414.
 - [22] Froemke, R; Young, LJ. Oxytocin, Neural Plasticity, and Social Behavior. *Annu Rev Neurosci*. 2021. 44:359-381. DOI: 10.1146/annurev-neuro-102320-102847.
 - [23] Galaj, E; Bi, G-H; Yang, H-J; Xi, Z-X. Cannabidiol attenuates the rewarding effects of cocaine in rats by CB2, 5-HT1A and TRPV1 receptor mechanisms. *Neuropharmacology*. 2021. 167; 107740. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2019.107740.
 - [24] Gamble, L-J; Boesch, JM; Frye, CW; Schwark, WS; Mann, S; Wolfe, L; Brown, H; Berthelsen, ES; Wakshlag, JJ. Pharmacokinetics, Safety, and Clinical Efficacy of Cannabidiol Treatment in Osteoarthritic Dogs. *Front Vet Sci*. 2018.5:165. DOI: 10.3389/fvets.2018.00165.
 - [25] Gasparyan, A; Navarrete, F; Rodriguez-Arias, M; Miñarro, J; Manzanares, J. Cannabidiol Modulates Behavioural and Gene Expression Alterations Induced by Spontaneous Cocaine Withdrawal. *Neurotherapeutics*. 2021. 18(1):615-623. DOI: 10.1007/s13311-020-00976-6.
 - [26] Gonzalez-Cuevas, G; Martin-Fardon, R; Kerr, TM; Stouffer, DG; Parsons, LH; Hammell, DC; Banks, SL; Stinchcomb, AL; Weiss, F. Unique treatment potential of cannabidiol for the prevention of relapse to

- drug use: preclinical proof of principle. *Neuropsychopharmacology*. 2018. 43(10):2036-2045. DOI: 10.1038/s41386-018-0050-8.
- [27] Green, R; Khalil, R; Mohapatra, SS; Mohapatra, S. Role of Cannabidiol for Improvement of the Quality of Life in Cancer Patients: Potential and Challenges. *In J Mol Sci*. 2022. 23(21):12956. DOI: 10.3390/ijms232112956.
- [28] Gregorio, DD; McLaughlin, RJ; Posa, L; Ochoa-Sanchez, R; Enns, J; Lopez-Canul, M; Aboud, M; Maione, S; Comai, S; Gobbi, G. Cannabidiol modulates serotonergic transmission and reverses both allodynia and anxiety-like behavior in a model of neuropathic pain. *Pain*. 2019. 160(1):136-150. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001386.
- [29] Grimaldi, C; Capasso, A. The endocannabinoid system in the cancer therapy: an overview. *Curr Med Chem*. 2011. 18(11):1575-83. DOI: 10.2174/092986711795471374.
- [30] Guard, SE; Chapnick, DA; Poss, ZC; Ebmeier, CC; Jacobsen, J; Nemkov, T; Ball, KA; Webb, KJ; Simpson, HL; Coleman, S; Bunker, E; Ramirez, A; Reisz, JA; Sievers, R; Stowell, MHB; D'Alessandro, A; Liu, X; Old, WM. Multiomic Analysis Reveals Disruption of Cholesterol Homeostasis by Cannabidiol in Human Cell Lines. *Mo Cell Proteomics*. 2022. 21(10):100262. DOI: 10.1016/j.mcpro.2022.100262.
- [31] Gururajan, A; Taylor, DA; Malone, DT. Cannabidiol and clozapine reverse MK-801-induced deficits in social interaction and hyperactivity in Sprague–Dawley rats. *J Psychopharm*. 2012. 26(10):1317-32. DOI: 10.1177/0269881112441865.
- [32] Hillard, CJ. Endocannabinoids and the Endocrine System in Health and Disease. *Handb Exp Pharmacol*. 2019. 231: 317-339. DOI: 10.1007/978-3-319-20825-1_11.
- [33] Hotz, J; Fehlmann, B; Papassotiropoulos, A; Quervain, DJF; Schickel, NS. Cannabidiol enhances verbal episodic memory in healthy young participants: A randomized clinical trial. *J Psychiatr Res*. 2021. 143:327-333. DOI: [10.1016/j.jpsychires.2021.09.007](https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2021.09.007).
- [34] Hsu, L-H; Chu, N-M; Lin, Y-F; Kao, S-H. G-Protein Coupled Estrogen Receptor in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019. 20(2):306. DOI: 10.3390/ijms20020306.

- [35] Hurd, YL; Spriggs, S; Alishayev, J; Winkel, G; Gurgov, K; Kudrich, C; Oprescu, AM; Salsitz, E. Cannabidiol for the Reduction of Cue-Induced Craving and Anxiety in Drug-Abstinent Individuals With Heroin Use Disorder: A Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. *Am J Psychiatry*. 2019. 176(11):911-922. DOI: 10.1176/appi.ajp.2019.18101191.
- [36] Ignatowska-Jankowska, B; Jankowski, MM; Swiergiel, AH. Cannabidiol decreases body weight gain in rats: involvement of CB2 receptors. *Neurosci Lett*. 2011. 490(1):82-4. DOI: 0.1016/j.neulet.2010.12.031.
- [37] Jin, H; Yan, M; Pan, C; Sha, X; Jiang, C; Li, X; Pan, M; Li, D; Han, X; Ding, J. Chronic exposure to polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity and decreased testosterone levels via the LH- mediated LHR/cAMP/PKA/StAR pathway. *Part Fibre Toxicol*. 2022. 19:13. DOI: 10.1186/s12989-022-00453-2.
- [38] Kaplan, JS; Stella, N; Catterall, WA; Westenbroek, RE. Cannabidiol attenuates seizures and social deficits in a mouse model of Dravet syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017. 114(42):11229-11234. DOI: 10.1073/pnas.1711351114.
- [39] Kaufmann, R; Bozer, AH; Jotte, AK; Aqua, K. Long-Term, Self-Dosing CBD Users: Indications, Dosage, and Self-Perceptions on General Health/Symptoms and Drug Use. *Med Cannabis Cannabinoids*. 2023. 6(1):77-88. DOI: [10.1159/000531666](https://doi.org/10.1159/000531666).
- [40] Kisková, T; Mungenast, F; Suvakova, M; Jäger, W; Thalhammer, T. Future Aspects for Cannabinoids in Breast Cancer Therapy. *Int J Mol Sci*. 2019. 20(7):1673. DOI: 10.3390/ijms20071673.
- [41] Klean-Vet (2024). Klean-Vet® - Nuevo tratamiento veterinario-Grado farmacéutico. Klean-Vet®. <https://klean-vet.com/>.
- [42] Kogan, LR; Hellyer, PW; Silcox, S; Schienfeld-Tacher, R. Canadian dog owners' use and perceptions of cannabis products. *Can Vet J*. 2019. 60(7):749-755. PMID: 31281193.
- [43] Landa, L; Sulcova, A; Gbelec, P. The use of cannabinoids in animals and therapeutic implications for veterinary medicine: a review. *Vet Med*. 2016. 61(3):111-122. DOI: 10.17221/8762-VETMED.

- [44] Moreno, E; Cavic, M; Krivokuca, A; Canela, EI. The Interplay between Cancer Biology and the Endocannabinoid System—Significance for Cancer Risk, Prognosis and Response to Treatment. *Cancers*. 2020. 12(11):3275. DOI: 10.3390/cancers12113275.
- [45] Nahler, G. Cannabidiol and Other Phytocannabinoids as Cancer Therapeutics. *Pharmaceut Med*. 2022. 36(2):99-129. DOI: 10.1007/s40290-022-00420-4.
- [46] Nichols, JM and Kaplan, BLF. Immune responses regulated by Cannabidiol. *Cannabis Cannabinoid Res*. 2020. 5(1):12-31. DOI: [10.1089/can.2018.0073](https://doi.org/10.1089/can.2018.0073).
- [47] O'Brien, K. Cannabidiol (CBD) in cancer management. *Cancers (Basel)*. 2022. 14(4):885. DOI: 10.3390/cancers14040885.
- [48] O'Sullivan, SE; Jensen, SS; Kolli, AR; Nikolajsen, GN; Bruun, HZ; Hoeng, J. Strategies to Improve Cannabidiol Bioavailability and Drug Delivery. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2024. 17(2):244. DOI: 10.3390/ph17020244.
- [49] Plessis, JD; Deroubaix, A; Omar, A; Penny, C. A Bioinformatic Analysis Predicts That Cannabidiol Could Function as a Potential Inhibitor of the MAPK Pathway in Colorectal Cancer. *Curr Issues Mol Biol*. 2024. 46(8):8600-8610. DOI: 10.3390/cimb46080506.
- [50] Prud'homme, M; Cata, R; Jutras-Aswad, D. Cannabidiol as an Intervention for Addictive Behaviors: A Systematic Review of the Evidence. *Subst Abuse*. 2015. 9:33-38. DOI: 10.4137/SART.S25081.
- [51] Qian, L; Beers, JL; Jackson, KD; Zhou, Z. CBD and THC in Special Populations: Pharmacokinetics and Drug–Drug Interactions. *Pharmaceutics*. 2024. 16(4):484. DOI: 10.3390/pharmaceutics16040484.
- [52] Raposo, TP; Arias-Pulido, H; Chaher, N; Fiering, SN; Argyle, DJ; Prada, J; Pires, I; Queiroga, FL. Comparative aspects of canine and human inflammatory breast cancer. *Seminars Oncology*. 2017. 44(4):288-300. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2017.10.012.
- [53] Rock, EM; Bolognini, D; Limebeer, CL; Cascio, MG; Anavi-Goffer, S; Fletcher, PJ; Mechoulam, R; Pertwee, RG; Parker, LA. Cannabidiol, a non-psychotropic component of cannabis, attenuates

- vomiting and nausea-like behaviour via indirect agonism of 5-HT1A somatodendritic autoreceptors in the dorsal raphe nucleus. *Br J Pharmacol*. 2012. 165(8):2620-2634. DOI: [10.1111/j.1476-5381.2011.01621.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01621.x).
- [54] Rozental, AJ; Weisbeck, BG; Alvarenga, IC; Gustafson, DL; Kussick, BR; Rao, S; Bartner, LR; McGrath, S. The efficacy and safety of cannabidiol as adjunct treatment for drug-resistant idiopathic epilepsy in 51 dogs: A double-blinded crossover study. *J Vet Intern Med*. 2023. 37(6):2291-2300. DOI: [10.1111/jvim.16912](https://doi.org/10.1111/jvim.16912).
- [55] Schaiquevich, P; Riva, N; Maldonado, C; Vazquez, M; Caceres-Guido, P. Farmacología clínica de cannabidiol en epilepsias refractarias. *Farm Hosp*. 2020. 44(5):222-229. DOI: 10.7399/fh.11390.
- [56] Schiffer, L; Barnard, L; Baranowski, ES; Gilligan, LC; Taylor, AE; Arlt, W; Shackleton, CHL; Storbeck, K-H. Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2019. 194:105439. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105439.
- [57] Schouten, M; Dalle, S; Mantini, D; Koppo, K. Cannabidiol and brain function: current knowledge and future perspectives. *Front Pharmacol*. 2023. 14:1328885. DOI: 10.3389/fphar.2023.1328885.
- [58] Seltzer, ES; Watters, A; Jr, DM; Granat, LM; Zhang, D. Cannabidiol (CBD) as a Promising Anti-Cancer Drug. *Cancers (Basel)*. 2020. 12(11):3203. DOI: 10.3390/cancers12113203.
- [59] Sholler, DJ; Spindle, TR; Cone, EJ; Goffi, E; Kuntz, D; Mitchell, JM; Winecker, RE; Bigelow, GE; Flegel, RR; Vancrey, R. Urinary Pharmacokinetic Profile of Cannabidiol (CBD), Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) and Their Metabolites following Oral and Vaporized CBD and Vaporized CBD-Dominant Cannabis Administration. *J Anal Toxicol*. 2021. 46(5):494-503. DOI: 10.1093/jat/bkab059.
- [60] Shrivastava, A; Kuzontkoski, PM; Groopman, JE; Prasad, A. Cannabidiol Induces Programmed Cell Death in Breast Cancer Cells by Coordinating the Cross-talk between Apoptosis and Autophagy.

- Mol Cancer Therap.* 2011. 10(7):1161-1172. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-1100.
- [61] Sledzinski, P; Zeyland, J; Slomski, R; Nowak, A. The current state and future perspectives of cannabinoids in cancer biology. *Cancer Med.* 2018. 7(3):765-775. DOI: 10.1002/cam4.1312.
 - [62] Stella. THC and CBD: Similarities and differences between siblings. *Neuron.* 2023. 111(3):302-327. DOI: 10.1016/j.neuron.2022.12.022.
 - [63] Swenson, KS; Wulschner, LE; Hoelscher, VM; Folts, L; Korth, KM; Oh, WC; Bates, EA. Fetal cannabidiol (CBD) exposure alters thermal pain sensitivity, problem-solving, and prefrontal cortex excitability. *Mol Psychiatry.* 2023. 28(8):3379-3413. DOI: [10.1038/s41380-023-02130-y](https://doi.org/10.1038/s41380-023-02130-y).
 - [64] Tham, M; Yilmaz, O; Alaverdashvili, M; Kelly, EM; Denovan-Wright, EM; Laprairie, RB. Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors. *J Pharmacol.* 2018. 176(10):1455-1469. DOI: 10.1111/bph.14440.
 - [65] Uva, P; Aurisicchio, L; Watters, J; Loboda, A; Kulkarni, A; Castle, J; Palombo, F; Viti, V; Mesiti, G; Zapulli, V; Marconato, L; Abramo, F; Ciliberto, G; Lahm, A; Monica, NL; Rinaldis, E. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics.* 2009. 10(135). DOI: 10.1186/1471-2164-10-135.
 - [66] Vanderhoof, SO; Vincent, CJ; Beaver, J; Latsko, MS; Aguilar-Alvarez, R; Jasnow, AM. Corticosterone after early adolescent stress prevents social avoidance, aversive behavior, and morphine-conditioned place preference in adulthood. *Psychopharmacology (Berl).* 2024. 241(10):2045-2059. DOI: 10.1007/s00213-024-06616-7.
 - [67] Velasco, G; Sánchez, C; Guzmán, M. Anticancer mechanisms of cannabinoids. *Curr Oncol.* 2016. 23(Suppl 2):S23-S32. DOI: 10.3747/co.23.3080.
 - [68] Watanabe, K; Motoya, E; Matsuzawa, N; Funahashi, T; Kimura, T; Matsunaga, T; Arizono, K; Yamamoto, I. Marijuana extracts

possess the effects like the endocrine disrupting chemicals. *Toxicology*. 2005. 206 (3): 471-478. DOI: 10.1016/j.tox.2004.08.005.

- [69] Wise, R; Jordan, CJ. Dopamine, behavior, and addiction. *J Biomed Sci*. 2021. 28:83. DOI: 10.1186/s12929-021-00779-7.

V PREMIO AMIGOS DE LA HISTORIA VETERINARIA

LA ALIANZA VETERINARIA: UNA HEMEROGRAFÍA INÉDITA

JAUME VICENT JORDÁ MORET¹

ANA NAVARRO SERRA²

RESUMEN

Gracias al continuo avance promovido por diferentes centros de investigación en España, poco a poco el interesante campo de las revistas veterinarias del siglo XIX va completando sus repositorios. No obstante, una revista de especial interés como fue La Alianza Veterinaria, editada por D. Juan Morcillo Olalla entre 1882 y 1886, carecía de estudios hemerográficos conocidos al existir una accesibilidad para su estudio muy reducida. Gracias a la colaboración de la Biblioteca Histórica de Madrid, se ha podido realizar un estudio hemerográfico de esta revista, con el objeto de contextualizar su contenido y generar índices de referencia que ayuden a otros investigadores a encontrar información en ella. El resultado se presenta revelador, encontrando una publicación adelantada a su tiempo en su defensa de la dignidad profesional y la difusión de la ciencia, además de acercarnos a la visión de la veterinaria de provincias del siglo XIX, y que invita a futuros trabajos gracias a los nuevos datos que aporta.

¹ Profesor adjunto Universidad Cardenal Herrera CEU - Facultad de Veterinaria.

² Profesora adjunta Universidad Cardenal Herrera CEU - Facultad de Veterinaria.

ABSTRACT

Because of the continuous progress promoted by various research centres in Spain, the collections in the fascinating field of veterinary journals of the 19th century are gradually being completed. However, one journal of particular interest, “La Alianza Veterinaria”, edited by D. Juan Morcillo Olalla between 1882 and 1886, has not been the subject of any known hemerographic studies due to the very limited accessibility for its analysis. Thanks to the collaboration of the Historical Library of Madrid, a hemerographic study of this journal has been made possible, with the aim of contextualising its contents and creating reference indices to help other researchers find the information it contains. The results are revealing, highlighting a publication that was ahead of its time in its defence of professional dignity and scientific dissemination. In addition, it offers valuable insights into the provincial veterinary perspective of the 19th century and encourages further research thanks to the new data it provides.

1. INTRODUCCIÓN

Cuando el 15 de marzo de 1845 se publica el primer número del “Boletín de Veterinaria, periódico oficial de la sociedad veterinaria de socorros mutuos”³ (Estarrona, 1845), se inicia un apasionante periodo en la historia de la veterinaria española como es el nacimiento, cada vez mayor, de publicaciones científicas periódicas veterinarias especializadas que permitirán a la clase veterinaria compartir ciencia, inquietudes y polémicas (Aganzo Salido *et al.*, 2014).

No son estas publicaciones las primeras en el ámbito veterinario, ya que la aparición de artículos en otro tipo de revistas (médicas, farmacéuticas, agrícolas...) venía ya desde finales del siglo XVIII (Fernández Sanz, 1995), pero estas nuevas publicaciones, exclusivamente centradas en la profesión, serán un reflejo del auge de la veterinaria científica en este tiempo. Además, los lugares de publicación de las revistas van abriendo un abanico, pasando de estar centradas en Madrid a mitad del XIX, hasta tener ejemplos de publicaciones por buena parte de la geografía española a finales del XIX (Fernández Sanz, 1995).

³ La colección completa del Boletín de Veterinaria está accesible gracias al trabajo de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) en su “Dipòsit digital de documents de la UAB” (<https://ddd.uab.cat/record/49069>).

Este proceso de evolución ha sido extensa y detalladamente tratado en la obra “La prensa veterinaria (I- hasta 1903)” (Fernández Sanz, 1995), que servirá de marco de inicio para el trabajo que se va a presentar. Esta obra, significativa en su campo, acoge las hemerografías de la práctica totalidad de revistas publicadas en este periodo.

El estudio de estas obras es, pues, un material significativo para entender muchos puntos clave del pasado de la profesión veterinaria. Recuperar estos fondos es un proceso actualmente activo y vivo. Se puede decir que la prensa veterinaria tiene un buen nivel de conservación y, sobre todo, transformación digital, clave para el acceso a este tipo de documentos dadas las características de degradación que suelen tener los papeles de esta época (Jordá Moret, 2011). Estas iniciativas de transformación, cuyo objetivo principal es la conservación y difusión de patrimonio bibliográfico, tiene grandes ejemplos en nuestro país, como las iniciativas promovidas por la Biblioteca Digital Hispánica (Biblioteca Nacional de España, 2012), el repositorio Helvia (Universidad de Córdoba, 2015), o el Dipòsit Digital de Documents (Universidad Autónoma de Barcelona, 2024), entre otros claros referentes en este campo (Jordá Moret, 2011; Jordá Moret, 2024).

Sin embargo, ni dentro de estos repositorios, ni en la citada obra de Fernández Sanz, existen datos sobre una obra que es especialmente importante en la provincia de Valencia: “La Alianza Veterinaria, periódico de la asociación veterinaria de las Riberas del Júcar”, publicada en Xàtiva entre 1882 y 1886, y dirigida por una de las figuras referenciales de la veterinaria del XIX como era Juan Morcillo Olalla.

Dice al respecto Fernández Sanz: “No la hemos localizado ni en Madrid, ni en Valencia, ni en ninguna de las hemerotecas que hemos visitado por toda España. Por su parte, Ricard Blasco, en *La premsa del País Valencià* (1790-1983), no da cuenta de que se conserve en ninguna de las Hemerotecas del País Valenciano ni de cualquier otro lugar [...]” (Fernández Sanz, 1995).

A pesar de este desalentador dato, y a pesar de corroborar dichas afirmaciones tras nuevas búsquedas actualizadas en dichos centros entre 2010 y 2015, el ánimo implacable por parte de los autores llevó a conseguir en 2022, y gracias a la colaboración de la Biblioteca Histórica de Madrid, una edición completa de dicha revista. Dicha obra se encontraba en la Biblioteca Histórica Municipal de Madrid, dentro de la sección de Depósito de Colecciones especiales, con signatura V1005. La obra procedía de la Biblioteca de D. Cesáreo Sanz Egaña. El 15 de marzo de 2022

(curiosamente 177 años exactos después del primer número del Boletín de Veterinaria), la Biblioteca Histórica digitalizó dichos fondos a petición nuestra, poniéndolos a disposición para su estudio. Además, esto llevó a que los ejemplares digitalizados fueran puestos en formato accesible a través de su página web “Memoria de Madrid” (<https://www.memoriademadrid.es/buscador.php?accion=VerFicha&id=413176>), consiguiendo aumentar nuestro patrimonio bibliográfico digitalizado.

En este punto, y contando con un material que no había sido catalogado ni consultado previamente por otros historiadores de la veterinaria y de la prensa científica del XIX, se propone la elaboración de una hemerografía que permita a otros historiadores acceder a esta información mediante la generación de un índice contextualizado de la obra, que permita hacer un análisis en profundidad del contenido de esta revista y mejorar el proceso de búsqueda de información en ella, y así contextualizarla dentro de la visión personal que tenía de la profesión su director, Juan Morcillo Olalla.

2. MATERIAL Y MÉTODO

El material empleado en este trabajo, tal y como se ha indicado, será la edición completa de “La Alianza Veterinaria” (Morcillo Olalla, Juan, 1882), a partir de la copia digital que aportó en 2022 la Biblioteca Histórica Municipal de Madrid. La revista, de periodicidad quincenal, se publicó entre enero de 1882 y enero 1886, con un total de 97 números.

Con el fin de mantener en la hemerografía el formato de Fernández Sanz, se desarrollarán los puntos: cabecera, enmarque cronológico, imprenta, administración, precio, formato, tipografías y contenido.

Posteriormente, se elaboró un listado exhaustivo de todas las publicaciones aparecidas en la revista. Con el fin de dar solidez al estudio, se clasificaron estas conforme a los temas que abordan, generando un resumen de los contenidos que albergaba también la ubicación del número de la revista en que se halla. Este parámetro siempre aparece entre paréntesis en números arábigos junto con la información del artículo.

Además, se relacionaron los artículos, de tal forma que el resultado no sea la descripción de los números, sino de los temas, agrupando información aparecida en diferentes fechas y conectándola entre sí.

Este estudio ha utilizado el entrenamiento de un modelo GPT (*Generative Pretrained Transformer*) de Inteligencia Artificial, a partir de

los contenidos digitalizados y reconocidos mediante OCR (*Optical Character Recognition*) de la publicación original. Su programación y entrenamiento incluyeron la prohibición de obtención de datos externos a la publicación. El objetivo fue permitir refinar búsquedas de manera eficiente para confirmar las conexiones entre noticias. Se deja constancia de ello para alentar al uso de los investigadores en historia de la veterinaria de estas nuevas tecnologías, dejando aclaración también que, a fecha de hoy, una inteligencia artificial no puede llegar más que a ese punto, y todo el estudio ha sido resultado de meses de inteligencia humana.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN CRÍTICA

3.1. Descripción de la revista

Cabecera: LA ALIANZA VETERINARIA, periódico de la Asociación veterinaria de las riberas del Júcar.

Enmarque cronológico: inicia su publicación el 15 de enero de 1882 hasta su cierre el 15 de enero de 1886, en su número 97, de forma ininterrumpida con carácter bimestral, en días 15 y 30 de cada mes (a excepción de febrero).

Imprenta: Imprenta de Blas Bellver, Játiva. Esta fue una de las principales imprentas ubicadas en la zona de Levante durante el siglo XIX (Martínez Revert, 2010), y la imprenta que publicó toda la obra de Morcillo.

Administración: D. Carmelo Iborra Lluch, Alameda, 27. Játiva.

Precio: suscripción de un mes, 1 peseta. Por trimestre, 3 pesetas. Para el extranjero, suscripción anual por 20 pesetas.

Formato: La publicación tiene de forma habitual ocho páginas. A partir de su número 11, la revista empieza a entregar librillos en su contenido que permitieron mediante su encuadernación obtener diferentes libros completos, y que se explica más adelante. Es pues, a partir de dicho número 11 que la revista reduce su contenido editorial a cuatro páginas, siendo las otras cuatro las relativas al libro. El número 11 aún cuenta esas páginas dentro de la paginación de la revista.

Como norma, todos los números que no estén indicados como que tienen libro incluido tienen ocho páginas de contenido de revista, y el resto cuatro páginas.

Tipografías: La tipografía utilizada para el título "La Alianza Veterinaria" (Ilustración 1) parece una fuente de estilo *serif* neoclásico, con letras en mayúscula que tienen un grosor robusto y detalles cuadrados, típicos de las tipografías de finales del siglo XIX. Este tipo de letra es similar a las fuentes egipcias o de tipo "*slab serif*", como la *Playbill*, *Clarendon* o *Egyptian*, que eran populares en la época para encabezados y títulos debido a su fuerte presencia visual (Martínez Revert, 2010).



ILUSTRACIÓN 1. Cabecera del primer número de "La Alianza Veterinaria".

En los subtítulos ("PERIÓDICO DE LA ASOCIACIÓN VETERINARIA DE LAS RIBERAS DEL JÚCAR") se utiliza una fuente en mayúsculas, de estilo *serif* más fino y elegante que el título principal. Puede ser una variante de *serif* "transicional", que mantiene la formalidad sin el peso visual de la "*slab serif*" usada en el encabezado.

En el contenido de la banda inferior utiliza una fuente *serif* regular, probablemente una "*roman serif*" estándar que ofrece claridad y legibilidad, especialmente útil para textos más largos o informativos. Este estilo era común en la época para secciones informativas de publicaciones, y es que utiliza de forma habitual para todas las publicaciones (Martínez Revert, 2010).

Por último "Se publica los días 15 y 30 de cada mes" parece usar una fuente *serif* más pequeña y condensada, diseñada para maximizar el uso del espacio. Podría tratarse de una *serif* en estilo "*old style*", que combina funcionalidad y una estética sobria, ideal para detalles en publicaciones.

Cada una de estas tipografías se alinea con las prácticas de diseño de la época, donde se usaban distintas variaciones de fuentes *serif* para

jerarquizar la información visualmente. El interior de toda la revista, especialmente la sección de anuncios, es un auténtico ejemplo creativo del uso de tipografías, algo en lo que la Imprenta Bellver tenía una amplísima experiencia (Martínez Revert, 2010).

Sobre su contenido: La revista se presenta como un escaparate a la realidad diaria de la profesión desde la óptica de los veterinarios de provincias. Tras analizar el contenido, se han identificado casi 700 ítems, que incluyen artículos científicos, editoriales, artículos de reflexión, anuncios de la asociación, anuncios comerciales, etc. A continuación, se presentan los ítems encontrados en base a la categoría y tema tratado. Abordaremos en análisis desde 3 clasificaciones principales (las cuales desarrollaremos): La Asociación, contenido científico y los anuncios.

3.2. La Asociación

Siendo el órgano de información de la Asociación, la revista alberga gran cantidad de contenido al respecto de la propia gestión y comunicación. No obstante, y puesto que esta información puede tener carácter muy diverso, se ha dividido en subcategorías para analizar más adecuadamente los contenidos: temas generales, sesiones de la Junta y temas administrativos, los impagos, intrusismo y dignidad profesional, el Congreso Nacional de Veterinaria de 1883, y necrológicas.

3.2.1. Temas generales

En esta sección clasificatoria, se han incluido todos aquellos temas de tipo genérico, pero se han agrupado por el seguimiento que “La Alianza Veterinaria” realizaba, y que hacía que en la mayoría de los casos no fueran datos de un solo número.

Se inicia la revisión con la información y creación del **reglamento de auxilio a familias** (6,7), una de las interesantes aportaciones realizadas en este inicio del asociacionismo (y que ha llegado hasta nuestros días en el Colegio de Valencia). Las reflexiones sobre su creación tuvieron variadas aportaciones; se publicaron observaciones a las bases de proyecto de socorros (9) previamente a la aprobación del reglamento de socorros 8 de mayo de 1882 (10). Aún después de su aprobación, otros veterinarios como Rafael Bernabeu siguieron reflexionando en su aplicación (13), con contestaciones por Luis Rodríguez (14). Un año después (37) en la Junta General del 23 de marzo de 1883 se plantea esta idea aceptada provisionalmente a la espera de la confirmación de los socios.

Rafael Bernabeu planteó enmiendas, como enfocar el reglamento solo en las familias de fallecidos y no en profesores incapacitados, salvo en casos de incapacidades mentales graves. También propuso limitar la duración del convenio y establecer un orden de herederos, priorizando a la viuda y los hijos. La Junta Directiva defendió el proceso de elaboración del reglamento como inclusivo y transparente, resaltando que buscaba un equilibrio entre solidaridad y la realidad económica de los veterinarios. Aclaró que todos los socios deben tener los mismos derechos, que la cuota de 25 pesetas es adecuada y que cualquier modificación del reglamento dependerá de una decisión en Junta general.

En esas mismas fechas, la “Gaceta Médico-Veterinaria” también plantea la creación de una sociedad de socorros mutuos para asistir a las familias de veterinarios fallecidos (36), considerándola vital para la colectividad veterinaria debido a su situación económica precaria. Aun así, la revista observa obstáculos derivados de la falta de cultura de asociación en España y de la desconfianza por fracasos previos de sociedades similares. Entre las sugerencias para mejorar su funcionamiento, propone escalas de cuotas según la edad al ingresar, revisiones cuidadosas de los nuevos miembros, y restricciones a aquellos que se asocien tardíamente para evitar beneficios sin contribuciones adecuadas.

La **Ley de Sanidad Civil** (7-13,15-19) fue debatida también en la revista a partir del proyecto presentado para recibir observaciones de los socios. El Real Decreto del 20 de marzo de 1882 autorizó al Ministro de Gobernación a proponer esta ley, que reorganiza la administración sanitaria en España, basada en la ley de 1855. El proyecto busca equilibrar la centralización estatal con la autonomía municipal y provincial, creando órganos como la Dirección General de Sanidad, delegaciones de puerto y lazaretos para la sanidad marítima, y delegaciones provinciales y sub-delegaciones municipales para la sanidad terrestre. La ley define funciones específicas en sanidad terrestre y marítima, regula el personal sanitario y promueve mejoras en higiene pública y vigilancia en industrias insalubres, además de establecer contribuciones económicas para sostener los servicios de salud y medidas para combatir epidemias.

Dio difusión a temas de importancia para los asociados, como las publicaciones de **plazas de profesor** para escuelas especiales de veterinaria (15), en las que habían puestos de Profesor de Fragua en la Escuela de Veterinaria de Santiago, Cátedra de Física, Química e Historia Natural también en Santiago, y Disector Anatómico en las escuelas veterinarias

de Córdoba; o para optar a **plazas de Inspector de carnes** en Valencia (56). Trató la revista de defender siempre estas plazas para los veterinarios, como en el extracto de la Gaceta de Madrid de 7 marzo de 1885 (77), en que indica que los veterinarios son los únicos que deben reconocer animales de sangre caliente, y la reclamación de los subdelegados de veterinaria de Córdoba respecto a una decisión del ayuntamiento que asignó a médicos la inspección de alimentos en mercados públicos. La sentencia reforzó la posición de los veterinarios en la inspección de alimentos de origen animal.

También se dio visibilidad a **otras asociaciones**, como la Liga de veterinarios de la provincia de Gerona (53) dirigida por el veterinario Juan Arderius y Banjol.

Tal vez uno de los cruces de artículos más interesantes de esta sección fue el denominado “Casos raros”, que consistió en un **cruce de acusaciones** entre Antonio Rodríguez y Antonio Pascual. Aunque su tema tiene que ver en parte con la dignidad profesional, se ha catalogado en esta sección dado que es claro ejemplo del papel dinamizador de la profesión a través de la revista. Antonio Rodríguez, expone una serie de conflictos con un colega veterinario recientemente establecido en la villa (89), quien intervino sin ser llamado y desacreditó sus diagnósticos y tratamientos. Rodríguez relata tres casos específicos: un caballo con una fístula por espigas en la faringe que el colega diagnosticó erróneamente como pulmonía, otro caballo que presentaba una fractura en el carpo donde el dueño declinó la intervención del veterinario foráneo, y un tercer caso de indigestión intestinal donde el colega, aunque inicialmente aprobó el tratamiento, luego lo desacreditó públicamente. Antonio Pascual responde (92) defendiendo su reputación profesional y señalando inexactitudes en el relato de Rodríguez sobre los casos. Pascual termina expresando su compromiso con la verdad científica y la ética profesional. Rodríguez responde de nuevo (93) criticando duramente su respuesta previa y defendiendo la veracidad de sus afirmaciones. Promete no volver a abordar el tema, considerando que el juicio del público ya ha sido claro. Sin embargo, Rodríguez vuelve a escribir (94) y se retracta de algunas de sus afirmaciones previas admitiendo haber cometido errores en sus acusaciones hacia Antonio Pascual. Explica que fue debido a información incorrecta proporcionada por terceros. Con esta rectificación, Rodríguez intenta preservar la integridad y reputación de Pascual, dejando claro que su intención no era dañar la fama de su colega. La última palabra la pone Santiago Arévalo (95), quien expone su experiencia

personal con Antonio Pascual, coincidiendo con las críticas previas de Rodríguez hacia Pascual. Arévalo sugiere que Pascual ha dañado la reputación profesional de la veterinaria en varias ocasiones, dejando claro que su carta apoya la rectificación de Rodríguez, quien ha retirado algunas de sus acusaciones contra Pascual, pero sin eximirlo de otras críticas.

Con el fin de dar un cierre digno a su publicación, y adelantándose al cierre en el número 97, Juan Morcillo publica un **índice temático** para que su publicación adquiriera la posibilidad de ser obra de consulta (96).

En otras ocasiones, aparecen temas menos relevantes, más asociados a la relación entre los particulares, generalmente para **agradecimientos**, como a Ildefonso Lázaro (Sueca) por su interés en la profesión (3); o a Juan Herrero y Argente (Teruel) por su donación a la Asociación un ejemplar de su "Memoria sobre la ganadería en la provincia de Teruel" (4); o en el mismo número el agradecimiento por la acogida en "La Gaceta Médico-Veterinaria" (4), reconociendo la importancia de la agrupación para impulsar reformas en beneficio de la profesión veterinaria y destacando la necesidad de que todas las asociaciones colaboren, ya que la apatía en el gremio y la sumisión a estructuras desventajosas han obstaculizado el progreso, tema que son abordados en detalle más adelante. Otros agradecimientos son más personales como el de Morcillo a la Escuela de Veterinaria de Madrid (74); o "Prueba de cariño" (95) en que José Llorca y Soler expresa su alegría por la elección de Francisco Torres y Torres como Presidente de la Asociación Veterinaria de las Riberas del Júcar. También hubo críticas como en "Santiago" (43); y notificaciones de carácter general, como la entrega de diplomas de pertenecer a la asociación (4) (diploma del cual no se ha podido encontrar ningún ejemplar), la posibilidad de conseguir números atrasados (23, 52, 70), o sobre el sistema de pago en trigo y equivalencia entre fanegas y barchillas en Albacete (9) (aclaración muy importante para los veterinarios que trabajaban en las zonas lindantes de Valencia y Albacete).

También hubo informaciones de otras publicaciones, como "La vida y la muerte", extraído del Boletín de la Academia Palacín (31); y reseña sobre **nuevas publicaciones** como "El porvenir de la veterinaria" y "La veterinaria práctica ó Biblioteca Alvero" (35), El "tit español" (36), "La veterinaria" en Santiago de Cuba (52).

Aunque como se ha mencionado anteriormente son aportaciones menores, sí que ayudan a entender la forma de comunicación entre los profesionales en esa época, alejada de la inmediatez actual.

3.2.2. *Sesiones de la Junta y temas administrativos*

Como periódico de la Asociación, la comunicación de las **convocatorias de reunión** fue una de las utilidades de la revista, apareciendo convocatorias en múltiples números (5, 16, 18, 26, 29, 30, 52, 53, 67, 69, 73, 76, 92, 93).

Los **balances de cuentas** (1, 7, 8, 13, 14, 19, 20, 26, 37, 40, 52) y el resumen de lo sucedido en la revista durante el año (25, 49, 73) también tuvieron su cabida.

Otro elemento importante como Asociación era la difusión de los contenidos de las **reuniones y asambleas** realizadas. Como su contenido es el menos difundido, y puede ayudar mucho a entender el día a día y realidad de la asociación, se presenta un breve resumen de cada uno de ellos.

Nuestro programa-prospecto (1): La presentación del proyecto destaca el compromiso de fortalecer la unión de los veterinarios y luchar por los derechos de la profesión, que lleva mucho tiempo olvidada. La asociación pretende unir fuerzas con otras organizaciones para marcar una línea común de acción, promover la solidaridad y erradicar las divisiones internas, así como luchar contra el intrusismo profesional. La creación del periódico es fundamental para mantener viva esta unión, funcionando como medio de comunicación y punto de encuentro. La asociación, que no espera lucro del periódico, planea destinar cualquier excedente a la entrega de obras profesionales a los suscriptores. Se busca publicar contenido relevante y evitar polémicas personales, enfocándose en fortalecer el compañerismo y el progreso científico. Finalmente, se reconoce la limitación de recursos y experiencia, pero se compensa con una gran voluntad y perseverancia. Se enfatiza la necesidad de abnegación y trabajo conjunto para lograr reformas significativas que eleven la posición social y económica de los veterinarios y aseguren el reconocimiento de futuras generaciones.

Asociación Veterinaria de las Riberas del Júcar. Su iniciación y origen. - Trámites que ha seguido. - Su definitiva instalación (1-4): El primer artículo que se extiende durante varios números. Describe como en julio de 1881, Antonio Comins propuso a Juan Morcillo la formación de una Asociación Veterinaria en su región, motivado por el interés de varios colegas y el movimiento asociativo creciente en la profesión. Aunque Morcillo tenía reservas debido a las dificultades previsibles, ambos

trabajaron juntos para llevar adelante el proyecto. Se enviaron invitaciones a los veterinarios de partidos limítrofes, y el 11 de agosto de 1881 se celebró en Játiva una reunión de subdelegados donde se constituyó la Asociación y se eligió a Morcillo como presidente provisional. Se redactó una circular para sumar apoyos y, en septiembre, se convocó una asamblea general en el Teatro Principal de Játiva, donde se eligió a la Junta Directiva. Durante la sesión, Morcillo pronunció un discurso destacando la necesidad de unión y apoyo mutuo para mejorar la situación profesional y social de los veterinarios. Señaló que la falta de organización y el intrusismo eran causas del bajo reconocimiento de la profesión. Insistió en que los veterinarios debían tomar las riendas de su destino sin esperar ayudas externas y abogó por una práctica profesional unificada y ética. Se establecieron objetivos como regularizar el ejercicio civil, mejorar los mata-deros y sueldos de inspectores, y combatir el intrusismo. Tras algunos retrasos burocráticos, los estatutos de la asociación fueron aprobados en enero de 1882. Estos **estatutos** se publican en el (4).

Sesión 10/10/1882 (20-23): se presentó una memoria anual, donde se detallaron los logros y dificultades de la Asociación Veterinaria de las Riberas del Júcar. Se destacó la fundación del periódico La Alianza Veterinaria, y la entrega de diplomas a los socios. Sin embargo, se reportó la falta de respuesta del Gobernador Civil ante las quejas sobre el intrusismo, afectando negativamente a los veterinarios titulados. Juan Morcillo, en su discurso, alentó a la persistencia en la lucha por el reconocimiento y protección de la profesión, señalando la importancia de seguir los pasos de países como Francia en materia de legislación sanitaria para animales, y destacando la necesidad de una ley en España. También subrayó que el crecimiento de la profesión debía basarse en la unidad, respeto y compañerismo entre colegas. La sesión concluyó con la reelección de la Junta Directiva, integrada por los mismos miembros del año anterior, con condiciones de mayor puntualidad en el pago de cuotas. Se acordó una estrategia para reducir la morosidad.

Sesión 30/08/1883 (41): se discutió principalmente la participación de la Asociación Veterinaria de las Riberas del Júcar en el Congreso Nacional Veterinario, programado para el 24 de octubre en Madrid. La Junta Directiva resaltó la importancia de este evento, destacando que su realización podría posicionar favorablemente a la profesión ante el gobierno y la sociedad, y facilitar la reforma de la enseñanza y el ejercicio profesional veterinario. Pese a la falta de iniciativa de los veterinarios en la capital de Valencia, la Asociación decidió elegir a Juan Morcillo y

Antonio Comins como representantes en el Congreso, asignando una cuota de 20 reales por socio para cubrir los gastos. Comins se comprometió a cubrir cualquier déficit si se alcanzaba una recaudación mínima. Lo acontecido con la asistencia al Congreso se trata en su propia sección.

Posteriormente se renueva la junta directiva (47) aunque la enfermedad del presidente Comins (50) retrasa la toma de posesión de la Junta (52).

Sesión 20/03/1884 (54): se dio un voto de agradecimiento a la Junta Directiva anterior, especialmente a Juan Morcillo, por su dedicación a la Asociación. La reunión también abordó la elección de la Junta Central de la Liga Nacional de Veterinarios, destacando a Juan Téllez Vicén como presidente y Rafael Espejo y del Rosal como primer vicepresidente, entre otros cargos que fueron aprobados unánimemente. Se decidió, además, enviar una solicitud al Ministro de Fomento para aprobar los acuerdos del Congreso Nacional de Veterinaria, con énfasis en la exigencia del grado de Bachiller en Artes para futuros estudiantes de veterinaria. También se aprobó el establecimiento de Juntas locales en cada distrito para facilitar la participación de los socios en las reuniones generales. Finalmente, se acordó reimprimir los estatutos de la Asociación en formato pequeño (16º) para distribuir a cada socio.

Sesión 15/05/1884 (59): referente al nombramiento de representantes en los distintos distritos de la Asociación. Los representantes aprobados fueron Juan Morcillo (Játiva), José Llorca (Enguera), José María Rigal (Onteniente), Francisco Miguel Fabra (Albaida), Vicente Peiró (Oliva), Andrés Castellote (Sueca), Santiago Arévalo (Torrente), Bernardo del Poyo (Carlet) y Rafael Bernabeu (Alberique). Estos nombramientos se publicarán en el periódico de la Asociación, y los designados dispondrán de un mes para cumplir con sus responsabilidades y comunicar los resultados a la Junta Directiva. Posteriormente se remitió circular dirigida a los representantes de los partidos para conocer presidente, vicepresidente y secretario de cada región (67).

Sesión 20/10/1884 (68): se discutieron temas como el aumento de sueldo de los inspectores de carnes y la erradicación del intrusismo, así como la formación de comisiones para implementar los acuerdos. Además, se resolvió que se publicarán en el periódico de la Asociación los nombres de los socios y suscriptores con deudas mayores a tres trimestres de suscripción, y se iniciarán acciones legales para recuperar las cuotas

pendientes. Estos acuerdos fueron tomados ante la falta de respuesta de algunos socios a comunicaciones previas y reflejan el compromiso de la Junta Directiva por fortalecer la Asociación, incluso si esto implica la expulsión de miembros apáticos o morosos.

Sesión 5/03/1885 (77): El presidente, en cumplimiento del artículo 23 de los Estatutos, propuso la renovación de la Junta Directiva, resultando reelegida la presidida por Antonio Comins. En respuesta a quejas sobre socios morosos con deudas de cuatro a diez trimestres, se decidió expulsar a aquellos con deudas superiores a dos trimestres si no saldan sus pagos antes del 31 de marzo, suspender el envío del periódico a partir del 30 de marzo para dichos socios, publicar una lista de morosos y sus deudas en el periódico, y proceder judicialmente contra los excluidos para exigir los pagos pendientes. Además, se leyó una circular de la Junta Central de la Liga de Veterinarios Españoles y se acordó publicar en La Alianza Veterinaria las reformas propuestas.

Sesión 02/09/1885 (89): La convocatoria tenía como objetivo discutir asuntos de la Asociación, centrándose en los retrasos en los pagos de algunos socios, lo cual afectaba la estabilidad financiera necesaria para cubrir los únicos gastos de la Asociación: los costos de imprenta. Tras una extensa discusión, se acordó que ser miembro de la Asociación no implicaba la obligación de suscribirse al periódico, permitiendo a quienes deseen retirarse de la suscripción informar al director de La Alianza Veterinaria antes de fin de mes. A los socios con deudas mayores a dos trimestres se les suspendería el envío del periódico hasta que regularicen sus pagos, recurriendo a medios legales de ser necesario. Si no se lograba reducir la suscripción a tres pesetas trimestrales, se acordó que el periódico pasaría a publicarse mensualmente con un costo proporcionalmente menor. La Junta Directiva expresó unánimemente su apoyo a la elección de Rafael Espejo y del Rosal como presidente de la Liga de Veterinarios Españoles, en reemplazo del fallecido Juan Téllez Vicén. Además, se incluyó en el periódico una propuesta para abrir una suscripción destinada a financiar un panteón en honor al catedrático Juan Téllez, tal como se sugirió en la “Gaceta Médico-Veterinaria” del 30 de agosto.

Sesión 23/11/1885 (94): En esta sesión se renovó la Junta Directiva de la Asociación, quedando conformada por Francisco Torres y Torres como presidente, Bernardo Ibáñez Valiente como vicepresidente, y José Cuquerella Fabregat como secretario y tesorero. Los vocales designados fueron José López Llagaría, Pascual Marí Fort y Vicente Almazán. También se acordó la exclusión de los socios con deudas, tras reiteradas

advertencias, y la publicación en el periódico de sus nombres, residencia y montos adeudados; en caso de incumplimiento, la Asociación recurriría a los tribunales. Andrés Castellote propuso incluir temas científicos o de interés profesional en el periódico para fomentar el debate entre socios y permitir la discusión de casos clínicos, propuesta que fue aceptada, dando libertad a los socios para elegir los temas. Posteriormente se notificó la toma de posesión (95).

El último aporte no es un acta de reunión, sino el triste “**Nuestros vaticinios se han cumplido. ¡Hemos muerto!**” (97). En un último editorial Morcillo expresa su desilusión por la desaparición de la revista, que atribuye a la falta de compromiso y apoyo financiero de varios socios. A pesar de los esfuerzos y sacrificios de algunos miembros comprometidos, otros incumplieron sus promesas y abandonaron sus obligaciones financieras, lo que dejó a la Junta Directiva sin medios para sostener el periódico. Morcillo lamenta la falta de solidaridad entre veterinarios y la apatía que, según él, ha debilitado tanto a la asociación como al colectivo veterinario en general. Aunque la publicación llega a su fin, reitera su apoyo a aquellos colegas que sí han cumplido sus compromisos y defiende su esfuerzo por una veterinaria unida y comprometida. Desaparece así una publicación pionera en su ámbito geográfico y el sueño de la veterinaria digna en la zona deberá mantenerse en letargo hasta 1897, con el inicio de un movimiento en Valencia que terminará resultando en el actual Ilustre Colegio Oficial de Veterinarios de Valencia.

Interesante por su información histórica son los **listados de socios** (5,6), en los cuales se incluía el importante dato de localidad de ejercicio. Esta información la se puede completar con las no tan honorables listas de morosos, que se tratan a continuación.

3.2.3. Impagos

Los problemas de impagos por parte de los miembros de la Asociación fueron norma general desde el inicio del proyecto. Desde el primer número aparecen advertencias con solicitud de pago de cuotas (1, 2, 7, 8-10, 13-17, 21, 23). Esto lleva a la Asociación a contraer deudas (18), y tal y como hemos visto en las actas de reunión se toman diferentes medidas, no siempre eficaces; además de las citadas en acta, se advirtió la **publicación de los nombres de los morosos** (24, 59), iniciando esa publicación en el (71). Las buenas palabras y promesas hicieron que en el (79) indicaran que no iban a continuar con la publicación de dicha lista ante el compromiso de ponerse al corriente de pago.

Como era de esperar, esto no sucedió, advirtiendo de nuevo a los morosos (82), y ante el desprecio por parte de los miembros (algunos amigos cercanos de la propia Junta de Gobierno de la Asociación), advirtiendo del potencial cierre de la publicación (87) se llegó a la publicación de todos ellos en las vísperas del cierre del proyecto en “Cumplimos con lo que se acordó en Junta General Ordinaria en la sesión del 23 de noviembre” (95). Tal vez, sabedores del pronto final de la publicación, el equipo de Morcillo no quiso que la posteridad perdiera ese dato.

3.2.4. *Intrusismo y dignidad profesional*

Posiblemente, las publicaciones de La Alianza Veterinaria sobre el intrusismo y la defensa de la profesión sean la parte más importante de su contenido, en la medida que son el eje conductor y central de la publicación. Aunque en 1871 se había publicado el Reglamento que unificaba los títulos de las diferentes Escuelas, existe en ese momento una dispersión de los títulos ya existentes: veterinarios de 1ª clase, de 2ª clase, de 2ª clase por pasantía, de 2ª clase con tres años de carrera, los procedentes de las escuelas libres, sin olvidar a los aún en ejercicio albéitares, albéitares-herradores, herradores castradores, y mancebos de albéitar (Benito Hernández, 2003). Un caldo de cultivo ideal para el conflicto.

Apenas dos meses tras el inicio de la publicación, se llega a un acuerdo para obtener datos sobre la realidad del intrusismo, y la capacidad de las poblaciones para tener veterinarios en las funciones de inspección, así como la existencia de subdelegados (4).

La **realidad del intrusismo** es tratada de forma detallada y desde múltiples ángulos. Algunos artículos son como “Los veterinarios postergados por los intrusos” (6), donde refleja la desesperanza y frustración de los veterinarios hacia la falta de regulación eficaz contra los intrusos, personas que ejercen la profesión veterinaria sin título, afectando gravemente la subsistencia y dignidad de los profesionales autorizados. Los veterinarios denuncian la ineficacia de la ley, la falta de apoyo de las autoridades y la permisividad hacia estos intrusos, a menudo amparados por el caciquismo y en ocasiones por los mismos compañeros veterinarios. Además, se plantea la necesidad urgente de una acción conjunta de las asociaciones veterinarias para llevar esta problemática al ministro de Fomento y solicitar reformas que dignifiquen y protejan el ejercicio profesional en España; o posteriormente, la carta remitida por José Llorca sobre el intrusismo (30), donde expone su frustración por la falta de

acción efectiva contra el intrusismo, proponiendo un plan en el cual los subdelegados y veterinarios colaboren para identificar y denunciar legalmente a los intrusos en sus respectivos distritos. La redacción responde a Llorca, informándole que ya se ha recurrido al Gobernador civil y que, además, están en contacto con otras asociaciones para solicitar al Ministro de Fomento una intervención. También mencionan la esperanza depositada en un Congreso Nacional Veterinario en Madrid (y que trataremos más adelante), aunque reconocen que, si estas iniciativas fallan, el panorama para la veterinaria seguirá siendo desalentador.

En relación con la **carta del ministro**, seguirá en (10, 11, 38, 57), aunque como se intuye, no tuvo el impacto que se esperaba, justificando la “Teoría escéptica” que Morcillo esgrime y se traslada en otros muchos de sus escritos (Morcillo Olalla, J., 1866). Este final se traslada en “No seremos oídos” (75) y desde el prisma de la decadencia de la cría caballar, critica la falta de apoyo institucional.

Otro escrito en la misma línea fue “Los intrusos” (31) donde se señala la problemática del intrusismo en la profesión veterinaria, que afecta tanto a los derechos adquiridos por los profesionales como a la economía de la clase. La situación es agravada por la falta de interés del gobierno y de las autoridades locales, así como por la apatía y falta de cohesión entre los propios veterinarios. Se observa que, mientras otras profesiones gozan de protección legal contra intrusos, la veterinaria sigue vulnerable ante la falta de regulación efectiva. Se critica, además, la existencia de cinco escuelas veterinarias en España, comparándolas desfavorablemente con las tres de Francia.

Vemos nuevas cartas con ejemplos de intrusismo y su denuncia en (36), con una extensa carta de José Llorca al respecto (66, 67) en la que pide la toma de medidas judiciales.

Por poner un último ejemplo de estas situaciones, en “Los ratones cazando al gato” (83), se relata el caso del veterinario Eloy Gil, quien enfrenta denuncias en su contra por parte de intrusos en Lucena del Cid y Useras, acusándolo de permitir a su ayudante realizar herrados en su ausencia. A pesar de una Real Orden que permite a los ayudantes ciertas prácticas, los tribunales fallaron en su contra, sentando un peligroso precedente para la profesión.

La lucha contra el intrusismo tuvo otros dos frentes muy interesantes. El primero lo encontramos en un choque entre la **veterinaria civil**

y **militar**, que se inicia al abordar la falta de herradores de calidad en el ejército y el peligro de licencias para herradores no veterinarios (21), y que es continuado por Morcillo ante los argumentos planteados por el veterinario militar Joaquín Ferrer Gisbert (25).

Otro tema tratado fue la **inspección oficial de carnes**. Comenzando en “Higiene pública. Defectos de que adolece en Játiva con relación a la inspección de carnes” (33), y vinculado a un artículo del (32), denuncia el papel de inspector por parte de albéitar-herrador. La situación de Morcillo en este caso ha sido ampliamente tratada en obras como (Aganzo Salido, 2009). La revista es crítica (muy crítica) en este caso, sobre todo cuando compara los procesos de adjudicación de plazas con la capital (en “Lo que debe ser”) (33). Además de ser crítico con su gremio, también lo es con otras titulaciones que quieren obtener estos privilegios de inspección, especialmente médicos y farmacéuticos (en “El Peligro”) (34), que continuará “¡En Córdoba!” (63), “Inspectores de Carnes” (64) y “Se confirmó lo de Córdoba” (69) Como ya hemos visto, en (77) dio publicidad a la autoridad legal del gremio veterinario en exclusiva en estos puntos, abogando por su reconocimiento (37, 69).

Es curioso, significativo y evocador, como, a ojos de Morcillo, tan ineficaz en la inspección de matadero era un herrador como un médico. Y no es un punto de vista descabellado, ya que lo que trata de defender es la profesión y a la población, con los mejores profesionales posibles. Este punto se desarrolla en “Los veterinarios y su importancia ante la cuestión social de la alimentación de las clases obreras” (65, 70) donde destaca la importancia de los veterinarios en la alimentación y **bienestar de las clases obreras**, al resaltar su rol en la producción y control de alimentos de origen animal. Argumenta que los veterinarios, con su conocimiento en sanidad y ganadería, pueden contribuir a reducir el precio de la carne y mejorar la calidad de los alimentos, esenciales para el sustento de los trabajadores. También insta a que se incremente la capacitación de los veterinarios y a que el gobierno apoye la ganadería y reduzca los impuestos sobre la carne, permitiendo así una mejor accesibilidad para las clases menos favorecidas. El precio alto de la carne y las malas condiciones de vivienda afectan la salud y estabilidad laboral de los obreros, lo cual incrementa el riesgo de huelgas y tensiones sociales. Sostiene que mejorar el acceso a alimentos nutritivos y asequibles, así como a viviendas saludables, es clave para reducir el descontento social y asegurar que los trabajadores, fundamentales para la economía, se mantengan en buenas condiciones de salud y productividad. Vemos que texto

tiene muchos puntos en común con sus Cartas Críticas (Morcillo Olalla, J., 1866).

La forma de afrontar el intrusismo es clara en la revista, y pasa siempre por la **defensa de la dignidad profesional**. Ya desde (1) haciéndose eco de “La Correspondencia de España”, donde se menciona que el delegado de la Escuela de Veterinaria de Madrid, Miguel López Martínez, ha presentado un plan de obras al Ministerio de Fomento para modernizar las instalaciones, la revista opina sobre la noticia señalando que sería ideal acompañarla con una reforma en la enseñanza.

El extenso “**La reforma**” (5-10, 12) expone la necesidad urgente de reformar la Veterinaria en España para superar los problemas estructurales que enfrenta. Señala que la sobreoferta de veterinarios, la falta de rigor en los exámenes, y el intrusismo (con herreros y personas sin formación ejerciendo funciones de veterinario) han contribuido al desprestigio de la profesión. Se argumenta que el intrusismo afecta tanto los ingresos como el reconocimiento social de los veterinarios, lo que dificulta cualquier avance en la dignificación de la profesión.

Propone que solo los aspirantes con nivel de bachillerato accedan a la formación, como sigue defendiendo en (40), unificando los criterios de ingreso y fortaleciendo los exámenes para asegurar que los graduados tengan un conocimiento sólido.

Este punto sobre las pruebas y ejercicios literarios de los alumnos (14) se ve ampliado con la reproducción de “La Gaceta Médico-Veterinaria” examina la validez de los estudios privados para obtener títulos académicos en comparación con los estudios oficiales. Lo interesante es que el periódico plantea varias preguntas sobre el cumplimiento de estos procedimientos, cuestionando si los tribunales de examen están debidamente compuestos y si cumplen las normas establecidas. El argumento es ampliado en (15,23), especialmente tratando la línea de los diferentes títulos y sus capacidades, y se materializa en una carta de Juan Chordá Montó sobre una posible negligencia de Juan Enguix Fabra (24). Posteriormente se abordará en “**Validez de los títulos**” (61) y su contestación (64). Y no sólo de los títulos, sino de las condiciones de **apertura de los centros** (9) cuando hace hincapié en una disposición emitida por el Ministerio de la Gobernación en 1859 por la que ningún veterinario, albéitar-herrador o herrador tiene permitido abrir más de un establecimiento, banco o tienda, y dicho establecimiento debe estar ubicado exclusivamente en el pueblo

de su residencia habitual. La resolución surge a partir de una denuncia sobre intrusiones y abusos en el ejercicio de la veterinaria en el partido de Manacor (Baleares). Un herrador llamado Antonio Roig había solicitado permiso para mantener un segundo establecimiento en un pueblo distinto al de su residencia, pero esta solicitud fue rechazada por el Consejo de Sanidad. Los fundamentos de la negativa incluyen que el herrado de caballos es parte de la ciencia veterinaria y no debe considerarse una simple actividad industrial o mecánica. También se argumenta que el herrado de caballos requiere supervisión directa y que permitir establecimientos en distintos lugares sería una elusión de la ley.

Siguiendo con “La Reforma”, se destaca la importancia de la instrucción práctica, especialmente en áreas clave como la patología y la cirugía. Esto también se tratará en “Lo que debe ser”, de Rafael Bernabeu (22) (no confundir con otro artículo de igual nombre ya citado en el 33), y posteriormente en “Lo que fue, lo que es y lo que debe ser el veterinario” (46) y “Los veterinarios y su importancia” (68).

Se aboga también por la **creación de asociaciones** veterinarias que defiendan los intereses de la profesión, luchando contra el intrusismo y apoyando la reforma educativa. En “Las Asociaciones en Veterinaria” (2) impulsa la creación de asociaciones veterinarias que fortalezcan la solidaridad y promuevan reformas en el ejercicio profesional. La meta final sería que la profesión veterinaria alcance una consideración social comparable a la de otras ciencias, y que los veterinarios gocen de respeto y una mejor condición económica en España, como traslada en “A las clases médicas, farmacéuticas y veterinarias”, trayendo un artículo de “El diario Médico-farmacéutico” donde intenta levantar el decaído espíritu de médicos, farmacéuticos y veterinarios (54).

De forma complementaria, el tema siguió abierto hasta “¿Puede demorarse la reforma en la enseñanza veterinaria?” (42).

Y si algo es significativo es que, ante este panorama, y a pesar del escepticismo, siempre se trató de aportar por parte de la revista soluciones, no conformándose con lo visto. Ejemplos de sus medidas son “Nuestra decadencia y medios de evitarla sobre el estado de la profesión” (35), o “Lo que debe hacerse” (94).

No todo fue conflicto en esta defensa. Una de las **cartas (y su respuesta)** más interesante en esta sección es la dirigida por un joven de nombre Néstor (53) que escribe a Morcillo para expresar su apoyo a los

acuerdos del Congreso Nacional Veterinario y su decepción ante ciertos periódicos que desacreditan el evento, generando dudas y desconfianza en la profesión. Sorprendido por el cambio de postura de algunos veteranos que antes defendían el progreso y ahora lo consideran perjudicial, Néstor solicita a Morcillo una explicación clara de la situación para entender los obstáculos actuales. Pide mantener la fe en la reforma y el avance de la veterinaria, confiando en figuras respetadas como Téllez, Espejo y Llorente. Como no podía ser de otra forma, Morcillo contesta (55,56,58) y expresa una crítica detallada sobre la situación de la profesión veterinaria y las barreras para su progreso. Comienza subrayando las deficiencias en las Escuelas de Veterinaria, que considera obsoletas e incapaces de brindar una formación adecuada en anatomía, fisiología, clínica y zootecnia. Defiende las reformas acordadas en el Congreso Nacional Veterinario, como exigir el título de Bachiller en Artes y actualizar el currículo, propuestas que él y muchos consideran esenciales para dignificar y modernizar la profesión en comparación con las escuelas europeas. No obstante, lamenta que una minoría de colegas, a quienes considera guiados por el egoísmo y la envidia, se oponen a estos avances y desacreditan el Congreso, refiriéndose despectivamente a sus participantes como "aldeanos". Esta oposición, para él, solo busca frenar el progreso para mantener la antigua preeminencia de ciertos individuos en la profesión. Además, critica la apatía generalizada en el profesorado, atribuyendo esta indiferencia a la falta de formación y de comprensión del valor de la ciencia para la sociedad. Pese a la oposición y la lentitud del cambio, debido también a la inestabilidad política, el autor sostiene que la unidad y la constancia en torno a estas reformas permitirán que la veterinaria alcance el reconocimiento social que merece. Un detalle que puede pasar desapercibido, pero que nos ha sorprendido sobremanera, es su firma en este artículo, en el que firma simplemente como "Juan". Es la única vez que aparece un trabajo de Morcillo firmado así, ya que normalmente indicaba J.M. o simplemente su apellido. Probablemente sea debido al tono cercano en que el joven veterinario se acerca en el escrito, creando una bonita imagen de un Juan Morcillo ya de 56 años que se mantiene protector y familiar frente al joven que le plantea sus inquietudes.

Entre las curiosidades de esta sección aparece que, tras una extraña reseña sobre **los jamones de Pontevedra** (13), seguida de una nota distendida sobre el tema (14), llega "Judas Iscariote comparado a los Judas actuales", un críptico editorial sobre traidores a la profesión con alusión a los jamones de Pontevedra (17), y con fe de erratas en número (18). Su siguiente número trata la escuela veterinaria de Santiago (19),

expresando la frustración de los veterinarios españoles ante la creación de una nueva Escuela Veterinaria en Santiago de Compostela. Consideran que esta decisión, en lugar de ayudar a la profesión, agrava su precariedad económica al aumentar el número de egresados en una ocupación ya sobresaturada y mal valorada en la sociedad. La opinión general es que la iniciativa ha sido impulsada por influencias externas con intereses particulares, y se cuestiona si el Ministro de Fomento, Sr. Albareda, ha comprendido las repercusiones de esta decisión. Los veterinarios instan al gobierno a atender sus necesidades y sus quejas, para poder implementar reformas que realmente dignifiquen la profesión en lugar de devaluarla.

Para darle un nuevo giro a la historia, y ayudando a entender por dónde iba la trama, se publica “El sueño y la realidad” (27-29), que sin tener en principio relación directa, presenta un curioso “ensueño”. En el texto, un narrador describe un encuentro en un vagón de tren de tercera clase en dirección a Madrid. Un pasajero, un herrero pobre, le cuenta su historia y su plan impulsado por una visión onírica. El herrero, guiado por su sueño y una visita mística de un supuesto “vampiro”, decide llevar consigo monedas de oro y jamones, con la esperanza de obtener una licencia profesional en la capital. El herrero explica que, tras un acto de devoción al santo Santiago, su aventura parece destinada al éxito. Eventualmente, a través de sobornos y aparentes contactos en altos lugares, consigue la licencia deseada, regresando a su ciudad natal entre celebraciones. El artículo critica veladamente el sistema y la corrupción burocrática de la época, pues, mediante este relato ficticio y satírico, el autor deja entrever la facilidad con la que se puede obtener una certificación sin mérito, contrastando el “ensueño” con la realidad de aquellos que sí se sacrifican y estudian. La historia refleja, además, una denuncia implícita contra la desmoralización en el sistema educativo y profesional, especialmente en el ámbito veterinario, y la creación de nuevas Escuelas de Veterinaria (en este caso, la de Santiago). Nos queda, con toda esta trama, algo más clara la acidez de los jamones de Pontevedra.

3.2.5. *El congreso Nacional de veterinaria de 1883*

El Congreso Nacional de Veterinaria de 1883 fue un acontecimiento de gran trascendencia para toda la profesión, y representaba los ideales que Morcillo perseguía en el desarrollo de una Veterinaria digna.

El seguimiento del congreso se inicia con “**Será verdad?** Sobre un posible congreso de veterinaria en 1883” (20), y continuó siendo

tratado en los números (24, 30, 37, 38) llegando a convocar una Junta General Extraordinaria (39) para designar a los representantes para el congreso que se enviaría la Asociación (42).

En “El entusiasmo y la abnegación” (43) se refleja la frustración y descontento de los autores ante la falta de compromiso y apatía de algunos veterinarios dentro de la Asociación. El artículo critica que muchos socios ignoraron el acuerdo de la sesión extraordinaria del 30 de agosto mostrando así desprecio por los esfuerzos de los representantes y la Asociación. Aunque estos representantes hicieron sacrificios personales para asistir al Congreso Nacional Veterinario en Madrid, los socios incumplieron su compromiso de aportar una cuota para **cubrir los gastos**, lo que llevó a la decisión de los representantes de asistir como espectadores y no como delegados de la Asociación.

Esto se materializa en “Ausencia de los veterinarios valencianos en el Congreso Nacional Veterinario” (44), que aborda el que, aunque todos los veterinarios coinciden en la necesidad de reformar la enseñanza y práctica veterinaria en España, especialmente para alinearse con los estándares europeos, la iniciativa de asistir al Congreso fue ignorada por la mayoría de los veterinarios de la provincia de Valencia. Se destaca que los veterinarios valencianos, quienes más deberían beneficiarse de las reformas, han mostrado **indiferencia y desprecio** hacia el Congreso. Algunos, debido a su posición social y económica, se desentienden del progreso de la veterinaria, lo cual los autores consideran una traición a la profesión. Los autores elogian a los pocos miembros que sí contribuyeron económicamente para asistir al Congreso, pero mencionan que la cantidad recaudada fue insuficiente, y que, por justicia, los representantes decidieron no asistir en nombre de la Asociación. Esta decisión se anuncia junto a una lista de los socios que cumplieron y aquellos que no pagaron. Se hizo un **resumen del Congreso Nacional Veterinario** (45). La ceremonia inaugural, presidida por el rector de la Universidad Central, mostró el compromiso de diversos sectores con la profesión veterinaria. Durante las sesiones, se debatieron y acordaron varias reformas esenciales, como exigir el título de Bachiller para ingresar a la carrera veterinaria, mejorar la instrucción teórico-práctica en las escuelas y reducir el número de instituciones a tres, ubicadas en lugares adecuados para una enseñanza integral. Los líderes del congreso, especialmente Téllez, Llorente y Espejo, fueron elogiados por su dedicación y coraje en enfrentar las dificultades de la profesión. No obstante, el artículo señala la decepción por la ausencia de algunos catedráticos y veterinarios de

renombre, quienes se apartaron debido a diferencias personales, poniendo en duda su compromiso con el avance de la Veterinaria.

Contesta a las “**Falsas apreciaciones** de algunos veterinarios sobre el Congreso Nacional Veterinario” (47) indicando que no fue un acto impulsado por ilusiones o intereses personales de sus participantes, sino por el genuino deseo de reformar la enseñanza y ejercicio de esta profesión. Los asistentes buscaron enfrentar y reducir los problemas y abusos que aquejaban a la clase veterinaria, especialmente en relación con la falta de regulación y el exceso de profesionales. El artículo llama a la juventud a apoyar las reformas y a no desalentarse si los resultados no se ven de inmediato.

Aparecieron también dos recordatorios para los que quieran la **medalla** conmemorativa del Congreso Nacional Veterinario (54, 62).

Fruto de aquel primer congreso, nace la **Liga de Veterinarios Españoles** (65), y se traslada la información de que el 11 de agosto de 1884, la Junta Central interina de la Liga de Veterinarios Españoles se reunió para establecer su directiva definitiva. Bajo la presidencia de Rafael Espejo, en ausencia de Juan Téllez Vicén debido a su delicado estado de salud, se confirmaron los nombramientos de Téllez como presidente y de otros destacados veterinarios en puestos clave, incluyendo a Félix Llorente como secretario general y a Román Ortiz Landázuri como tesorero. También se creó una comisión para redactar el reglamento, integrada por Llorente, Fernández Tallan, Coya, Oñate y Espejo.

Tras el Congreso y la creación de la Liga, se acordó un **Cuestionario** (71, 72) que fue ampliamente disertado en “Nuestra opinión sobre el Cuestionario” (75-85). Los artículos narran como los participantes del Congreso Nacional Veterinario de octubre de 1883, comprometidos con la defensa de la profesión veterinaria, expresan su respaldo a la Junta Central de la Liga de Veterinarios Españoles y su satisfacción con el cuestionario presentado en la sesión del 16 de noviembre. Consideran que este cuestionario abarca las reformas esenciales para fortalecer la profesión y recuperar los derechos que la ley concede a los veterinarios. La Asociación de las Riberas del Júcar, en particular, aplaude el esfuerzo y la dedicación de los líderes de la Liga, quienes buscan mejorar el estado de la ciencia y proteger a los veterinarios frente a injusticias, como la reciente sustitución de un inspector de carnes veterinario en Córdoba por dos médicos. La Junta Central defendió activamente al profesional

afectado, lo que refuerza la necesidad de apoyar la Liga, que representa la unidad y la fuerza colectiva del gremio. La Asociación Veterinaria de las Riberas del Júcar informó a sus miembros sobre la aceptación del cuestionario de la Junta Central de la Liga de Veterinarios Españoles, aprobado en noviembre, y lo incluyó en su publicación para promover su estudio y discusión en la próxima reunión. Este cuestionario abarca los temas prioritarios para el gremio, y se insta a los socios a enviar sus observaciones a los responsables de la Junta antes del 13 de mayo de 1886. Entre los temas figuran las reformas en el Reglamento de Subdelegaciones, la organización de los inspectores de alimentos, la promulgación de una ley de sanidad veterinaria, el combate al intrusismo, la mejora de las relaciones entre las asociaciones veterinarias, la recopilación de datos sanitarios, y la implicación oficial de los veterinarios en la gestión de la ganadería y la inspección de vías pecuarias. El artículo invita a los veterinarios a expresar sus opiniones sobre un cuestionario elaborado por la Junta Central de la Liga de Veterinarios Españoles. Se subraya la importancia de que todos los veterinarios colaboren para conocer mejor las necesidades y desafíos del sector, fortaleciendo la unidad del gremio en las peticiones al gobierno. El artículo también menciona un intento fallido de reunión de la asociación, retrasada por el mal clima, y detalla que su autor da su opinión, esperando correcciones si más adelante los socios aportan ideas adicionales. Sobre las reformas al reglamento de subdelegados, se expone que la falta de autoridad y recursos económicos limita el poder de acción de estos cargos. La propuesta sugiere que los subdelegados deben contar con reconocimiento y remuneración, responsabilidad clara y un proceso de selección por oposición que asegure el nombramiento de profesionales capacitados.

Aunque aquí termina lo acontecido con el primer congreso nacional de veterinaria, se vuelve a hacer alusión en el editorial que se publica sobre el **fallecimiento de Juan Téllez** titulado “Pérdida irreparable” (88). El artículo expresa el dolor y la responsabilidad que los veterinarios sienten al perder a Téllez, resaltando la necesidad de continuar con la reforma que él inició. Con el propósito de mejorar la enseñanza y el ejercicio de la veterinaria en España, Téllez alentaba a sus colegas a unirse en su lucha por la dignificación de la profesión, exhortándoles a no desfallecer en su empeño. A pesar de la tristeza y el golpe que significa su partida, el mensaje es claro: la clase veterinaria debe redoblar sus esfuerzos y mantener la unión para honrar su legado y alcanzar el respeto y reconocimiento social que el propio Téllez vislumbraba. Este tributo concluye con un llamado especialmente a los jóvenes veterinarios para que,

inspirados por el ejemplo de Téllez, eviten la apatía que ha afectado a la profesión y perseveren en la búsqueda de justicia y progreso, con la certeza de que el espíritu de Téllez vigila sus acciones desde la eternidad.

La última alusión al Congreso y la Liga de Veterinarios está en el extracto del **discurso pronunciado por Rafael Espejo del Rosal** en la sesión de la Liga nacional de los Veterinarios españoles (92).

3.2.6. *Necrológicas*

Como órgano de difusión, la revista se hace eco de los fallecimientos de los miembros de la corporación.

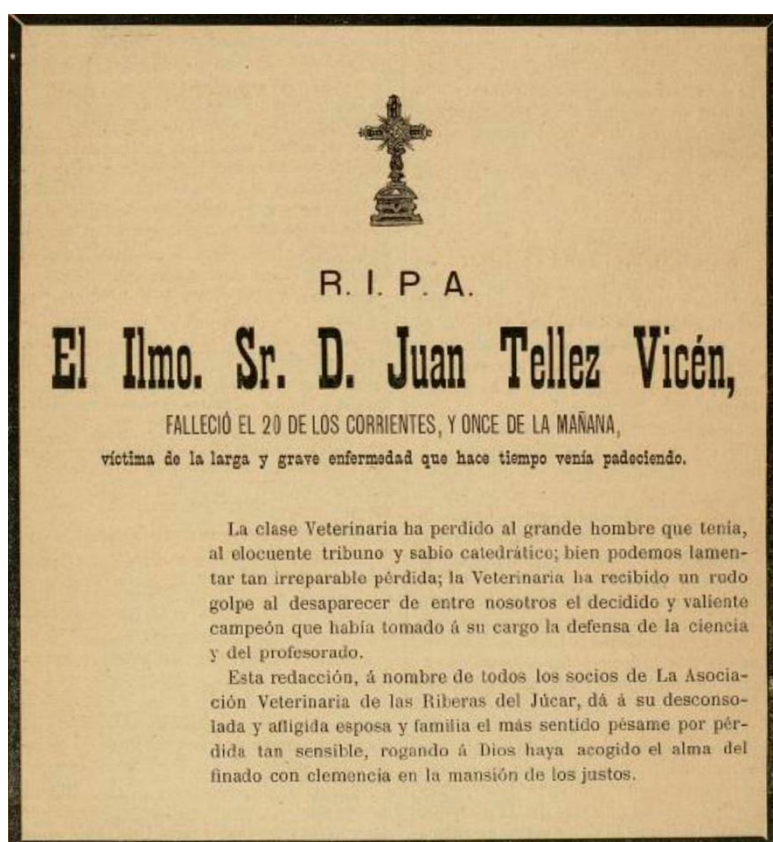


ILUSTRACIÓN 2. Necrológica de Juan Téllez Vicén.

En formato de anuncio, se comunica el fallecimiento de Salvador Sumsi y López (7), quien fuera vocal 1º y vicesecretario en la fundación de la Asociación.

En formato necrológicas se publican las de Francisco Pérez (19), José Cubas Herreros (26), José Abad (27), Juan Chordá y Montó (37), Antonio Rodríguez López (80), y Jaime Marí (87), del que posteriormente darán el anuncio del traspaso de su local. Destaca especialmente la necrológica de Juan Téllez Vicén (88) (Ilustración 2), que se publicó a página completa en portada, acompañada de un amplio artículo llamado “Pérdida irreparable” en el mismo número, que ya ha sido mencionado.

3.3. Contenido científico

3.3.1. Libros incluidos

Como se ha comentado en la descripción del formato, a partir del número 11 se comienzan a entregar diferentes libros en librillos de cuatro que contenían ocho páginas de la obra.

En total, se repartieron (hay que recordar, dentro del coste que tenía la suscripción) cinco obras diferentes. Los libros habían sido publicados ese mismo año, por lo que son trabajos novedosos. Hay que entender también que era habitual en la época, con el fin de no tener que hacer desembolsos muy cuantiosos, que los libros pudieran adquirirse en las librerías o editoriales por fascículos, que podían ser luego encuadernados juntos (Se puede comprobar en el propio anuncio del Diccionario general de veterinaria, de Rafael Espejo, que será tratado más adelante en la sección “Anuncios”). Este dato también aclara la multitud de retapados diferentes con que se pueden encontrar algunas obras de dicha época.

Los libros entregados fueron:

- Patología especial del tétanos; consideraciones principalmente bajo el punto de vista del tratamiento (Morcillo Olalla, J., 1882) (11-13, 16-19).
- Exterior del caballo. De los reconocimientos a sanidad (Morcillo Olalla, J., 1882) (19-21, 23-25).
- Bibliografía veterinaria española (Morcillo Olalla, J., 1883) (26-69).
- De la indigestión en los solípedos (Morcillo Olalla, J., 1884) (70-74, 76-83).
- Patología especial del carbunco y su profilaxis por la vacunación (Díaz Real, 1885) (84-97).

El número 19 tiene una hoja (cuatro páginas) de dos libros distintos, ya que Patología especial del tétanos y Exterior del caballo se publicaron de forma conjunta en formato libro por B. Bellver con numeración de páginas correlativa.

3.3.2. *Artículos científicos y reseñas clínicas*

Aún con un componente científico salvaguardado por la publicación de los libros citados anteriormente, la revista también muestra a dos interesantes por el papel de difusión que aportan. Algunos de ellos son traducciones, otros aportaciones originales o descripciones de casos clínicos. Puesto que los títulos describen por sí mismos el contenido, no procede su análisis en profundidad. Los títulos, ordenados de forma alfabética por el tema tratado, junto con los números en que aparecen, son:

- Arenaria rubra, por Andrés Castellote Lerma (8, 9).
- Caballos de las estepas rusas (60, 61).
- Clínica quirúrgica, por Antonio Raya (15).
- Cólera morbo asiático. A la espera del enemigo (62).
- Decadencia de nuestra ganadería por Juan Morcillo (85-87).
- Despalme parcial por Antonio Rodríguez (93).
- Elixir anticólico de D. Camilo Miravet Alcañiz (22, 33, 34). Apareció una reseña clínica sobre su buen resultado, antes del comienzo de la publicación de sus anuncios.
- Enteritis aguda, rotura del diafragma, muerte y autopsia. Historia clínica por José Díaz Real y respondido por Luis Rodríguez (3).
- Estadísticas de ganados en Francia (87).
- Fiebre mucoso-adinámica por Juan Morcillo (4, 5).
- Filoxera. A los vinicultores (5).
- Fluxión periódica del caballo (41, 42, 45, 46, 49-58, 60-65, 67, 71-73). Se trata de traducciones de la obra de Mr. Bernard.
- Fractura de cúbito por Juan Morcillo (59).
- Gabarro cartilaginoso. - Operación. - Curación por Vicente García Gil (1).
- Herida con derrame sinovial, tratamiento con la pasta obturadora de Téllez, por Andrés Castellote Lerma (57).
- Herida penetrante en la articulación tarsiana de un macho joven, herido por una mula. Historia clínica de un caso remitido por José Díaz Real (40).

- Higiene (50-51).
- Influencia del agua en la vida de los seres orgánicos por Vicente Jorge (6).
- Inspección de carnes. La triquina en Valencia (32). Escrito en relación con su manuscrito de Villar del Arzobispo (Morcillo Olalla, J., 1877), y a nuevos brotes sucedidos por toda España. Añade una crítica al intrusismo profesional al respecto en Játiva.
- Inspección de matadero. Artículo publicado en El eco del Júcar (17).
- Inyecciones hipodérmicas en las afecciones reumáticas de la región escapulohumeral (35).
- La agricultura y la filoxera. Trata de la memoria presentada al certamen literario musical de Manresa por el veterinario José Vida y Tapias (58).
- Los perros (5) Sobre el inicio de unidades caninas en el ejército.
- Neumonía aguda, esguince húmero radio cubital, puntura. Por José M. Alvero (91).
- Pasteur se preocupa al mundo entero con sus experimentos para la curación de la rabia (97).
- Perra nodriza de conejos (5).
- Pinturas de la cara plantar del casco, por Juan Morcillo. (88, 90, 91, 93-96).
- Prohibición de la matanza del cerdo en la provincia de Valencia (39).
- Pterigión. - Uña. Extirpación del cuerpo clignotante. - Curación. Por Vicente García Miquel (1).
- Rabia. El primer número por Vicente Jorge, continuado por Juan Morcillo (16-18).
- Sarna. Por Pedro Martínez de Anguiano (60).
- Tétanos esencial en un caballo. Curación. Por Antonio Rodríguez y Fayos (74).
- Tópico Chiva (reseña) (12, 15).
- Tratamiento antihelmíntico (35).
- Tratamiento del corea por medio del ácido arsenioso y el arseniato de estricnina (60).
- Triquina en Málaga. En relación con información de La Correspondencia de España de 11/02/1883 (28).
- Triquina. Estadística prusiana (10).

- Virus carbuncoso (inoculación) como medio preservativo del carbunco, por José Díaz Real (48).

3.4. Los anuncios

Una de las fuentes de financiación de la publicación fueron los anuncios. No obstante, los anuncios publicados seguían el mismo criterio ético que el resto de los artículos. No se trataba sólo de un anuncio, sino que eran una apuesta de calidad, pasando del mero máquetin de venta a ser recomendaciones, en la gran mayoría de veces acompañadas de la propia experiencia de los editores del periódico. Son relevantes en esto los preparados de la Farmacia Cucala (especialmente el tópico Cucala), el tópico Chiva y el del Sr. Miravet, que previamente a la publicación de sus anuncios fueron objeto de revisiones de su efectividad. Esta combinación entre ciencia/Asociación es la que ha llevado a analizar este apartado fuera de ambas secciones anteriores.

3.4.1. Anuncios de productos o servicios

A continuación, se describe los anuncios de productos o servicios aparecidos con los ejemplares donde lo hace. Se ha incluido la dirección de venta de dicho producto para entender mejor el ámbito geográfico:

- Almacén de herraduras de D. José Remuhí. Calle Tapinería número 26, Valencia. (19,20,26,27,34,35,52,53,55-57,74-76).
- Específicos preparados por el licenciado en Farmacia D. Fernando Cucala y Colomer, plaza de San Francisco nº2 botica, Játiva. El anuncio presenta variaciones, siendo los productos anunciados combinados en diferentes formas, pero siendo estos:
 - Oleína vesicante y resolutive. Tópico Cucala.
 - Remedio seguro para curar las toses crónicas del caballo.
 - Agua purgante de San Vicente, depurativa, tónica y laxante.
 - Agua milagrosa. Específico para tercianas y cuartanas.
 - Rob de Laffecteur.
 - Cosmético divino de Cleopatra. Agua para dar tersura, blancura suavidad y hermosura al cutis.
 - Licor de brea.
 - Pasta pectoral. Remedio infalible para curar radicalmente la tos.
 - Polvos escaróticos contra las espundias.

- Extracto pectoral de médula de vaca o tesoro del pecho.
- Lactijeno

La cantidad y fidelidad de los anuncios de Cucala son reseñables, ya que aparece en 70 de los 97 números (16-36, 38-72, 74-90).

- Tópico Chiva. Por D. Modesto Chiva y Genovés, veterinario. Plaza del Ángel, 7, entresuelo izquierdo, Valencia, y oficinas de farmacia. Previamente a los anuncios aparecen reseñas en los números (12, 15). (30, 43, 72-91, 95-97).
- Tópico potencial y el elixir anticólico del Sr. Miravet. Previamente a los anuncios, apareció como reseña en el número 22. (29-31, 35, 41-47, 49-51, 54-57).

Por último, aparecen también anuncios más “mundanos” y comerciales, como son anuncios de traspasos. Se anuncian los de los establecimientos veterinarios de Mariano Bellver (Plaza Portal nuevo 3, Valencia) (5, 7), el de Pascual Remuhí (Torrente) (11, 12), y el de Jaime Marí (falleció por cólera, Silla) (87), y un anuncio indicando la búsqueda de un forjador para la provincia de Albacete, con contacto para interesados con Carmelo Iborra o Juan Morcillo (9).

3.4.2. *Anuncios de publicaciones*

No solo se anunciaban productos, sino también publicaciones. Vemos en ellas que las obras de Rafael Espejo eran clara referencia de calidad científica, y aparecen en la gran mayoría de números. Morcillo también publicita sus propias obras, pero no es algo que pueda afeársele, ya que también las adjunta a los propios ejemplares por fascículos como hemos visto.

Las obras se han ordenado por orden alfabético, con el ejemplar en que aparece al final.

- Almanaque de veterinaria para 1885 de José M. Alvero. Ayora, Valencia. (70).
- Arte de herrar y forjar, de M. Rey, traducido por Rafael Espejo y del Rosal. Publicado por la Gaceta Médico-Veterinaria, calle de la Madera Baja 19 cuarto bajo, y librería de P. calleja y Compañía, calle carretas 33, ambos en Madrid. (31,35).

- Bibliografía veterinaria española, por Juan Morcillo Olalla. Mismas librerías que la Guía del Veterinario. (71-97).
- Biblioteca Alvero. Colección escogida de obras de Veterinaria. Por José M. Alvero. Ayora (93-97).
- Diccionario especial del Sr. Isaac García. En Gimileo, provincia de Logroño (23).
- Diccionario general de Veterinaria, por Rafael Espejo y del Rosal. calle de la Madera Baja 19 cuarto bajo. Posibilidad de comprar a plazos o por entregas. (8, 10, 24, 26, 29-32, 34-36, 46, 47, 49-54, 58-69, 71-73, 75, 87-91, 93-97).
- El herrado. Motivos que se oponen a su separación de la medicina veterinaria según la ciencia, la razón y la justicia, por Rafael Espejo y del Rosal. En la Gaceta Médico-veterinaria, principales librerías de Madrid y administración de El Monitor (2, 4, 7, 12, 14, 22-24, 26, 29-36).
- El indispensable a los veterinarios. Libro utilísimo y de frecuente consulta para los profesores, por Rafael Espejo y del Rosal. Venta en casa del autor, Cava Alta nº9 principal derecha Madrid, principales librerías y administración de El Monitor (2, 4, 6, 7, 11, 12, 20-23, 29, 31, 34-36, 40, 41, 43).
- Guía del veterinario inspector de carnes por Juan Morcillo Olalla, veterinario de 1ª clase. Segunda edición (1, 2, 4, 6-8, 10). Esta obra sería posteriormente entregada en fascículos con la publicación.
- Guía del veterinario inspector de carnes. Tercera edición. Por Juan Morcillo Olalla, veterinario de 1ª clase. A la venta en librerías en Madrid, Zaragoza, León, Valencia, Sevilla, Barcelona, Murcia y Játiva (44-97). En el (43) aparece no como anuncio, sino como reseña. Sin ser un anuncio de publicación tal cual, aparece el aviso de la publicación de nuevos cuadernillos de la Guía del Inspector en su edición 3ª (10-24 para el tomo 1, 25-42 para el tomo 2).
- La Correspondencia de España, diario universal, y La broma, semanario político ilustrado (22, 23).
- Manual práctico de las inyecciones traqueales en el caballo. Nuevo método terapéutico para el tratamiento de las enfermedades de los

animales domésticos, por el Dr. G. Levi, profesor de la Universidad de Pisa. Traducción española por José Rodríguez y García (72, 73, 75-91, 93-97).

- Novísimo Cabero, o instituciones de albeitería, arreglado a las ideas modernas, por Guillermo Sampetro, Librería P. Calleja y compañía (4, 6, 7, 10).
- Patología y terapéutica veterinaria por Eugenio Fernández e Isasmendi. Venta en casa del autor, calle de las Aguas 8, segundo derecha Madrid (91-94).
- Tratado de la cría caballar, mular y asnal, y nociones de equitación por Rafael Espejo y del Rosal, profesor veterinario de primera clase y licenciado en medicina y cirugía (8, 10, 12, 22).

4. CONCLUSIONES

La Alianza Veterinaria fue una revista innovadora y relevante en un contexto social, profesional, geográfico y económico complejo y difícil. Recuperar su contenido permite recuperar una imagen de la historia veterinaria valenciana perdida en el tiempo, abriendo la ventana de futuras investigaciones a raíz de las informaciones encontradas. El primer paso para ello ha sido la confección de esta hemerografía, con el fin de dar visibilidad y mejor acceso a los contenidos. Sumado a la puesta en abierto de las versiones digitales, podemos dar este objetivo por cumplido.

Respecto a su contenido, vemos una obra que afrontó dos problemas claves: el bajo nivel científico de muchos de sus miembros, y un intrusismo generalizado asociado al poco respeto profesional de la clase veterinaria. Frente a este panorama, el periódico de Morcillo aboga por la mejora de la formación de sus lectores y la defensa de la dignidad profesional mediante la unidad y el asociacionismo. Estos retos y sus respuestas nos permiten ver mediante las publicaciones una imagen que da nueva luz a la interpretación de la veterinaria en la provincia de Valencia.

Como cierra Morcillo en su despedida del último número: “No por esto me separo de mis buenos amigos de esta localidad que me han acompañado hasta el momento de la crucifixión, y menos de los que componen la Junta Directiva de la Liga; tanto unos como otros me encontraran a su lado y sosteniendo las ideas de siempre”. Esperamos encontrarnos entre

estos veterinarios que estuvieron a la altura del ideal de una profesión veterinaria científica y digna.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Aganzo Salido, F. (2009). Algo más sobre la vida y la obra de Juan Morcillo y Olalla (1828-1908) en el centenario de su muerte. *Anales de la RACVE n°17* (pp. 55–86). Madrid: <http://www.racve.es/contenido/show/id/240>.
- [2] Aganzo Salido, F., Ruiz Moliner, A., & Jordá Moret, J. V. (2014). Sus más resonantes polémicas. *Compendio de los trabajos polimáticos del doctor veterinario D. Fernando Aganzo Salido*. Colegio de Veterinarios de Valencia.
- [3] Benito Hernández, M. (2003). *Del amanecer de las Escuelas de Veterinaria en España. Aportaciones al estudio de la Historia de la Veterinaria*. Moncada: Fundación Universitaria San Pablo-CEU.
- [4] Biblioteca Nacional de España. (2012, *Biblioteca digital hispánica*. <http://bdh.bne.es/bnearch/>. Díaz Real, J. (1885). *Patología especial del carbunco y su profilaxis por la vacunación. Ligeras consideraciones sobre el cólera de las gallinas y su vacunación. Septicemia y método listeriano*. Imprenta y librería de Blas Bellver.
- [5] Estarrona, J. M. (1845). *Boletín de Veterinaria, periódico oficial de la sociedad veterinaria de socorros mutuos*.
- [6] Fernández Sanz, J. J. (1995). Fichas analíticas. *La Prensa Veterinaria (I- hasta 1903)* (pp. 90). AACHE Editores.
- [7] Fernández Sanz, J. J. (1995). *La prensa veterinaria (I- hasta 1903)*. Guadalajara: Aache Ediciones.
- [8] Jordá Moret, J. V. (2011). Digitalización de la Hipografía 1870 (1ª Edición) de Juan Morcillo Olalla. *XVII Congreso Historia De La Veterinaria*.
- [9] Jordá Moret, J. V. (2024). *Juan Morcillo Olalla revisitado: nuevas aportaciones a través de nuevas tecnologías*. RACVE [Video] <https://www.youtube.com/watch?v=Q7M5cgzQznw>.
- [10] Martínez Revert, A. (2010). *La imprenta de Blai Bellver. El diseño gráfico y el producto impreso*. Campgràfic.

- [11] Morcillo Olalla, J. (1866). Cartas críticas. (pp. 123).
- [12] Morcillo Olalla, J. (1877). *Triquina y triquinosis. Examen Histórico-Crítico-Analítico de los sucesos ocurridos en el Villar de el Arzobispo en 1876. (Manuscrito).*
- [13] Morcillo Olalla, J. (1882). *La Alianza Veterinaria, periódico de la Asociación veterinaria de las riberas del Júcar.*
- [14] Morcillo Olalla, J. (1882). *Patología Especial del Tétanos, considerado principalmente bajo el punto de vista del tratamiento. Incluye: Exterior del Caballo. De los reconocimientos a sanidad.* Imprenta de Blas Bellver.
- [15] Morcillo Olalla, J. (1883). *Bibliografía Veterinaria Española.* Ed. Blas Bellver.
- [16] Morcillo Olalla, J. (1884). *De la indigestión en los solípedos.* Imprenta y Estereotipia de B. Bellver. Universidad Autónoma de Barcelona. (2024), *Dipòsit Digital de Documents* <https://ddd.uab.cat/>. Universidad de Córdoba. (2015), *Helvia.* <https://helvia.uco.es/>.

II PREMIO LABORATORIOS MEVET “CARLOS BUXADÉ CARBÓ”

RECUPERACIÓN DE LA PRODUCTIVIDAD DE LOS HUEVOS EN GALLINAS PONEDORAS DE SEGUNDO Y TERCER CICLO SUPLEMENTÁNDOLAS CON UNA FORMACIÓN FITOBIÓTICA; MÁS VIDA Y MÁS BIENESTAR PARA ESTAS AVES

LILIA GUTIÉRREZ OLVERA¹
HÉCTOR SALVADOR SUMANO LÓPEZ¹

RESUMEN

Dada la reconocida disminución en la producción de huevo y en la calidad del cascarón que experimentan las gallinas a partir del segundo ciclo de producción, se realiza un ensayo para evaluar la restauración de estas variables al administrar un preparado basado en fitobióticos (orégano, capsaicina y cúrcuma) y con base en un diseño farmacéutico económico que se ajuste a la fisiología digestiva de estas aves, mermada por la edad. En este ensayo se evaluó en grupos de 90 aves de segundo y tercer ciclo, cada uno con su respectivo control, la calidad del cascarón en términos de grosor y los porcentajes de postura, al adicionarles en la dieta un preparado de fitobióticos y calcio de liberación modificada. En los

¹ Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Profesor Titular TC-Farmacología Veterinaria.

grupos suplementados se obtuvo la restauración de la producción y se recuperaron las características del cascarón en tan solo 3 -5 días de suplementación del preparado. Esta respuesta se mantuvo en niveles indistinguibles con respecto a los basales de la línea genética, durante todo el ensayo (21 días). La suplementación del alimento con el preparado a base de fitobióticos y calcio de liberación modificada, es una alternativa económicamente viable para no utilizar aves de reemplazo y con ello, se disminuye la huella de carbón que implica su crianza y se evitan los costos que esto implica. El preparado permite la oportunidad de brindar a estas aves una vida más prolongada a nivel de unidades de producción intensiva y apoya la producción de huevo de traspatio.

ABSTRACT

Given the well-known decrease in egg production and shell quality experienced by hens from the second production cycle onwards, a trial was conducted to evaluate the restoration of these variables by administering a preparation based on phytobiotics (oregano, capsaicin, and turmeric), and based on an economic pharmaceutical design that fits the digestive physiology of these birds, which is impaired by age. In this trial, the quality of the shell in terms of thickness and laying percentages was evaluated in groups of 90 second and third-cycle hens, each with their respective control, by adding a preparation of probiotics and calcium with modified release to their diet. In the supplemented groups, production was restored, and the characteristics of the shell were recovered within just 3-5 days of supplementation with the preparation. This response was maintained at levels indistinguishable from the baseline levels of the genetic line throughout the trial (21 days). Feed supplementation with the modified-release phytobiotic- and calcium-based preparation is an economically viable alternative to not using replacement birds, reducing the carbon footprint of raising them, and avoiding the costs involved. The preparation here described allows the opportunity to provide these hens with a longer life at the level of intensive production units and supports backyard egg production.

INTRODUCCIÓN

El huevo de gallina es un componente vital de la nutrición humana. Aproximadamente, se producen más de 80 millones de toneladas de huevos de gallina en todo el mundo y se espera, dada la demanda creciente, que exista un crecimiento de esta industria superior al 25% hacia el año 2030 [1 - 4]. Es evidente entonces que es necesario mejorar la

producción de huevo, tanto en las unidades de producción intensivas como con el huevo que producen las gallinas de traspatio. En este último caso, se menciona que en algunos países el huevo de traspatio representa hasta el 80% de lo producido al respecto [5]. El desafío de incrementar la producción de huevo no debe implicar el uso de promotores de producción antibacterianos y en lo posible, de farmoquímicos en general. Además, no debe comprometerse o perjudicarse la salud ni el bienestar de las gallinas productoras. De hecho, la propuesta de este trabajo conlleva la propuesta de que se les permita vivir más tiempo. El denominado *EFSA Panel on Animal Health and Animal Welfare*, puntualiza una serie de medidas de manejo de gran valor para brindar bienestar a estas aves [6] y en una excelente revisión sobre bienestar de estas aves, se hace hincapié sobre la necesidad de un mejor trato a las gallinas productoras de huevo [6]. Sin embargo, en estas revisiones y en la literatura en general se omite comentar o resaltar que, a nivel de producción intensiva la expectativa de vida de estas aves es cada día más corta. Una gallina productora de huevo bien cuidada puede vivir 6 – 10 años, dependiendo de la raza y las condiciones nutricionales y de salud [7, 8]. No obstante, la tendencia mundial es de solo permitirles, un año de vida y quizá 2. Esto ocurre dada la caída en la productividad que muestran, posterior a la pecheca del primer año. Es necesario puntualizar que más del 60% de los huevos del mundo provienen de sistemas de producción industrial en los que el bienestar de estas aves es descuidado y muy a menudo se recorta su vida por la caída en la producción del huevo a partir del segundo ciclo y más marcadamente con cada ciclo adicional (cada ciclo es de aproximadamente 1 año). Se postula aquí que es obligación del quehacer veterinario compatibilizar la producción de huevo eficiente, con un trato más humano a estas aves y claro es, que permitirles vivir más años es una meta de bienestar animal evidente.

Lo anterior debe realizarse dentro de la directriz mundial que exhorta a la producción libre de principios activos sintéticos y al respecto, la tendencia dominante en la investigación mundial es el estudio de los efectos de los aceites esenciales y extractos herbales (fitobióticos) que no tengan efectos adversos y que contribuyen a mantener o mejorar la salud intestinal de las gallinas [8 - 10]. México es uno de los principales países productores de huevo, con una industria avícola intensiva de gran escala con representando el 64% de la ganadería nacional [11, 12]. Esta producción industrial/intensiva de huevos es un escenario que se repite a nivel mundial y esto implica criar gallinas para un solo ciclo de producción, después del cual, se les sacrifica y la justificación es la mencionada caída

en la productividad de las aves, de hasta un 40%. No obstante, los costos de utilizar gallinas de reemplazo son elevados y esta práctica se asocia a generar una mayor huella de carbono. El escenario es similar en granjas no tecnificadas de pequeños productores y en gallinas de traspatio. La productividad cae, pero a menudo estas aves llegan a tener dos y hasta tres ciclos de postura. Para ellos, el reemplazo de las gallinas no es fácil y tienen que lidiar con producciones mermadas hasta en un 60%.

Una característica clave para evaluar la calidad del huevo es que tenga un cascarón resiliente al agrietamiento/ruptura y sin deformaciones y el grosor de la cáscara del huevo se considera la variable referente para evaluar la calidad del cascarón [13]. Parecería sencillo simplemente aumentar la ingesta de calcio en la dieta y con ello lograr que la producción no merme porque se produce huevo con cascarón defectuoso (“en fârfara”)². No obstante, el aumento de las fuentes de calcio (generalmente carbonato de calcio) no resuelve el problema. La problemática de la absorción del calcio se agudiza si se considera que las aves son una de las especies en las cuales el tránsito gastrointestinal dura únicamente entre 4-6 horas promedio y esto hace a la absorción de calcio un proceso crítico. Más aún si se considera que los picos séricos de calcio que se requieren deben ocurrir en la noche, cuando se produce el huevo. Este proceso de absorción en gallinas de segundo ciclo disminuye. Se ha demostrado que las mezclas de aceites esenciales desempeñan un papel importante en la modulación de la microbiota intestinal, integridad intestinal y limitan la colonización con agentes patógenos [14]. Por ello, se decidió formular un preparado con aceite esencial de orégano, cúrcuma y oleoresina de capsicum toda vez que en estudios previos hemos encontrado un efecto promotor de la biodisponibilidad de calcio con la oleoresina de capsicum [11, 12, 15].

El huevo de baja calidad en el segundo y tercer ciclos de gallinas productoras, se ha relacionado con cambios corporales como la deficiente absorción intestinal de nutrientes, particularmente calcio. Ya se ha informado por los proponentes que una preparación de liberación modificada de varios productos nutracéuticos en forma de pellets con vehículos para liberación modificada, puede mejorar las capacidades de absorción del tubo gastrointestinal (TGI) de las gallinas. Como **hipótesis de trabajo** se va a demostrar, que se puede mejorar la biodisponibilidad del carbonato de calcio, que es una de las fuentes de calcio más económicas

² Real Academia de la Lengua Española <https://dle.rae.es/f%C3%A1rfara>.

y con la biodisponibilidad más pobre [11, 12, 15]. Se postula, con base en investigaciones previas que estos efectos se traducirán en una mejora en la postura de las gallinas de segundo y tercer ciclo y quizá mayores, aún en condiciones de estrés calórico, alimenticio, etc. [11-15].

Así, **el objetivo** de este proyecto fue evaluar un preparado farmacéutico a base de fitobióticos y con vehículos para generar liberación modificada en gallinas de postura en un segundo y tercer ciclo productivo. El modelo de producción evaluado fue de una pequeña empresa familiar, pero es extrapolable a empresas de producción intensiva.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en una granja familiar en Texcoco, Estado de México. Bajo aprobación del Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (CUEA-FVMZ/UNAM). Se utilizaron un total de 180 gallinas ponedoras Bovans-White con un peso de 1.4 ± 0.5 Kg, en un segundo ciclo (> 180 semanas de edad) y 180 gallinas Bovans-White en el tercer ciclo (> 270 semanas de edad), se incluyeron en este ensayo realizado de febrero a mediados de abril de 2024. Las gallinas se asignaron en grupos de tres por jaula tipo California, de 40 cm de ancho, 45 cm de profundidad y 45 cm de alto (600 cm³/gallina). El agua se proporcionó *ad libitum* a través de bebederos de taza (uno por jaula), y se estableció un programa de iluminación de 16 h de luz / 8 de oscuridad. Para la prueba del ciclo de postura, las gallinas se dividieron en seis grupos de 30 gallinas cada uno con la siguiente designación: GC2 = grupo control del segundo ciclo; GP2 = grupo pellet ciclo 2; GC3 = grupo control del tercer ciclo; GP3 = grupo pellet. El color de los pellets fue anaranjado-rojizo, color que ha demostrada preferencia de ingesta por las aves.

Desarrollo de los pellets: mediante una mezcladora de masa de panadería de 50 kg se homogeniza: 0.1% de oleoresina de capsicum (1,000,000 SHU (Scoville Heat Units), Vepinsa, México), 4.1% carbonato de calcio, 2% extracto de orégano, 2% extracto de cúrcuma (REDSA, México), 2% carbopol, 40% cascarilla de arroz, 25% acemite de trigo y 24.8% de harina de maíz. Cuando se obtiene una masa homogénea, se forman pellets delgados mediante una maquina extrusora y se dejan secar por 24 horas. Luego se trocean para tener estructuras de 0.5 a 0.8 cm de largo. Los grupos control (GC2 y GC3) se alimentaron con una dieta balanceada de acuerdo con las guías de linaje utilizadas en este

ensayo. Los grupos experimentales (GP2, GP3) fueron privados de todo el carbonato de calcio fino y grueso que generalmente se agrega a las dietas de las gallinas, y solo se mantuvo el calcio contenido como ortofosfato, ya presente en su alimento. Los requerimientos de calcio diario para las gallinas experimentales se cumplieron con los pellets troceados. El resto de los componentes del alimento se mantuvieron iguales.

El alimento de las gallinas se suministró en comederos de canal (13.3 cm/gallina), y los grupos experimentales recibieron una dosis de 8 g de pellets/gallina que contenían 4.1 % de carbonato de calcio.

Las evaluaciones de postura y grosor del cascaron se iniciaron en los 4 grupos 7 días antes de la dosificación con los pellets y se mantuvo durante 21 días. Diario se evaluó la cantidad de huevos logrados y se midió el grosor del cascarón en 20 unidades por grupo por día. El espesor de la cáscara se determinó en la zona media entre los polos, utilizando un Vernier digital de precisión que admite un error de 0.01 mm. Estos datos se compararon estadísticamente mediante pruebas “t” de *Student* y pruebas no paramétricas (prueba F para comparar varianzas). Se consideró un valor estadísticamente significativo cuando $p \leq 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con Prism (GraphPad Software, para macOS, LLC).

RESULTADOS

En la figura 1 y 2 se presentan los resultados de las evaluaciones de los 4 grupos.

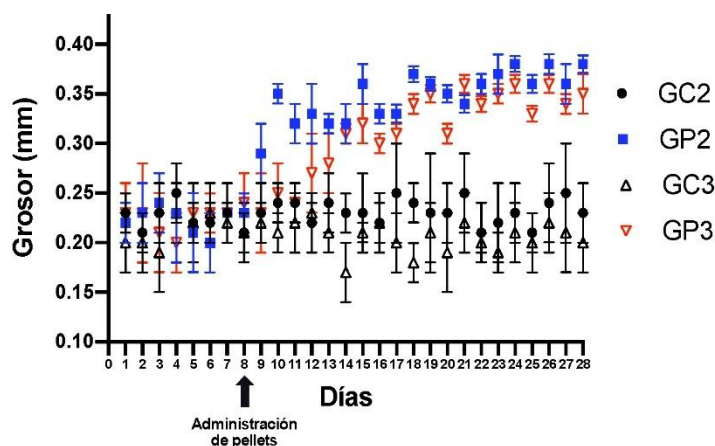


FIGURA 1. Media $\pm$ 1 DE del grosor de la cáscara de huevo en los 2 grupos de postura de segundo ciclo (GC2 y GP2) y los dos grupos de tercer ciclo (GC3 y GP). Datos basales (1 a 7 días) y después del tratamiento (a partir del día 8).

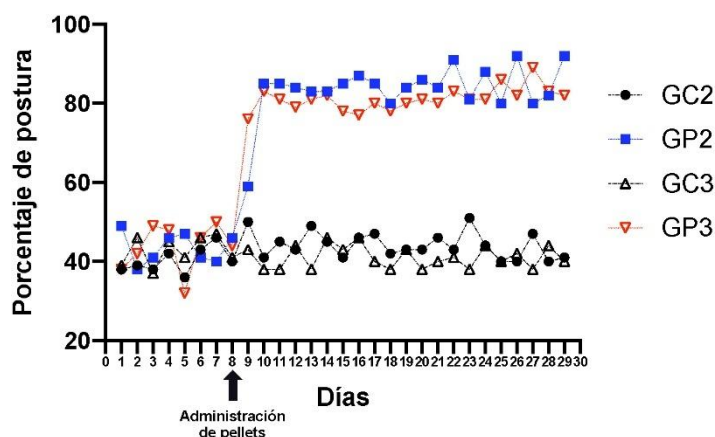


FIGURA 2. Porcentaje de postura en los 2 grupos de aves de segundo ciclo (GC2 y GP2) y los dos grupos de tercer ciclo (GC3 y CP). Datos basales (1 a 7 días) y después del tratamiento (a partir del día 8).

La evaluación estadística de los resultados de grosor de cascara y postura obtenida determinó que no hay diferencias estadísticas significativas entre los 4 grupos los días 1 a 8 y a partir del día 9 se observan diferencias estadísticas entre los grupos controles y tratados, pero no entre grupos tratados y grupos controles (T-test, $P < 0.05$).

DISCUSIÓN

Las producciones obtenidas con el preparado descrito en este ensayo para gallinas de segundo y tercer ciclo son virtualmente indistinguibles entre dichos ciclos y, por referencia a los estándares del linaje, con lo que se obtiene con gallinas de primer ciclo³. Es importante destacar que el preparado fitobiótico utilizado es muy económico y no compite con la alimentación humana, amén de que su manufactura es simple. Por ello, la ponderación de los costos entre utilizar aves de reemplazo o bien, emplear el preparado descrito en este ensayo, es por demás redundante y evidentemente en favor del preparado a base de fitobióticos. Adicionalmente, destacamos que no hay restricciones de uso ni en la EMEA, ni en la FDA o alguna agencia regulatoria en el mundo y evidentemente, no se requiere la determinación de tiempos de retiro [10, 16].

En una búsqueda formal en las bases de datos disponibles (Vet-CD, MedLine, Agris, ProQuest, EBSCO, USDA, Clarivate Web of Sciences, etc.) y en las últimas 2 décadas, no se detectó ningún estudio publicado que lograra mantener la calidad y cantidad de huevo en gallinas de

³ [https://www.bovans.com/documents/2045/Bovans White CS product guide ES 2023 LATAM.pdf](https://www.bovans.com/documents/2045/Bovans%20White%20CS%20product%20guide%20ES%202023%20LATAM.pdf)

segundo y tercer ciclo. De tal suerte que, es factible asumir que este es el primer informe con resultados positivos al respecto y sin utilizar farmoquímicos, solo a base de elementos fitobióticos formulados con vehículos estratégicos. Pero, amén de ser un reporte pionero al respecto, los resultados logrados representan una posibilidad real de brindar a las gallinas del mundo una extensión de su vida, artificialmente acortada a 1 año aproximadamente en las unidades de producción industrial. Desde una perspectiva realista, esto es bienestar animal. Adicionalmente, se abate el costo de introducir aves de reemplazo para la producción de huevo que llegan a ser considerables si se suman el valor de las aves de reemplazo de un día de edad y proveniente de una incubadora especializada (asumiendo que hay disponibilidad), la crianza hasta las 16 – 18 semanas de edad, tiempo en el que inicia la postura y los gastos de crianza como alimentación, vacunas, medicamentos, manejo, mano de obra, instalaciones con infraestructura adecuada, honorarios Veterinarios, etc. Adicionalmente, se debe considerar el impacto ambiental por la huella de carbono asociada a lograr el reemplazo de gallinas de alta productividad. De hecho, un estudio en España indica que las fuentes más importantes con impactos ambientales nocivos, son la producción de alimento para gallinas y la compra de nuevas gallinas ponedoras para reemplazar las antiguas [17]. En un estudio tipo meta-análisis en el que se investigó un efecto de tipo nutricional en la reducción de la huella de carbono asociada a la producción de huevo, se concluyó que la inclusión de minerales-traza asociados a proteínas en las dietas de estas aves, puede beneficiar el desempeño de la producción y calidad del huevo, al tiempo en que se mitiga la huella de carbono [18]. No obstante, en estos estudios solo se hace referencia a gallinas de primer ciclo y no se toca el tema de las gallinas de reemplazo ni el brindar a las gallinas de segundo, tercer y quizá más ciclos la oportunidad de vivir. Además de las ventajas señaladas, nos permitimos parafrasear el comentario que se ha hecho a propósito de la producción porcina, pero que bien puede aplicarse a la avicultura: *“En todo el mundo la sociedad está cada vez más preocupada por el trato que se da a los animales de granja para producir alimentos”* [19, 20, 21, 22]. Finalmente, se propone en este ensayo que ya es tiempo de que se le considere a las gallinas productoras de huevo con compasión y sensibilidad y se pondere para ellas la posibilidad de permitirles más años de vida y con ello contribuir a su bienestar.

CONCLUSIÓN

El uso de fitobióticos en preparados diseñados específicamente para gallinas de postura puede proporcionarles una vida superior a un

ciclo de postura y sin merma de la producción de huevo. Con este preparado se armoniza la producción y se promueve el bienestar y una sobrevida de las gallinas de postura a todos los niveles de producción.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] SIAP., Escenario mensual de productos agroalimentarios. Huevo para plato, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, p. 2, 2022. <https://www.gob.mx/>.
- [2] Agricultura, FAO., Producción y productos avícolas, <https://www.fao.org/poultry-production-products/production/es/>, 2022.
- [3] UNA. Union de Avicultores, 2023. <https://una.org.mx/indicadores-economicos/>.
- [4] Indrani S, Siddhartha J, Pradip D. 2018. Biosecurity Strategies for Backyard Poultry: A Controlled Way for Safe Food Production. *Food Control and Biosecurity*, pp. 481-517.
- [5] Pym, R, Bleich, G. 2006. The relative contribution of indigenous chicken breeds to poultry meat and egg production and consumption in the developing countries of Africa and Asia. In: Romboli, I., Flock, D., Franchini, A. (Eds.), 12th European Poultry. Conference. Italy, p. 197.
- [6] EFSA. Panel on Animal Health and Animal Welfare (AHAW). Welfare of laying hens on farm. 2023. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7789>.
- [7] Welfare issues and potential solutions for laying hens in free range and organic production systems: A review based on literature and interviews. *Front. Vet. Sci.* 9:952922. doi: 10.3389/fvets.2022.952922.
- [8] How Long Do Chickens Live: 6 Factors That Impact Life Expectancy. Posted on August 16, 2021 by The Happy Chicken Coop. <https://www.thehappychickencoop.com/how-long-do-chickens-live/>.
- [9] Dai D, Qi G, Wang J, Zhang H, Qui K, Wu S. 2022. Intestinal microbiota of layer hens and its association with egg quality and safety. *Poultry Science*, 101(9). doi:10.1016/j.psj.2022102008.

- [10] Harrington D, Leach M, Van Der Lis JD. 2023. In book: Sustainable Use of Feed Additives in Livestock (pp.561-608): doi:10.1007/978-3-031-42855-519.
- [11] Sumano H, Carrillo-González L, Monroy-Barreto M, Tapia-Perez G, Gutierrez-Olvera L. 2021. Bioavailability of four calcium sources in the second cycle egg-producing hen. *Journal of Applied Poultry Research*. 30(1):1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.japr.2020.10.005>.
- [12] Carrillo L, Bernad MJ, Monroy-Barreto M, Coello CL, Sumano H, Gutierrez L. 2020. Higher bioavailability of calcium in chickens with a novel in-feed pharmaceutical formulation. *Front. Vet. Sci*. V7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00343>.
- [13] Hashemi SR, Davoodi H. Phytogenics. 2010. A new class of feed additive in poultry industry. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, vol. 9, n° 17, pp. 2295-2304.
- [14] D. Jamroz, J. Orda, C. Kamel, A. Wiliczekiewicz, T. Wiertelicki, J. Skorupska. 2003. The influence of phytogenic extracts on performance, nutrient digestibility, carcass characteristics and gut microbial status in broiler chickens. *J. Anim. Feed Sci.*, 12, pp. 583-596.
- [15] Gutierrez L, Mendoza CJ, Sánchez Z, Carrillo L, Sumano LH. Calcium carbonate and phytoelements to improve egg production in backyard laying hens under heat stress *Vet Mex OA*. 11(2024).
- [16] Mnisi CM, Mlambo V, Peter M, Manyeula F. 2024. Nutraceuticals as components of sustainable poultry production systems for food and nutrition security in Africa: a review. *Agriculture & Food Security* 13(1):24. DOI:10.1186/s40066-024-00477-1.
- [17] Abín R., Laca A., Laca A., Díaz M. 2018. Environmental assessment of intensive egg production: A Spanish case study. *Journal of Cleaner Production*. 179: 160-168.
- [18] Byrne L., Ross S., Taylor-Pickard, J., Murphy R. 2023. The Effect of Organic Trace Mineral Supplementation in the Form of Proteinates on Performance and Sustainability Parameters in Laying Hens: A Meta-Analysis. *Animals*. 13 (19): 3132-3132.

- [19] McCulloch S. 2024. The veterinary profession must condemn intensive pig farming. *The Veterinary Record*. 19:343.
- [20] Alonso M, Gonzalez-Montaña J, Lomillos JM. 2020. Consumer's concerns and perceptions of farm animals welfare. *Animals (BASEL)* 10(3):380. 10.3390/ani10030385.
- [21] Parlasca M, Knoblsdorfer I, Alemayeu G, Doyle R. 2023. How and why animal welfare concerns evolve in developing countries. 13(1):26–33. doi: 10.1093/af/vfac082.
- [22] Boer J, Aiking H. 2022. Considering how farm animals welfare concerns may contribute to more sustainable diets. *Appetite*. V 168. doi: 10.1016/j.appet.2021.105786.

