

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**“ESTUDIO DE UN CASO DE ESPINA BÍFIDA EN UNA TERNERA HOLSTEIN
FRIESIAN”.**

“por”

**ARMAND UGON ITUÑO, Marcos
CHIARLONE GOÑI, Rafael**



FV-34334

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Estudio de Caso

**Montevideo
Uruguay
2020**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de Grado aprobada por:

Presidente de Mesa:

Segundo Miembro (Tutor):

Tercer Miembro:

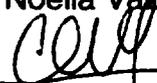
Cuarto Miembro (co-tutor):

Quinto Miembro (co-tutor):
Dr. Rody Artigas

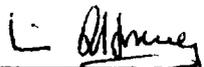
Fecha:
Autores:



Dra. Noelia Vazquez



Dr. Moron, Carlos Walter R.



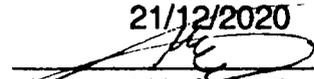
Dr. Luis Albormoz



Dra Silvia Llambí



21/12/2020



Br. Armand Ugón Ituño, Marcos



Br. Chiarlone Goñi, Rafael

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con 12 (doce) votos

AGRADECIMIENTOS:

Agradecemos a la Facultad de Veterinaria por permitir nuestra formación académica y brindarnos las herramientas para salir al medio laboral.

Al tutor, el Dr. Carlos Morón y la co-tutora Dra. Silvia Llambí por el apoyo y sus fundamentales participaciones.

Al Dr. Rody Artigas, co-tutor y pieza fundamental en este trabajo por su tiempo brindado y su permanente disposición a lo largo de esta etapa de aprendizaje.

A José Manuel Verdes, como responsable técnico de experimentación animal.

A Noelia Vázquez por sus conocimientos brindados en la realización de la necropsia, así como al Departamento de Anatomía por brindarnos las instalaciones y los materiales necesarios para dicha tarea.

A la Licenciada Andrea Branda por su participación en el diagnóstico de complejo de malformación vertebral.

Al Departamento de Imagenología.

Al personal del Laboratorio de Análisis Clínico del Hospital.

Al grupo de estudiantes que recibió y llevó a cabo los cuidados del animal.

Al personal de biblioteca.

A la familia y amigos por el apoyo diario desde el inicio de nuestros estudios universitarios.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
RESUMEN.....	9
SUMMARY.....	10
1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
1.1- Embriología de la columna vertebral.....	11
1.1.1- El desarrollo de las vértebras.....	11
1.1.2- El desarrollo de la médula espinal.....	14
1.2- Descripción anatómica de la columna vertebral.....	14
1.2.1- Las vértebras.....	15
1.2.2- La médula espinal.....	19
1.3- Alteraciones congénitas que afectan la columna vertebral en bovinos.....	21
1.3.1- Generalidades.....	21
1.3.2- Enfermedades congénitas de la columna vertebral en los bovinos.....	22
2 HIPÓTESIS.....	31
3 OBJETIVOS.....	31
3.1- Objetivo general.....	31
2.2- Objetivos específicos.....	32
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
4.1- Caso clínico.....	32

4.2- Estudios paraclínicos.....	34
5 RESULTADOS.....	37
5.1- Hallazgos clínicos.....	37
5.2- Hemograma.....	38
5.3- Análisis citogenético.....	39
5.4- Análisis moleculares.....	39
5.5- Estudio Radiológico.....	41
5.6- Estudio Anatómico.....	43
6 DISCUSIÓN.....	48
7 CONCLUSIONES.....	53
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales hallazgos clínicos y patológicos en las alteraciones congénitas de la columna vertebral.....	31
Tabla 2. Hemograma del caso clínico en estudio.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferenciación del somito. Embrión de pollo de 72 h.....	12
Figura 2. Formación de los arcos vertebrales en embriones humanos.....	13
Figura 3. Modelado 3D del proceso de cierre del arco vertebral en briones humanos.....	13
Figura 4. Vértebras cervicales del rumiante.	15
Figura 5. Vértebras cervicales del rumiante en posición.	16
Figura 6. Vértebras torácicas del rumiante.....	17
Figura 7. Vértebras lumbares del rumiante.....	17
Figura 8. Sacro del rumiante.....	18
Figura 9. Simplificación de la morfología de las vértebras caudales.....	19
Figura 10. Esquema de la médula espinal.	20
Figura 11. Principales alteraciones del Complejo de malformación vertebral bovino.....	23
Figura 12. Principales alteraciones del síndrome de Braquiespina.....	25
Figura 13. Principales alteraciones del Perosomus elumbis.	26
Figura 14. Principales alteraciones del Schistosomus reflexus.....	28
Figura 15. Tipos de espina bífida.....	29
Figura 16. Alteraciones en un ternero con espina bífida.....	30
Figura 17. Animal del caso clínico.....	33
Figura 18. Foto de las metafases.....	39
Figura 19. Alteraciones en un ternero con espina bífida. Gráfico de las curvas de desnaturalización normalizadas obtenidas con el análisis de HRM (high resolution melting).....	40
Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%	41
Figura 21. Imagen radiológica de la región lumbosacra del caso clínico.....	42
Figura 22. Imágenes mielográficas del caso clínico.....	42
Figura 23. Alteraciones musculoesqueléticas en el caso clínico.....	44

Figura 24. Vista lateral izquierda de la articulación femorotibiorotuliana y vista ventral de pelvis y región sublumbar.....	44
Figura 25. Vista dorsal de región lumbar y sacra.....	45
Figura 26. Vista dorsal de región sacra.....	46
Figura 27. Hueso sacro y vértebras lumbares.....	46
Figura 28. Terminación de la médula espinal.....	47
Figura 29. Cola.....	47
Figura 30. Corazón del caso clínico.....	48

RESUMEN

Este trabajo de tesis describe el caso de una ternera raza Holstein Friesian de tres días de vida que presentó una malformación congénita con un fenotipo compatible de espina bífida. El animal llegó al predio de Facultad de Veterinaria y fue acondicionado en un box, donde recibió los cuidados de enfermería y de alimentación. El animal se presentaba en decúbito y con incapacidad para desplazarse. Se observó prognatismo, artrogriposis bilateral del tarso, una notoria depresión en la porción media del hueso sacro y agenesia o ausencia de vértebras coccígeas. Se le extrajo al animal una muestra de sangre de la vena yugular a partir de la cual se realizó un hemograma, serología para Diarrea Viral Bovina y estudios genéticos. Paralelamente se realizó el estudio del líquido cefalorraquídeo. Los estudios genéticos incluyeron análisis citogenéticos y de genética molecular para descartar patologías similares (Braquiespina y Complejo de Malformación Vertebral Bovino). Una muestra sanguínea de la madre, tomada en el predio de origen, fue analizada para Diarrea Viral Bovina. Se llevaron a cabo estudios imagenológicos (Rx y mielografía) para ver la conformación de la columna vertebral y de la médula espinal. La necropsia constató atrofia de la musculatura de los miembros pelvianos y que el canal raquídeo y la médula espinal eran completos hasta la tercera vértebra lumbar, abriéndose hacia dorsal de donde salían los nervios sacros y coccígeos. Los estudios citogenéticos no mostraron alteraciones en el número o estructura de los cromosomas. Los estudios moleculares descartaron Braquiespina y Complejo de Malformación Vertebral Bovino. Para nuestro conocimiento, esta es la primer descripción clínica, anatómica y genética de un caso compatible con espina bífida en Uruguay.

SUMMARY

This thesis describes the case of a three-day-old Holstein Friesian calf that presented a congenital malformation with a compatible spina bifida phenotype. The animal arrived at the Veterinary School and was conditioned in a box, where it received nursing and feeding care. The animal was presented in decubitus and with inability to move. Prognathism, bilateral tarsal arthrogyposis, a marked depression in the middle portion of the sacrum, and agenesis or absence of coccygeal vertebrae were observed. A blood sample was taken from the animal from the jugular vein from which a hemogram, serology for Bovine Viral Diarrhea and genetic studies were performed. In parallel, the study of cerebrospinal fluid was carried out. The genetic studies included cytogenetic and molecular genetic analyzes to rule out similar pathologies (Brachiespine and Bovine Vertebral Malformation Complex). A blood sample from the mother, taken at the farm of origin, was analyzed for Bovine Viral Diarrhea. Imaging studies (X-ray and myelography) were carried out to see the conformation of the vertebral column and spinal cord. The necropsy confirmed atrophy of the muscles of the pelvic limbs and that the spinal canal and the spinal cord were complete until the third lumbar vertebra, opening towards the dorsal where the sacral and coccygeal nerves came out. Cytogenetic studies did not show alterations in the number or structure of the chromosomes. Molecular studies ruled out Brachiespine and Bovine Vertebral Malformation Complex. To our knowledge, this is the first clinical, anatomical and genetic description of a case compatible with spina bifida in Uruguay.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

1.1. Embriología de la columna vertebral

1.1.1 *El desarrollo de las vértebras*

El sistema músculo-esquelético axial se forma mediante un proceso que se compone de dos partes. Primero, un grupo de células mesodérmicas se ubican justo debajo del tubo neural formando una estructura que se denomina notocorda, la cual produce proteínas que sirven como señales de posición y destino para la formación de todo el sistema músculo-esquelético axial. En segundo lugar, a los lados de la notocorda y del tubo neural, se producen formaciones temporales de células derivadas del mesodermo paraxial, que se organizan de manera par, y se denominan somitas (Carrillo y col., 2014).

A partir de las somitas se originan las vértebras, costillas, músculos, tendones y ligamentos del esqueleto axial. Las somitas se forman primero en la región cefálica y luego se van formando en sentido caudal, activados por un “reloj” del desarrollo. En un embrión bovino se pueden observar de 56 a 62 pares de somitas (Carrillo y col., 2014).

Cada par de somitas da lugar a tres poblaciones celulares: el esclerótomo, el miótomo y el dermótomo (fig. 1). El esclerótomo se forma por la migración de células provenientes de la región ventromedial de las somitas, que se disponen alrededor de la notocorda y se unen a las células provenientes del esclerótomo opuesto, en el otro lado del tubo neural (Sadler, 2012; Rojas y Smok, 2014).

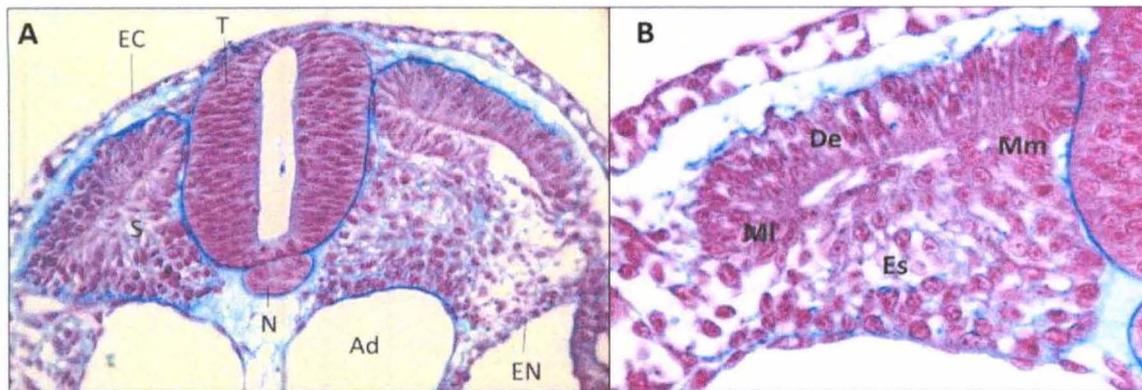


Figura 1. Diferenciación del somito. Embrión de pollo de 72 h. A: se observa ectodermo (EC), notocorda (N), tubo neural (T), endodermo (EN), aortas dorsales (Ad), mesodermo somítico (S). 100X. **B:** dermatomo (De), miotomo medial (Mm), miotomo lateral (MI) y esclerotomo (Es). 400X. (Tomado de: Rojas y Smok, 2014).

En la medida que el desarrollo continúa, la parte de esclerótomo de cada somita sufre un proceso de resegmentación. Esto da lugar a dos poblaciones celulares, una mitad craneal de células esparcidas y otra mitad caudal de células dispuestas densamente. Dado que ambas poblaciones celulares crecen diferencialmente, la porción caudal de cada esclerótomo toma contacto con la parte craneal del adyacente. La unión de estas dos mitades, dará lugar a un esbozo mesenquimatoso de vértebra, que sufrirá un proceso posterior de condricación (Garcia y Gil, 2013).

La notocorda, encerrada dentro de la vértebra cartilaginosa, comienza un proceso de regresión, salvo entre los espacios vertebrales, dónde dará origen al centro pulposo de los discos intervertebrales. El anillo fibroso de los discos se origina del mesénquima del esclerótomo (Sadler, 2012). En la medida que la vértebra primitiva crece, se expande formando los arcos dorsal y ventral (fig. 2). La fusión de los arcos dorsales en torno a la médula, delimitará el canal vertebral, al mismo tiempo que se forman los procesos vertebrales (Garcia y Gil, 2013; Mekonen y col., 2017) (Fig. 3).

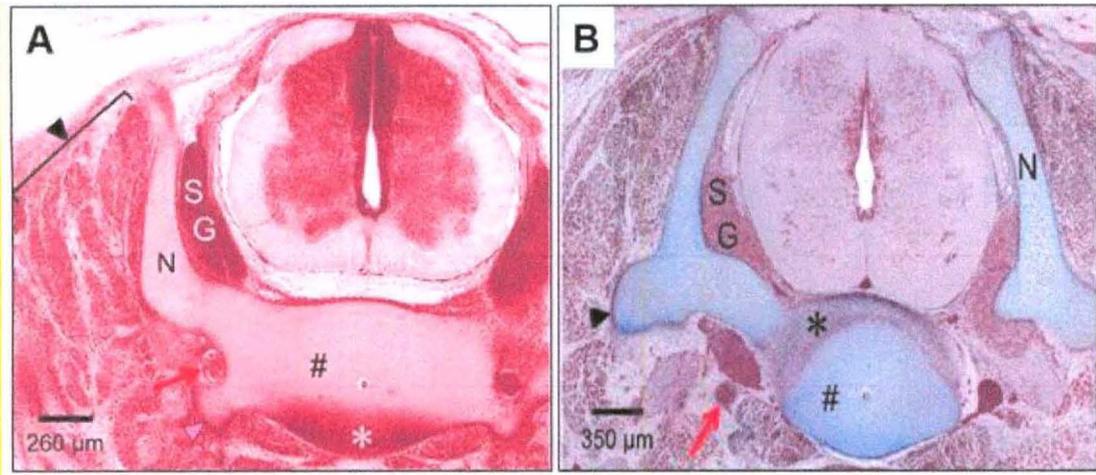


Figura 2. Formación de los arcos vertebrales en embriones humanos. Vértebra C6 en dos periodos diferentes, tinción carmín. A: Embrión CS20 (7 semanas). **B:** Embrión CS23 (8 semanas). En **A y B:** #: cuerpo vertebral, *: disco intervertebral, N: arco dorsal, flecha roja: arteria vertebral, punta de flecha proceso transversos, SG: ganglio espinal. Modificado de Mekonen y col. (2017).

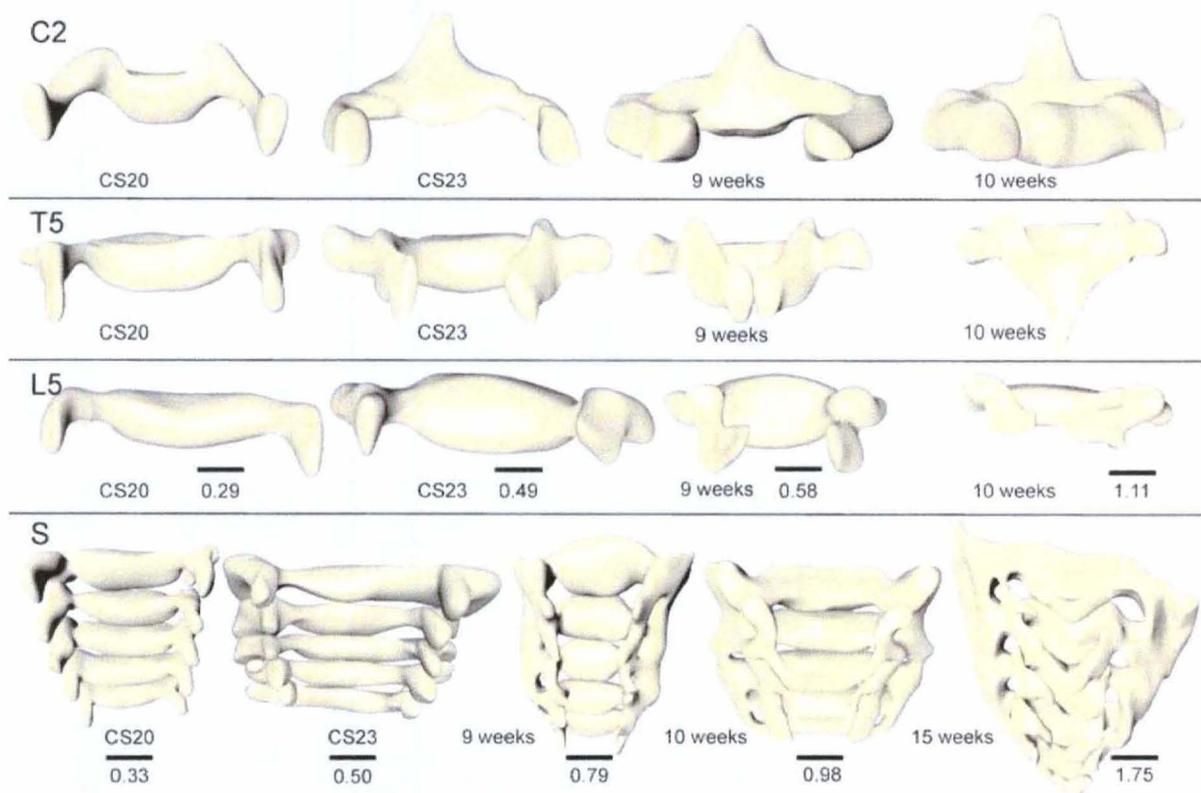


Figura 3. Modelado 3D del proceso de cierre del arco vertebral en embriones humanos. C2: Vértebra cervical 2, T5: Vértebra torácica 5, L5: vértebra lumbar 5, S: sacro. CS20: 7 semanas. CS23: 8 semanas, 9, 10 y 15 semanas. Tomado de Mekonen y col. (2017)

1.1.2. El desarrollo de la médula espinal

Durante el período embrionario de neurulación, los bordes laterales de la placa neural crecen formando los pliegues neurales. Los pliegues delimitan entre ellos el surco neural, y tras su fusión por encima de la línea media, forman el tubo neural, estructura que dará origen al sistema nervioso central (Sadler, 2012).

Durante un periodo de tiempo, el tubo neural permanecerá abierto en sus extremos craneal (neurosporo anterior) y caudal (neurosporo caudal). La falla del cierre de los neurosporos podría dar lugar a defectos en la formación del encéfalo o de la médula espinal, como anencefalia o espina bífida (García y Gil, 2013).

Una vez que el tubo neural se cierra, las células neuroepiteliales darán origen a los neuroblastos (células nerviosas primitivas) y a los esponglioblastos (células precursoras de la neuroglia). Los neuroblastos formarán la capa del manto que, posteriormente, dará origen a la sustancia gris de la médula espinal (Sadler, 2012). Conforme madura el neuroepitelio, se formará por fuera del manto una capa que contiene muchas extensiones celulares y pocos somas, denominada capa marginal, precursora de la sustancia blanca (García y Gil, 2013).

Durante el desarrollo, la capa del manto se dispone en dos columnas dorsales y en dos ventrales. Las dorsales darán lugar a las astas dorsales de la médula adulta, con neuronas sensitivas. Las ventrales, en cambio, darán lugar a las astas ventrales, con neuronas motoras (Sadler, 2012). En la medida que crece, la capa del manto adopta una característica forma de mariposa, que se observa en los cortes transversales del órgano. Con el paso del tiempo la luz del tubo neural disminuye, hasta quedar un canal de pequeño calibre que dará lugar al epéndimo, por dónde circulará el líquido cefalorraquídeo (García y Gil, 2013).

1.2. Descripción anatómica de la columna vertebral

La columna vertebral está formada por las vértebras, discos intervertebrales y ligamentos, así como por la médula espinal y sus raíces nerviosas. Es una estructura compleja, resistente y articulada que cumple diversas funciones tales como dar sostén dinámico y estático al cuerpo, brindar protección a la médula espinal recubriéndola y mantener el centro de gravedad (Olivares y Rojas, 2013).

1.2.1. Las vértebras

La columna vertebral normal del bovino está compuesta por 7 vértebras cervicales, 13 (12-14) torácicas, 6 (7) lumbares, 5 sacras y 18-20 coccígeas o caudales. Cada vértebra está compuesta por un cuerpo, varios procesos articulares, proceso espinoso, procesos transversos, el foramen vertebral (el conjunto de estos forámenes forma el canal vertebral) y el arco vertebral (Gloobe, 1989).

Las vértebras cervicales son las primeras vértebras que se ubican a continuación de la cabeza, las dos primeras dan sostén a la misma, y se denominan Atlas y Axis (fig. 4 y 5). El atlas no tiene cuerpo, está formado por un arco estructural con una porción dorsal que posee el tubérculo dorsal y un arco ventral con el tubérculo ventral. Hacia los laterales emerge un proceso transversal ancho (Dyce y col., 2004).

El axis es la vértebra más larga de la columna, es ancha y posee un diente, el cual se introduce en el agujero vertebral del atlas funcionando como un pivote. Cuenta con distintas partes tales como el diente anteriormente mencionado, el proceso espinoso, otras superficies articulares, proceso transverso y procesos articulares caudales para articular con la tercer cervical, agujero intervertebral y agujero transverso (Gloobe, 1989).

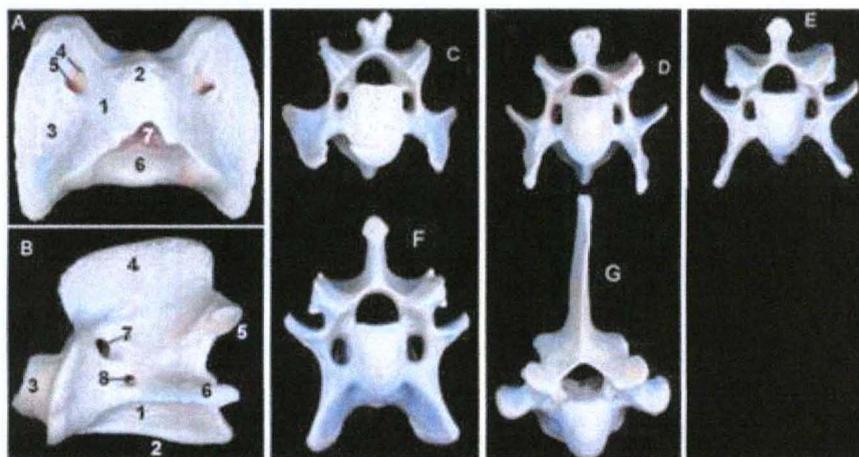


Figura 4. Vértebras cervicales del rumiante. (A) vista dorsal del atlas: 1: arco dorsal, 2: tubérculo dorsal, 3: ala, 4: agujero vertebral lateral, 5: agujero alar, 6: fóvea articular caudal, 7: fóvea para el diente. (B) vista lateral del axis 1: cuerpo, 2: cresta ventral, 3: diente, 4: proceso espinoso, 5: proceso articular caudal, 6: proceso transverso, 7: agujero vertebral lateral, 8: agujero transverso. (C) tercera cervical, (D) cuarta cervical, (E) quinta cervical, (F) sexta cervical, (G) séptima cervical.

cervical, (D) cuarta cervical, (E) quinta cervical, (F) sexta cervical, (G) séptima cervical. Adaptado de: <http://videosdigitals.uab.es/cr-vet/www/102679/osteo/ficheros/Untitled2.html> (consulta: 23/11/20)

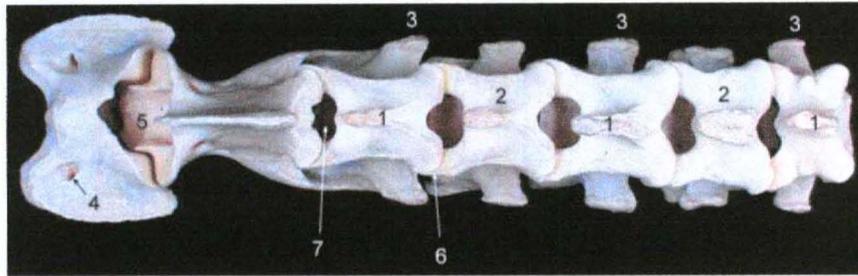


Figura 5. Vértebras cervicales del rumiante en posición. Vista dorsal. 1: proceso espinoso, 2: lámina del arco vertebral, 3: proceso transverso, 4: Agujero alar del atlas, 5: Diente del axis, 6: procesos articulares articulados, 7: espacio interarcual. Tomado de: <http://videosdigitals.uab.es/cr-vet/www/102679/osteo/ficheros/Untitled2.html> (consulta: 23/11/20)

Las vértebras torácicas continúan la columna vertebral formando un eje óseo levemente convexo hacia dorsal y con poca flexibilidad. Transmiten el peso corporal hasta el miembro torácico y dan inserción a los músculos costales torácicos y de la espalda en conjunto con las costillas. Dichas vértebras, en los herbívoros y los cerdos desarrollan largos procesos espinosos (fig. 6), los cuales dan anclaje a los músculos de cabeza y cuello (Dyce y col., 2004).

Las vértebras torácicas articulan con las costillas y se corresponden en número con estas. Hacia los laterales del arco vertebral tienen fosas costales craneales y caudales para la articulación con la cabeza de la costilla. Posee cuatro procesos articulares (dos craneales y dos caudales), para articular con las vértebras adyacentes. Los procesos transversos son más cortos, con carillas articulares para el tubérculo costal. Al igual que las vértebras lumbares, presentan procesos mamilares (Gloobe, 1989).

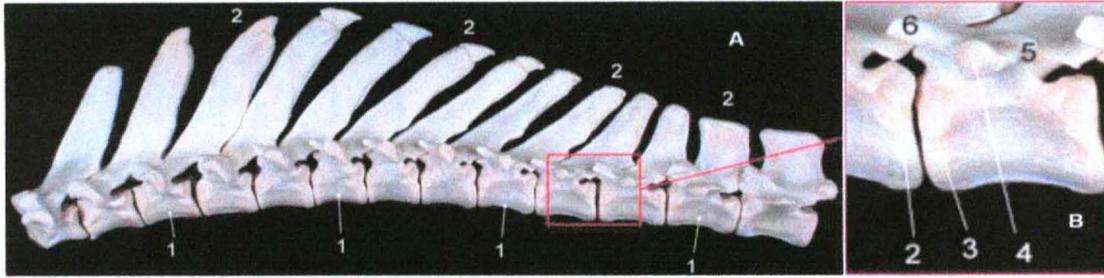


Figura 6. Vértex torácicas del rumiante. (A) vista lateral en posición. 1: Cuerpos vertebrales, 2: procesos espinosos. (B) región del recuadro rojo en detalle, 2: fovea costal caudal, 3: fovea costal craneal, 4: fovea costal de los procesos transversos, 5: proceso transverso, 6: proceso mamilar. Adaptado de: <http://videosdigitals.uab.es/cr-vet/www/102679/osteo/ficheros/Untitled2.html> (consulta: 23/11/20)

Las vértebras lumbares son contiguas a las torácicas, tienen una mayor longitud y una forma más homogénea del cuerpo. Los procesos espinosos son más cortos y se encuentran inclinados hacia craneal (fig. 7). Los procesos transversos de estas vértebras son los que tienen mayor desarrollo en comparación con las otras vértebras del cuerpo. Los procesos mamilares resultan prominentes (Dyce y col., 2004).

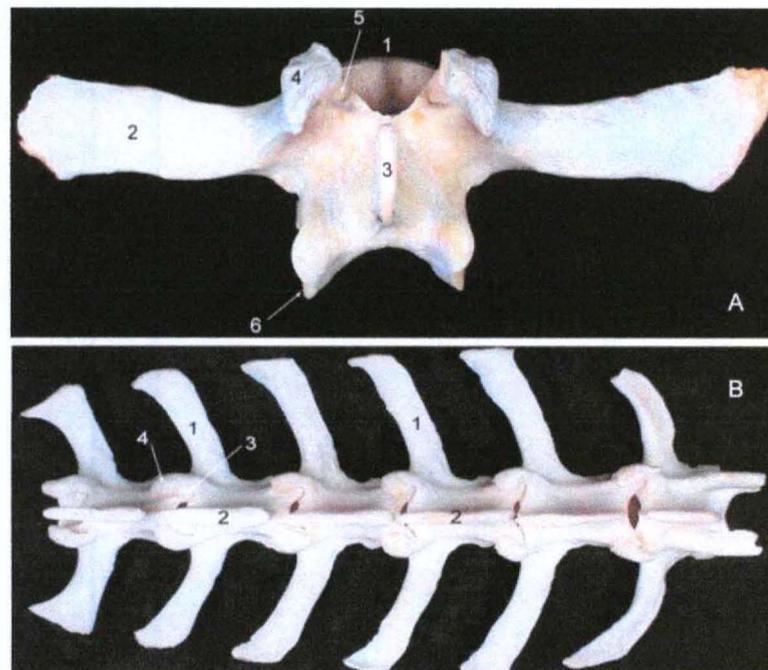


Figura 7. A: vista dorsal de una vértebra lumbar de rumiante. 2: Proceso transverso; 3: proceso espinoso; 4: proceso mamilar; 5: proceso articular craneal; 6: proceso articular caudal. **B:** Vista dorsal de las vértebras lumbares en posición: 1: proceso transverso; 2: proceso espinoso; 3: proceso articular

caudal; 4: proceso mamilar y articular craneal. Modificado de <http://videosdigitals.uab.es/cr-vet/www/102679/osteo/ficheros/Untitled2.html> (consultado 23/11/20).

En todos los mamíferos las vértebras sacras se encuentran unidas, formando el hueso sacro, el cual es un único hueso con 3 caras. En el caso de los rumiantes y los equinos se requieren algunos años para alcanzar la fusión completa. El sacro normalmente se estrecha desde su base craneal a caudal (formando el ápex del sacro) y se curva en toda su longitud, presentando un a cara lisa (ventral) y ligeramente cóncava a la pelvis. En los rumiantes, la cara dorsal presenta los procesos espinosos fusionados formando una cresta. Lateral a esa cresta pueden observarse crestas irregulares, formadas por la fusión de los procesos articulares. Los márgenes del hueso están formados por la fusión de los procesos transversos que hacia craneal ofrecen una superficie articular para el íleon (fig. 8) (Dyce y col., 2004).

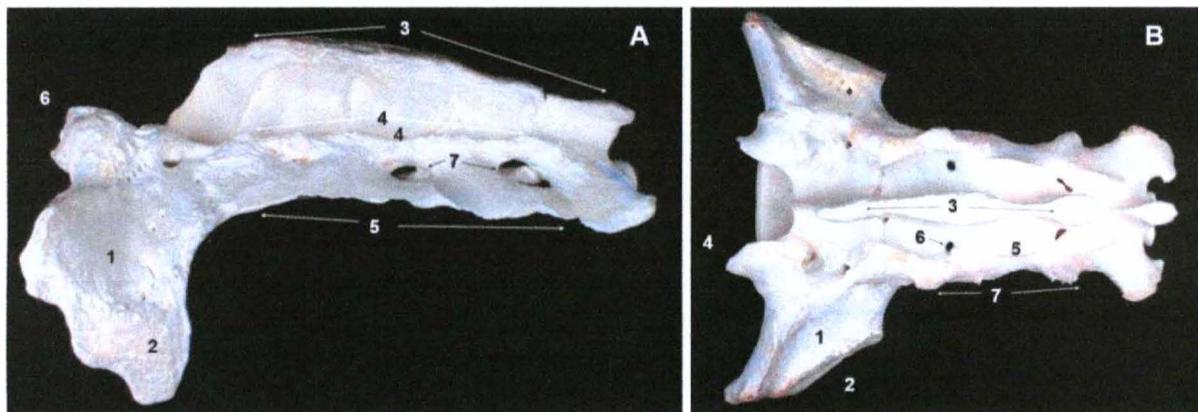


Figura 8. Sacro del rumiante. (A) Vista lateral. 1: ala del sacro, 2: cara articular, 3: cresta sacra media, 4: cresta sacra intermedia, 5: cresta sacra lateral, 6: proceso articular craneal, 7: agujero sacro lateral. (B) Vista dorsal. 1: Ala del sacro, 2: cara articular, 3: cresta intermedia, 4: proceso articular craneal, 5: cresta sacra intermedia, 6: agujero sacro dorsal, 7: cresta lateral. Modificado de <http://videosdigitals.uab.es/cr-vet/www/102679/osteo/ficheros/Untitled2.html> (consultado 23/11/20).

Las vértebras caudales o coccígeas se reducen gradualmente de tamaño, con una simplificación gradual de su forma perdiendo arcos y procesos, y con una forma cilíndrica simple al final (fig. 9). En las caras ventrales de las vértebras caudales en rumiantes (Cd1 a 8), existen procesos paramedianos, y procesos hemales, para la protección de los vasos sanguíneos caudales (Dyce y col., 2004).

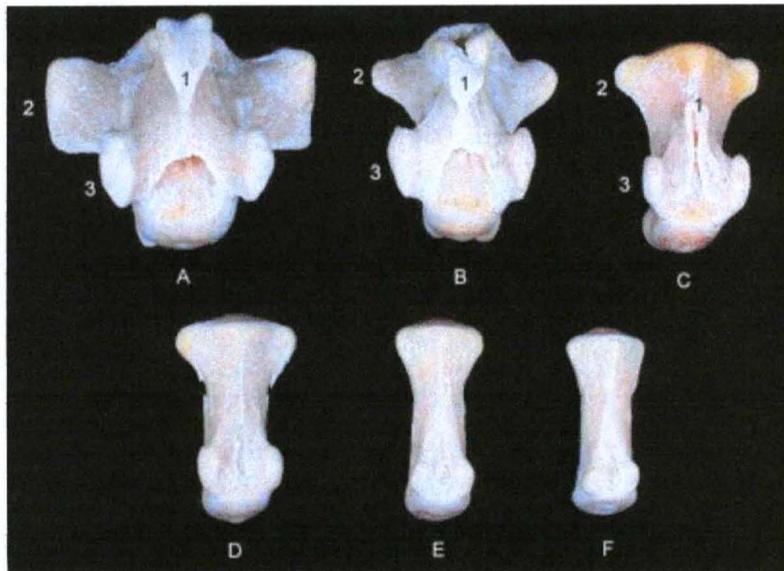


Figura 9. Simplificación de la morfología de las vértebras caudales de (A) a (F). 1: proceso espinoso, 2: proceso transverso, 3: proceso articular craneal. Tomado de: <http://videosdigitals.uab.es/cr-vet/www/102679/osteo/ficheros/Untitled2.html> (consulta: 23/11/20).

1.2.2. La médula espinal.

La médula espinal es la continuación caudal de la médula oblonga (Gloobe, 1989) que se encuentra en el canal medular, y está recubierta por las meninges (duramadre, aracnoides y piamadre) y el líquido cefalorraquídeo; estas estructuras al igual que la columna vertebral cumplen un rol de protección. Macroscópicamente, la médula espinal es una estructura de forma cilíndrica, alargada, y levemente aplanada dorsoventralmente, con algunas variaciones regionales en cuanto a su forma (Dyce y col., 2004).

En la porción caudal de la región cervical y al comienzo de la torácica la médula presenta un ensanchamiento, denominado intumescencia cervical. De ahí surgen los nervios que luego darán origen al plexo braquial, que inervará a los miembros torácicos. De forma similar, la intumescencia lumbar dará origen a los nervios que inervarán la cavidad abdominal y los miembros pelvianos (König y col., 2005). Caudalmente, en la región lumbar, la médula espinal sufre un estrechamiento, transformándose en un cono denominado *conus medullaris* que finalmente se reduce para formar el filum terminal (*filum terminale*). (Dyce y col., 2004).

La médula se divide en los mismos segmentos que la columna vertebral, es decir, en los segmentos cervical (*pars cervicalis*), torácico (*pars thhoracica*), lumbar (*pars lumbalis*), sacro (*pars sacralis*) y coccígeo (*pars coccígea*). Además, el órgano se encuentra “dividido” en dos mitades simétricas por el surco dorsal y la fisura mediana ventral (fig. 10) (König y col., 2005).

Dorsolateralmente a cada mitad medular, llegan fibras nerviosas, formando las raíces espinales dorsales. Paralelamente, de cada mitad ventromedial hay fibras que abandonan la médula, dando lugar a las raíces ventrales. En la raíz dorsal se aprecia un engrosamiento que corresponde al ganglio espinal (salvo en el primer nervio cervical, donde no existe o es rudimentario) (fig. 10), conteniendo a las neuronas sensitivas, mientras que la raíz ventral lleva fibras motoras. Las fibras de cada raíz (dorsal y ventral) se unen (fig. 10) en el foramen intervertebral, para dar lugar a los nervios espinales (König y col., 2005).

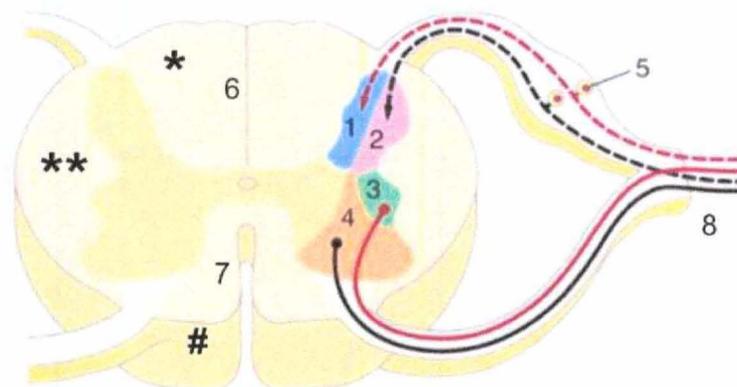


Figura 10. Esquema de la médula espinal. 1 y 2: ingreso de fibras sensitivas aferentes por raíz dorsal, 3 y 4: salida de fibras motoras eferentes por raíz ventral, 5: ganglio espinal en raíz dorsal, 6: surco dorsal, 7: fisura mediana ventral, 8: nervio espinal, * cordón dorsal, ** cordón lateral, # cordón ventral. Modificado de Dyce y col. (2004).

En el feto, durante el desarrollo, la médula espinal y la columna vertebral tienen la misma longitud. Sin embargo, durante el desarrollo, la médula no acompaña el crecimiento de la columna, razón por la cual el conus medullaris termina antes que la propia columna vertebral (en los bovinos adultos, a nivel de la vértebra sacra 1) (Gloobe, 1989). Las raíces sacras y espinales caudales deben viajar caudalmente por

dentro del canal vertebral, para salir por sus respectivos forámenes intervertebrales, dando lugar a la cauda equina (Dyce y col., 2004; König y col., 2005).

Al corte transversal de la médula espinal se observa una figura en forma de H. Esto se debe a la disposición de la sustancia gris que se encuentra rodeada por la sustancia blanca. En el centro de la sustancia gris se observa un canal central, denominado epéndimo, por donde fluye el líquido cerebroespinal. La sustancia gris contiene los cuerpos neuronales y fibras nerviosas amielínicas, mientras que la sustancia blanca se compone de fibras mielínicas (Dyce y col., 2004). En la sustancia blanca pueden diferenciarse tres cordones (dorsal, lateral y ventral) en cada mitad medular, que contienen fibras pertenecientes a diferentes vías (Gloobe, 1989).

1.3. Alteraciones congénitas que afectan la columna vertebral en bovinos

1.3.1. Generalidades

Las malformaciones congénitas son alteraciones de una estructura o función, que están presentes desde que el animal nace. No todas las malformaciones congénitas son producidas por factores genéticos (mutaciones en uno o varios genes, modificaciones epigenéticas o aberraciones cromosómicas). Algunas se deben a agentes ambientales que actúan como teratógenos (Llambí y Arruga, 2018).

Dentro de los agentes teratógenos más importantes para los bovinos podemos citar: plantas tóxicas y micotoxinas (p.ej.: la especie *Lupinus spp.* en la enfermedad del ternero doblado), infecciones víricas parenterales (p.ej.: la DVB que produce hipoplasia cerebelar e hidrocefalia) y deficiencias minerales en las madres o terneros afectados (p.ej.: manganeso que produce anomalías del esqueleto) (Blowey y col., 2006) e incluso fármacos administrados durante la gestación (Llambí y Arruga, 2018).

Las causas multifactoriales de malformaciones congénitas, interrelacionan los factores genéticos y ambientales. Esto se basa en el concepto clásico de fenotipo, como la expresión de un determinado genotipo en un ambiente, al que hoy en día deben incorporársele los factores ambientales (Llambí y Arruga, 2018).

1.3.2 Enfermedades congénitas de la columna vertebral en los bovinos:

Varios defectos congénitos afectan la columna vertebral de los bovinos, e incluyen el síndrome de espina corta letal, la fusión atlanto-occipital, sifosis (arqueado dorsal de la columna), lordosis (arqueado ventral de la columna), escoliosis (desviación lateral de la columna) y tortícolis. Estos defectos pueden darse solos o verse acompañados de otros defectos (principalmente del sistema nervioso central) (Leipold y Dennis, 1993).

Otras alteraciones que involucran a la columna vertebral incluyen síndromes más complejos, que serán tratados en esta tesis, como el Complejo de malformación vertebral bovino, la Braquiespina, el *Perosomus elumbis*, el *Schistosomus reflexus* y la espina bífida.

a) *El complejo de malformación vertebral bovino (OMIA 001340-9913)*

El complejo de malformación vertebral (CVM) es un síndrome genético de herencia autosómica recesiva presente en la raza Holstein Friesian. La enfermedad causa pérdidas económicas directas para los ganaderos debido principalmente a la producción de abortos. Los terneros que superan el periodo gestacional sufren de retraso del crecimiento y leve flexión bilateral de las articulaciones del carpo e interfalángicas, con rotación de los dedos (fig. 11A) (Agerholm, 2007).

En la mayor parte de los casos, las articulaciones del tarso e interfalángicas de los miembros pelvianos se ven anquilosadas (fig. 11A), observándose malformaciones a nivel de vértebras (fig. 11C y D) y costillas. Puede apreciarse acortamiento del cuello en casos donde estén afectadas las vértebras cervicales y torácicas (fig. 11B), pero la extensión de la malformación varía entre los diferentes casos, denotando una expresividad variable. Otras malformaciones que se pueden encontrar son a nivel del corazón, en el tabique interventricular, hipertrofia cardíaca, y defectos en grandes vasos (Agerholm y col., 2001).

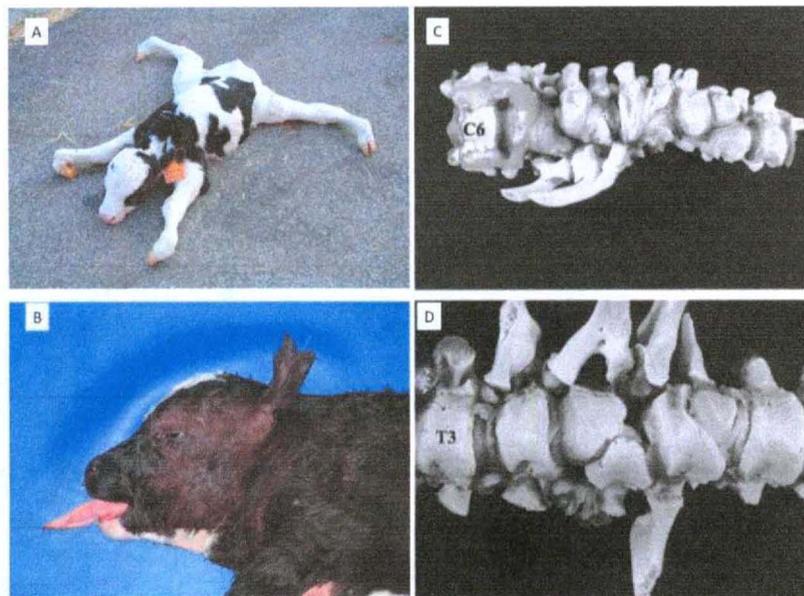


Figura 11. Principales alteraciones del Complejo de malformación vertebral bovino. (A) Flexión y anquilosamiento de las articulaciones del carpo, tarso e interfalángicas. (B) Acortamiento del cuello. (C) Vista lateral. Malformaciones en vértebras de la columna cervical. (D) Vista ventral. Malformaciones en vértebras de la columna torácica. A y B tomado de: <http://www.arcangelogentile.it/Genetic%20Disease/CVM.aspx> (consultado 23/11/20). C y D Modificado de Agerholm y col. (2001).

Actualmente se sabe que un cambio de G por T en el exón 4 del gen *SLC35A3* causa un cambio aminoacídico de valina por fenilalanina en la posición 180 de la proteína, dando lugar a un polipéptido ilegítimo. *SLC35A3* codifica para una proteína transportadora de solutos con roles fundamentales en los mecanismos que controlan la formación de vértebras a partir del mesodermo paraxial no segmentado. En consecuencia, la molécula transportadora defectuosa conduce a malformaciones vertebrales (Thomsen y col., 2006).

Si bien en Uruguay no se ha diagnosticado ningún caso clínico de CMV, se sabe que la mutación se encuentra circulando en los rodeos Holstein del país. Así lo demostraron Branda-Sica y col. (2019), quienes encontraron una frecuencia del alelo mutante de 0.032 y una prevalencia de vacas portadoras de 6.45%. Gracias a estos estudios, hoy se cuenta con la técnica de genotipado por PCR en tiempo real y análisis HRM (high resolution melting) para el diagnóstico definitivo de la enfermedad.

b) El síndrome de Braquiespina (OMIA 000151-9913)

El síndrome de Braquiespina (SB) es un defecto letal, autosómico recesivo exclusivo de la raza Holstein Friesian, que principalmente produce pérdidas gestacionales antes del día 40 (Charlier y col., 2012). En algunos casos puede observarse el nacimiento de animales con reducción severa del peso corporal, desplazamiento caudal de las orejas, importantes malformaciones vertebrales que llevan a un acortamiento de la columna (lo que da nombre a la enfermedad), extremidades largas y delgadas (fig. 12), así como malformación de los riñones, testículos y corazón (Agerholm y col., 2006; Agerholm y Peperkam, 2007; Testoni y col., 2008).

Histológicamente se ha observado ausencia o desarrollo incompleto de discos intervertebrales y fusión completa o parcial de las epífisis de las vértebras adyacentes (sinostosis vertebral). En algunas áreas, las diáfisis de las vértebras adyacentes se fusionaron debido a la ausencia de epífisis y de discos intervertebrales (fig. 12B) (Agerholm y col., 2006).

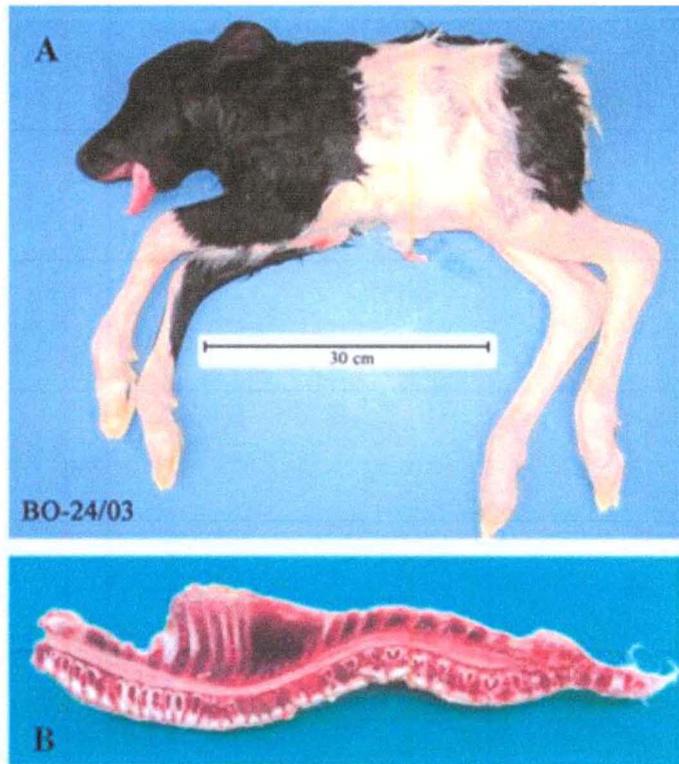


Figura 12. Principales alteraciones del síndrome de Braquiespina. (A) Obsérvese el cuello y tronco corto, extremidades desproporcionadas al cuerpo y braquignatismo inferior. (B) Corte sagital de la columna vertebral, de corta longitud, con malformaciones y sinostosis vertebral. Tomado de Testoni y col. (2008).

Actualmente se sabe que la mutación responsable de producir la enfermedad es una delección de 3.3Kb dentro del gen *FANCI* que elimina los exones 25-27. Esto genera un empalme del exón 24 con el 28 dando lugar a un péptido trunco. *FANCI* codifica para una proteína con roles importantes en los procesos de reparación del ADN (Charlier y col., 2012).

Si bien en Uruguay no se ha diagnosticado ningún caso clínico de Braquiespina, se sabe que la mutación se encuentra circulando en los rodeos Holstein del país. Así lo demostraron Artigas, Federici y col. (2020), quienes encontraron una frecuencia del alelo mutante de 0.03 y una prevalencia de animales portadores de 6%. Gracias a estos estudios, hoy se cuenta con la técnica de genotipado por PCR para el diagnóstico definitivo de la enfermedad.

c) *El Perosomus elumbis* (OMIA 000789-9913)

Perosomus elumbis es un defecto congénito letal que ha sido descrito en las especies bovina, ovina, equina, porcina y canina (OMIA, 2020). Se caracteriza por la ausencia de las partes caudales de la columna vertebral y la médula espinal; segmentos espinales lumbares, sacros y coccígeos (fig. 13 c y d), con malformaciones musculoesqueléticas asociadas de los miembros pelvianos (artrogriposis y atrofia muscular) (fig. 13 a y b) (Castro y col., 2003; Son y col., 2008; Karakaya y col., 2013; Agerholm, 2014). Característicamente, la severidad del fenotipo puede variar entre los diferentes casos (Agerholm, 2014).

La médula espinal tiende a terminar en un conducto vertebral en fondo de saco ciego y, normalmente, la porción caudal se muestra mielodisplásica (Agerholm, 2014). Los animales pueden presentar malformaciones a nivel ano-rectal, urogenital y en órganos abdominales (Buck y col., 2009; Llambí, Arruga, 2018).

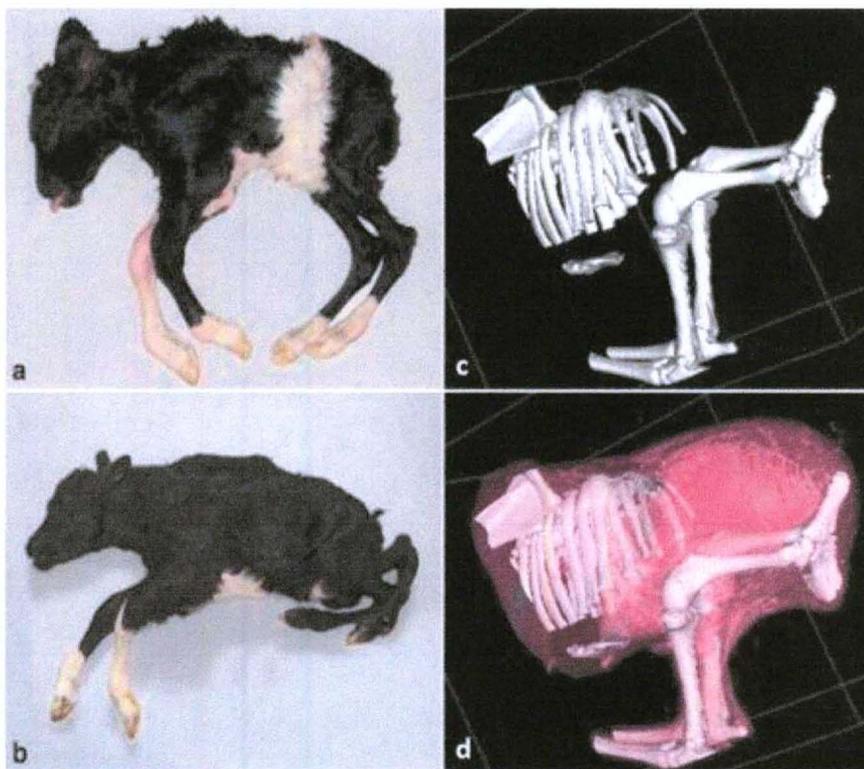


Figura 13. Principales alteraciones del *Perosomus elumbis* (a) y (b) Obsérvese artrogriposis en miembros pelvianos de ambos terneros, y displasia en regiones corporales caudales a la columna torácica. La severidad del fenotipo varía entre a y b. (c) y (d) reconstrucción 3D mediante tomografía

computarizada. Obsérvese la ausencia de vértebras lumbares sacras y coccígeas. Modificado de Agerlhom y col. (2014).

Si bien la enfermedad fue descrita por Gurlt en el año 1832 (OMIA 2020), aún se desconoce su etiología. En los bovinos se ha reportado con frecuencia en la raza Holstein, por lo que algunos autores han sugerido una posible base genética (Agerholm, 2014). Sin embargo, existe un reporte que describe esta malformación en un ternero infectado por Diarrea Viral Bovina (Karakaya y col., 2013).

d) *El Schistosomus reflexus* (OMIA 000890-9913)

El *Schistosomus reflexus* es una malformación congénita poco frecuente que se da principalmente en los rumiantes (Laughon y col., 2005), aunque ha sido descrita además en el equino y el asno (OMIA, 2020). Se caracteriza por presentar un cierre incompleto de la pared ventral abdominal y/o torácica, lo que provoca la exposición de las vísceras abdominales (fig. 14). La columna vertebral adquiere una disposición característica, quedando el cráneo paralelo al hueso sacro, esta disposición genera con frecuencia partos distócicos (Laughon y col., 2005, Prestes y Megid, 2010; Ozalp y col., 2011)

En algunos casos se puede observar que los miembros presentan artrogriposis (Laughon y col., 2005), sin embargo, no es el hallazgo más constante. El *Schistosomus reflexus* es considerado como una forma extrema de hernia abdominal que se encuentra asociada a alteraciones esqueléticas. Se origina durante el desarrollo embrionario, en el momento en que los bordes laterales del disco germinal, en lugar de reflejarse ventralmente para dar lugar a las cavidades corporales, se reflejan dorsalmente (Dennis, 1965; Gómez y col., 2018).

En bovinos, algunos autores como Citek (2012) y Ferreira y col. (2013) han planteado que el *Schistosomus reflexus* podría tener una base genética con un mecanismo de herencia autosómico recesivo. Esto se fundamenta por un elevado número de casos observados en la descendencia de algunos toros. Otros autores han planteado que los mecanismos de herencia podrían ser más complejos y tratarse de un defecto poligénico (Jana y Ghosh, 2001), aunque no se descartan causas multifactoriales e incluso infecciosas (Kumar y col., 2017).

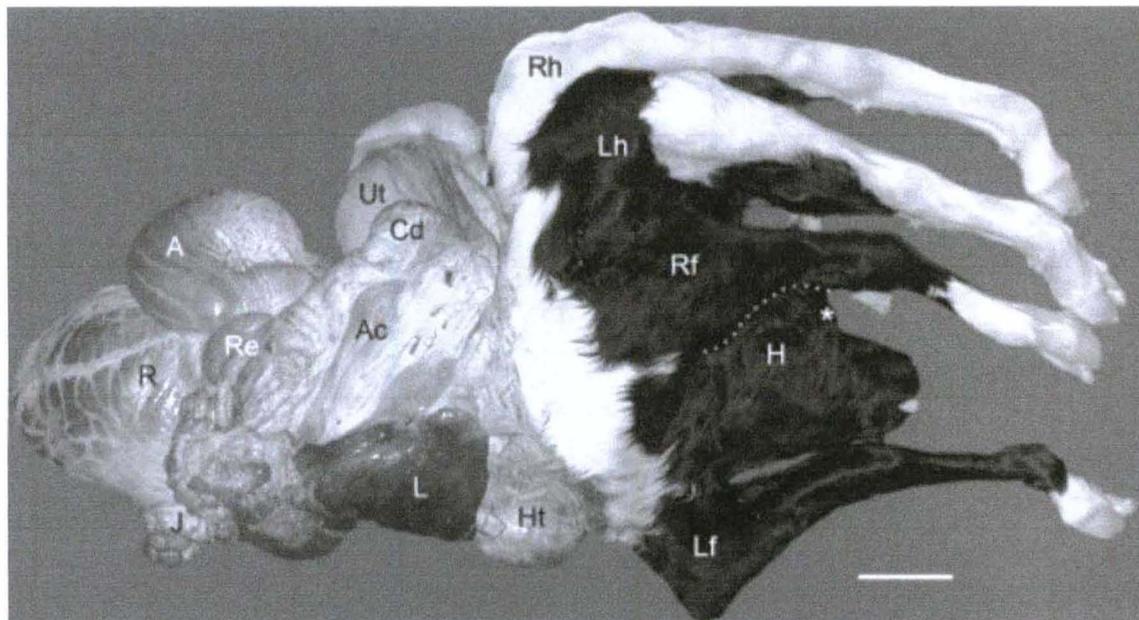


Figura 14. Principales alteraciones del *Squistosomus reflexus*. Vista lateral derecha. (Lf): miembro torácico izquierdo, (H): cabeza, (*): ojo, (Rf): miembro pelviano derecho, (Rh) miembro torácico derecho, (Lh): miembro pelviano izquierdo, (Ht): corazón, (L): hígado, (J): yeyuno, (Ac): colon ascendente, (R): rumen, (A): abomaso, (Re): retículo, (Cd): colon descendente, (Ut): útero. Barra 10 cm. Tomado de Laughon y col. (2005).

e) La espina bífida (OMIA 000933-9913)

La espina bífida (EB) consiste en una falla en la fusión de los arcos vertebrales, sin embargo, los procesos espinosos no se ven involucrados y aparecen desviados lateralmente. Con frecuencia se observa en la región lumbar, particularmente a nivel del sacro (Yoshioka y col., 2017). Existen diversos grados de severidad en la EB, y en base a eso se puede clasificar en dos formas (Cho y Leipold, 1976; Nussbaum y col., 2002; Saura, 2011):

a) espina bífida oculta: el defecto está solo en el arco óseo, mientras que la piel permanece intacta y recubriendo el defecto vertebral. Es la forma más leve, ya que no involucra protrusión de ningún componente medular, pues el defecto vertebral se ve reemplazado por tejido conjuntivo fibroso (fig. 15 a)

b) espina bífida abierta, a menudo asociada con meningocele (protrusión de las meninges, fig. 15b) o mielomeningocele (protrusión de elementos neurales además de las meninges fig. 15c)

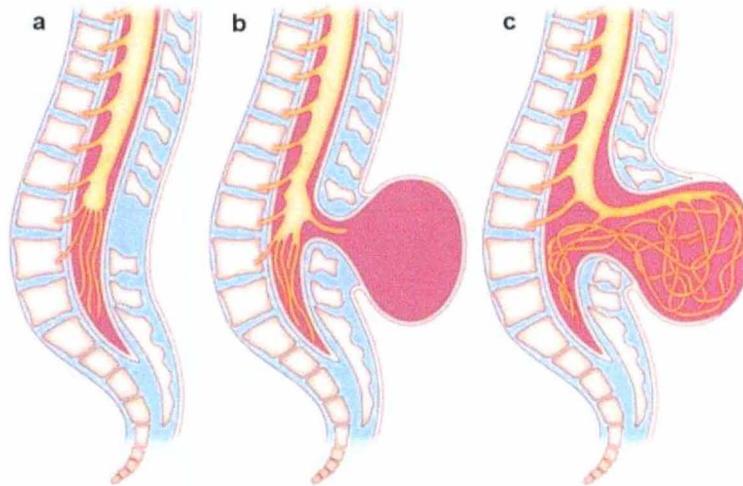


Figura 15. Tipos de espina bífida (EB). (a) EB cerrada. (b) EB abierta: meningocele. (c) EB abierta: mielomeningocele. Modificado de: https://sites.uclouvain.be/anesthweekly/MRP_ENG/index.html?Myelodysplasies (consultado: 23/11/20)

El defecto ha sido descrito en varias especies domésticas como en la vaca, la oveja, perros, gatos y conejos (OMIA, 2020). En los bovinos, la espina bífida se ha visto frecuentemente asociada con artrogriposis (fig. 16 a) (Cho y Leipold, 1976; Cho y Leipold, 1977, Testoni 2010^a), principalmente cuando el defecto se asienta a nivel del sacro (Doige, 1975). En la EB sacra, la atrofia muscular de los miembros pelvianos es característica (Doige, 1975; Testoni y col., 2010). En otros casos se ha visto acompañada de paladar hendido, ausencia de cola o de vértebras caudales, hidrocefalia y *Perosomus elumbis* (Cho y Leipold, 1976).

Se ha reportado la presencia de un solo riñón o fusión de los dos riñones en uno, atresia del ano, aplasia uterina y defectos a nivel del diafragma como posibles alteraciones concomitantes a la EB (Doige, 1975). Asimismo, se ha reportado en los bovinos la asociación de EB a nivel sacro (mielomeningocele) con un desplazamiento caudal de ciertas estructuras cerebrales (p.ej.: cerebelo) dentro del canal vertebral cervical e hidrocefalia. Esta alteración se conoce en los humanos como malformación de Chiari (fig. 16b) (Cho y Leipold, 1977; LeClerc y col., 1997, Testoni y col., 2010^a; Testoni y col., 2010^b).

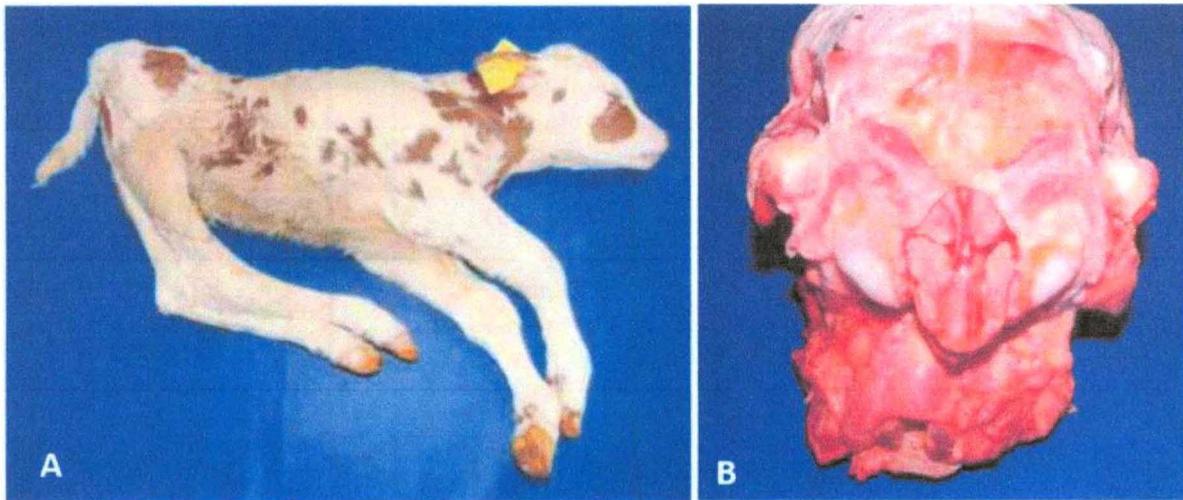


Figura 16. Alteraciones en un ternero con espina bífida. (A) Artrogriposis bilateral simétrica de miembros pelvianos. **(B)** Malformación de Chiari. Nótese el desplazamiento de algunas estructuras encefálicas a través del foramen magnum, más amplio de lo normal. Tomado de testoni y col. (2010^o)

Múltiples factores pueden estar relacionados con las causas de la espina bífida, entre ellos se encuentran las causas genéticas (génicas y cromosómicas) y ambientales. Un estudio realizado por Herzog (1983) comunica la presencia de fracturas cromosómicas en animales con espina bífida y artrogriposis. Artigas y col. (2019) reportan una elevada frecuencia de fracturas cromosómicas en animales sin espina bífida, pero con artrogriposis en miembros torácicos.

La acción de los teratógenos, como agentes físicos (radiación), químicos, biológicos (infecciones virales y bacterianas) o causas multifactoriales, pueden provocar un fallo primario en el cierre del tubo neural o rotura después de su cierre (Maxie y Youssef, 2007). En los bovinos resulta particularmente importante la infección por Diarrea Viral Bovina, ya que se ha reportado en estos casos EB, agenesia sacro-coccígea y artrogriposis (Haligur, 2012).

Las alteraciones congénitas de la columna vertebral desarrolladas en esta tesis, guardan relación en cuanto a los síntomas clínicos y hallazgos de necropsia. Por este motivo, deben ser considerados dentro de un cuadro de diagnósticos diferenciales. Algunas enfermedades pueden ser fácilmente descartadas, en otros casos deben realizarse estudios más complejos, puesto que las diferencias entre casos pueden estar dadas por expresividad variable del fenotipo. En la tabla 1 se muestran los principales hallazgos clínicos comparados para cada enfermedad.

Tabla 1. Principales hallazgos clínicos y patológicos en las alteraciones congénitas de la columna vertebral

Enfermedad	Herencia	Gen	Hallazgos clínicos
CMV	AR	SLC35A3	Retraso del crecimiento, articulaciones de carpo, tarso e interfalángicas anquilosadas y rotadas, malformación a nivel de vértebras y costillas. Braquignatismo.
Braquiespina	AR	FANCI	Reducción severa de peso, acortamiento de la columna vertebral, sinostosis vertebral, extremidades largas y delgadas. Braquignatismo.
Perosomus elumbis	--	--	Agenesia de vértebras lumbares, sacras y coccígeas. Artrogriposis bilateral y atrofia muscular de miembros pelvianos
<i>Schistosomus reflexus</i>	--	--	Cierre incompleto de la pared ventral abdominal y/o torácica. Exposición de vísceras. Inversión de la columna vertebral. Artrogriposis.
Espina bífida	--	--	Falla en la fusión de los arcos vertebrales, principalmente a nivel sacro. Meningocele, mielomeningocele. Artrogriposis y atrofia muscular de miembros pelvianos.

El objetivo de esta tesis es presentar la descripción clínica, anatómica y genética de un ternero con sintomatología compatible con espina bífida abierta.

2. HIPÓTESIS

La anomalía congénita del animal en estudio corresponde a espina bífida abierta en la región lumbosacra.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- a. Realizar la descripción clínica, anatómica, citogenética y molecular de un caso de Espina Bífida en un bovino Holstein Friesian.

3.2. Objetivos específicos

- a. Describir el cuadro clínico y la secuencia de análisis paraclínicos que llevan al diagnóstico etiológico de espina bífida.
- b. Realizar la descripción de las peculiaridades anatómicas del animal en estudio.
- c. Realizar la descripción imagenológica (radiográfica y mielográfica) de la columna vertebral del animal afectado.
- d. Determinar mediante técnicas citogenéticas la presencia de alteraciones cromosómicas en el animal afectado.
- e. Determinar mediante técnicas moleculares la ausencia de las mutaciones del síndrome de Braquiespina y del Complejo de malformación vertebral bovino en el animal en estudio.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1. Caso clínico

Motivo de consulta, reseña y anamnesis

El día 4 de setiembre de 2019 ingresa al Hospital de la Facultad de Veterinaria un bovino hembra, de tres días de edad, raza Holstein Friesian, color overo negro, sin identificación interna del establecimiento y sin registro de trazabilidad. El motivo de consulta era que no podía pararse.

El animal provenía de un predio de la localidad de Rodríguez, departamento de San José, Uruguay. La finalidad productiva del establecimiento era la ganadería de leche sobre campo mejorado y pradera. La ternera nació en un parto eutócico, y durante la gestación, la madre no recibió un tratamiento diferencial al resto del rodeo.

Desde el nacimiento el animal no logró adoptar la estación sobre sus cuatro miembros. Se alimentó en las primeras horas con calostro y luego de las 24 horas de nacida con leche, de forma manual. No se reportaron previamente casos clínicos similares dentro del establecimiento ni en predios linderos.

En el establecimiento se encontraron plantas tóxicas como visnaga (*Ammi visnaga*), duraznillo negro y blanco (*Cestrum parqui/Solanum glaucophyllum*), senecio (*Senecio brasiliensis*), transparente (*Myoporum laetum*) y paraíso (*Melia azedarach*).

Examen objetivo general

En el examen objetivo general no se observaron particularidades en las mucosas, y el tiempo de llenado capilar fue de 2 segundos. No se encontraron alterados los nodos linfáticos, y el animal presentaba un estado del sensorio normal, alerta a los estímulos ambientales. Sin embargo, en cuanto a actitud y movimientos anómalos el animal no era capaz de adoptar la estación, no tenía la posibilidad de incorporarse debido a severas malformaciones en los miembros pelvianos. La base de sustentación del animal eran sus miembros anteriores, lo cual motivó la consulta (fig. 17).



Figura 17. Animal del caso clínico. Nótese la incapacidad para ponerse en estación, sustentación sobre sus miembros torácicos y la deformidad flexural en miembros pelvianos.

Los tegumentos se encontraban intactos a excepción de dos regiones. Una era la piel de porción distal de la cola, de aspecto rudimentario, dónde se observaban varias soluciones de continuidad. La otra era la piel sobre la región media del sacro, donde se observaba una costra sin pelo. Las constantes vitales se encontraron dentro de los rangos normales siendo la frecuencia cardiaca de 82 latidos/minuto, la frecuencia respiratoria de 33 respiraciones/minuto, la temperatura de 39°C, el pliegue cutáneo menor a 2 segundos y pulso de 80 pulsaciones/minuto.

En cuanto a los otros puntos del examen objetivo general los signos particulares y facies no presentaron particularidades, así como tampoco presentó olor bucal y dientes y grandes funciones orgánicas alterados. El tono estaba ausente y el trofismo muscular estaba disminuido en los miembros posteriores. Los miembros anteriores no presentaban particularidades en estos aspectos. Por otra parte, tanto la prueba de la cruz como la de la yugular fueron negativas, el tipo respiratorio que se observó fue costo/abdominal.

En base a la información recabada en el examen objetivo general, se decide realizar un examen objetivo particular de aparato locomotor. En función de los hallazgos clínicos de este examen, que se describen en la sección de resultados, y de la bibliografía consultada, se estableció un diagnóstico presuntivo de espina bífida abierta. Para la confirmación del diagnóstico se realizaron los estudios paraclínicos que se describen más adelante. Debido a la severidad de las malformaciones, el animal fue eutanasiado según protocolo CEUA N° 1003.

4.2. Estudios paraclínicos

- a. *Hemograma:* se tomó una muestra de sangre de la ternera, a partir de la vena yugular, con jeringa de 5cc y aguja 18 G estériles. La muestra fue colocada en tubo con anticoagulante EDTA y fue remitida al laboratorio clínico del hospital de Facultad de Veterinaria – Udelar, donde fue procesada con el equipo MyThic 18 vet.

- b. *Análisis serológico para diarrea viral bovina:* se tomaron muestras de sangre de la ternera y su madre, a partir de la vena yugular, con jeringa de 5cc y aguja 18 G estériles. Las muestras fueron colocadas en tubo sin anticoagulante (tubo seco) y fueron remitidas a la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP).
- c. *Análisis del líquido cefalorraquídeo:* Se tomó una muestra de líquido cefalorraquídeo, mediante el método de punción del espacio subaracnoideo en la región occipital (cisterna magna). La muestra fue remitida al laboratorio clínico del hospital de Facultad de Veterinaria – Udelar.
- d. *Estudios radiológicos:* los rayos X convencionales y la mielografía se realizaron en la unidad de imagenología de la Facultad de Veterinaria-Udelar. Se utilizó equipo convencional de rayos VetterRems 100. Para el escaneo de las imágenes y posterior visualización se utilizó un digitalizador Kodak DirectView, Sistema Classic CR Carestream. Para la mielografía se utilizó 40ml de medio de contraste iodado Telebrix 35 (350 mg/ml) inyectado por punción en la cisterna magna. La mielografía se realizó inmediatamente luego de la eutanasia humanitaria del animal. Los rayos X se realizaron en dos incidencias, latero lateral o perfil y ventro dorsal.
- e. *Análisis citogenético:* se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria – Udelar. Se realizó un cultivo linfocitario de la ternera afectada, a partir de sangre entera periférica obtenida de la vena yugular con heparina como anticoagulante. Un total de 500µL de sangre fueron sembrados en 10 mL de medio de cultivo completo LymphoPrime (Capricorn Scientific) por 72hs a 38 °C. Previo al procesamiento del cultivo (30 min. antes) se adicionó al mismo 0.06µg/mL de colcemid (Capricorn Scientific). La muestra fue tratada con solución hipotónica de KCl (0,075M) a 38°C por 20 minutos y fijada con solución Carnoy (Metanol-Ácido acético 3:1). Los extendidos cromosómicos fueron fijados a la llama y teñidos con

colorante Giemsa 3% (pH=6,8). Las preparaciones fueron observadas en el microscopio óptico Olympus BX60 bajo objetivo de inmersión 100X. Las imágenes se digitalizaron utilizando cámara Evolution VF (Media Cybernetics) y el software Image Pro-Express 6.0 (Media Cybernetics). Se evaluaron 50 metafases completas. La identificación cromosómica se realizará mediante bandeo Q. El análisis interpretación y cariotipo de cada animal se realizará en base al último estándar internacional de nomenclatura cromosómica Bovina (Di Berardino y col., 2001).

f. *Análisis molecular:*

- *Extracción de ADN:*

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria – Udelar. Se realizó la extracción de ADN a partir de sangre entera periférica obtenida de la vena yugular en tubo con EDTA. Un total de 200 µL de sangre fueron tratados con el kit Genomic DNA Purification (Fermentas) según protocolo del fabricante. El ADN aislado se cuantificó en concentración y pureza con espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher). La integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% utilizando GoodView™ (SBS Genetech Co., Ltda.) como tinción.

- *Reacción en Cadena de la Polimerasa.*

Se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria – Udelar. Se amplificó por PCR a tiempo final un fragmento del gen *FANCI* responsable del síndrome de Braquiespina de acuerdo a Charlier y col. (2012). La amplificación se realizó utilizando termociclador Multigene II (Labnet Inc. Global) y el genotipo de los animales se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% utilizando GoodView™ (SBS Genetech Co., Ltda.) como tinción. Paralelamente se amplificó por PCR en tiempo real un fragmento del gen *SLC35A3*, responsable del Complejo de malformación vertebral utilizando termociclador Rotor-Gene6000 (Corbett Research), posteriormente se

realizó el análisis de HRM (high resolution melting) según Branda-Sica y col. (2019).

- g. *Estudios anatómicos:* Una vez realizada la eutanasia, el animal fue conservado en freezer (-20 °C) hasta su disección. Los estudios anatómicos fueron realizados en la unidad de Anatomía de la Facultad de Veterinaria-Udelar. Se realizó la disección simple de las cavidades torácica, abdominal y pelviana. Además, se disecó la columna vertebral en todo su trayecto y los miembros pelvianos, incluyendo sus grupos musculares.

5. RESULTADOS.

5.1. Hallazgos clínicos

Se realizó el examen objetivo particular del aparato locomotor, constatándose a la inspección que el animal presentaba evidente desproporción entre la cintura torácica y pelviana. Las estructuras corporales a caudal de la columna lumbar mostraban un menor desarrollo. Los miembros pelvianos se vieron de aspecto malformado, a la manipulación demostraron una movilidad muy reducida a nivel de la articulación tarso-metatarsiana, denotando una contractura flexural (artrogriposis). El tono muscular estaba ausente, asimismo, el trofismo muscular estaba disminuido. Además, no se constató dolor a la palpación profunda en los miembros y el reflejo de retirada fue negativo. Los miembros anteriores eran normales en todo aspecto.

La zona sacra se observaba malformada, con una notoria depresión en la porción media del hueso (sacro). A la palpación superficial, se encontró una depresión en la porción media del hueso sacro. Sobre esa misma región, se observó una costra sin pelo. A la palpación, la zona se mostraba fluctuante y el sacro se percibía con aparente pérdida de continuidad a modo de hueco de 10mm x 10mm. No se observó dolor a la palpación profunda de esa región.

La inserción de la cola presentaba una apariencia anormal, más alta, sin movimiento, con una porción final de aspecto flácido y algunas nodulaciones de consistencia firme. La palpación de la cola reveló la presencia de vértebras solo

en la parte proximal. A la palpación profunda de la cola no se encontró dolor. La palpación del resto de la columna no mostró otras particularidades.

5.2. Hemograma. Análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR) y serología para Diarrea viral bovina.

Los valores obtenidos en el hemograma se muestran en la tabla 2. En la línea blanca se evidenció una leucocitosis con linfopenia y granulocitosis, mientras que en la línea roja sugiere anemia microcítica hipocrómica con anisocitosis.

Tabla 2. Hemograma del caso clínico en estudio.

Parámetro	Valor	LIR	LSR	Parámetro	Valor
RBC (n° x10 ⁶ /L)	5.47	5.0	10.0	Neutrófilos (n°/µl)	9675
Hgb (g/dl)	6.4	8.0	15	Linfocitos (n°/µl)	3096
HTC (%)	22.3	24	46	Monocitos (n°/µl)	129
VCM (µm ³)	40.8	40	60	Eosinófilos (n°/µl)	0
HCM (pg)	11.7	11	17	Basófilos (n°/µl)	0
CHCM (g/dl)	28.7	30	36	Neutrófilos (%) *	75
PLT x10 ⁹ (n°x10 ³ /L)	739	100	800	Linfocitos (%)	24
WBC (n° x10 ³ /µl)	12.9	4.0	12.0	Monocitos (%)	1
				Eosinófilos (%)	0
				Basófilos (%)	0

LIR= Límite inferior de referencia, LSR= Límite superior de referencia, RBC= Eritrocitos, Hgb= Hemoglobina, HTC= Hematocrito, VCM= Volumen corpuscular medio, HCM= Hemoglobina corpuscular media, CHCM= Concentración de hemoglobina corpuscular media, PLT= Plaquetas, WBC= Leucocitos. * 8% neutrófilos en banda (1032 cel/ µl)

El líquido cefalorraquídeo se observó de aspecto límpido con presencia de coágulo blanquecino. El aspecto post centrifugado fue limpio, incoloro, cristal de roca,

con presencia de botón blanquecino de 1 mm de diámetro. La glucosa fue de 3.77 mmol/L (3.03mmol/L – 4.24mmol/L), proteína 110 mg/L (110mg/L a 330mg/L), el recuento de células nucleadas fue 35 cel/mm³ (0 cél/mm³ a 10 cél/mm³), recuento de hematíes 5 cél/mm³ (0 cél/mm³ a 471 cél/mm³) y se observó una concentración de lactato de 5.78 mmol/L (hasta 3.6 mmol/L). Los valores de referencia considerados son los comunicados por Jean y col. (1995) y por Curti y col. (2020).

Para Diarrea viral bovina, tanto el caso clínico como su madre resultaron negativos al test serológico.

5.3. Análisis citogenético

Se obtuvieron extendidos cromosómicos del animal afectado. No se observaron alteraciones cromosómicas numéricas ni estructurales en el animal estudiado, observándose una fórmula cromosómica de 2n= 60, XX (Fig. 18).



Figura 18. Metafasas del caso de estudio 2n=60, XX. Las puntas de flecha indican los cromosomas sexuales.

5.4. Análisis moleculares: Cuantificación de la extracción de ADN

Se logró extraer ADN de buena calidad en cuanto a concentración (90.8 ng/ µl) y pureza (abs 260/280 = 1.87), asimismo, en la electroforesis en gel de agarosa se observó íntegro.

Mediante PCR en tiempo real y posterior análisis de HRM (high resolution melting) determinamos que el caso clínico es homocigota normal para el Complejo de malformación vertebral bovino. Como puede observarse en la figura 19 a la muestra del animal problema se agrupa con los controles normales (homocigotas GG) con un intervalo de confianza mayor al 94%, separándose de los controles positivos (heterocigota GT).

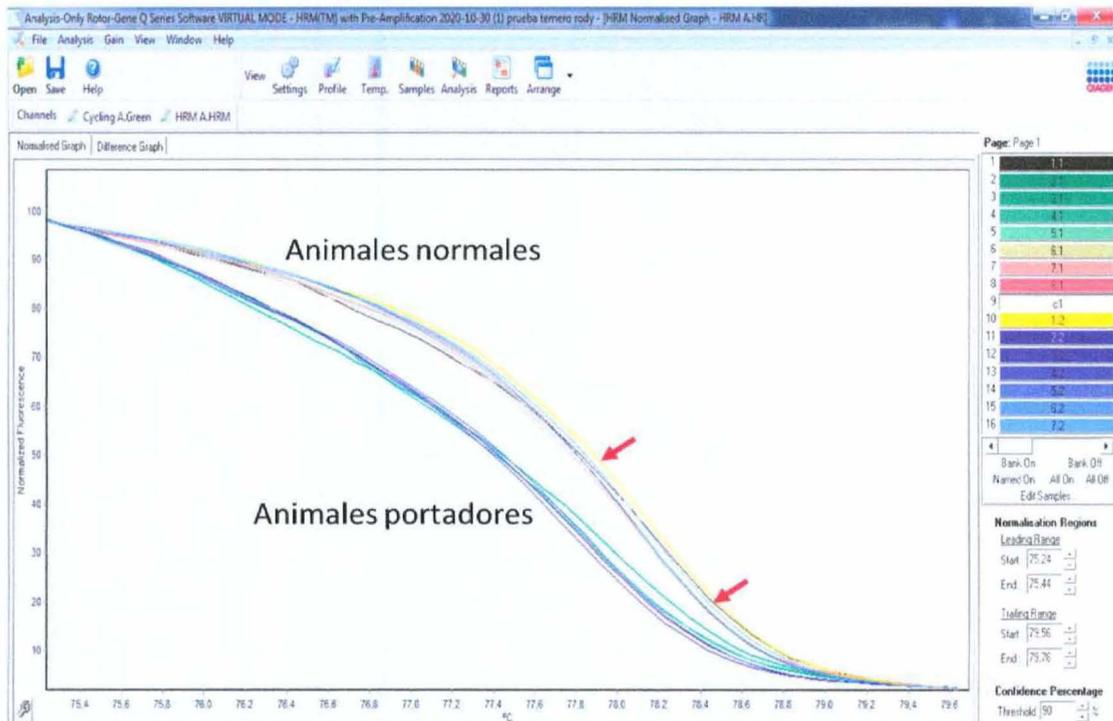


Figura 19. Alteraciones en un ternero con espina bífida. Gráfico de las curvas de desnaturalización normalizadas obtenidas con el análisis de HRM (high resolution melting). Eje x temperatura en °C. Curvas de arriba: animales normales (genotipo GG), curvas de abajo: animales portadores (genotipo GT). Las flechas rojas marcan la curva amarilla y negra, correspondientes al animal del caso clínico.

Mediante PCR a tiempo final y posterior electroforesis se logró determinar que el caso clínico es homocigota normal para el síndrome de Braquiespina. Los animales homocigotas normales (AA) presentan una ampliación de 3738pb, mientras que los portadores (Aa) presentaron dos fragmentos uno de 3738pb y otro de 409pb (fig. 20).



Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Carril 1: control negativo, carril 2: animal portador (control portador Aa), carril 3 y 4: animales homocigotas normales (control normal AA), carriles 5, 6 y 7: caso de estudio por triplicado, carril 8: marcador de peso molecular 1kb.

5.5. Estudio radiológico:

En el estudio radiológico simple de la columna vertebral en la región lumbar, se evidenció una imagen anormal entre las vértebras lumbares 3 a 6 y vértebras sacras. Se observó evidencia radiológica de falta de cierre de láminas vertebrales (fig. 21). En el examen mielográfico, se visualizó columna de contraste con límites netos a través del canal medular. Se observó ensanchamiento en región lumbar caudal con descarrilamiento del contraste en zona sacra y coxígea hacia subcutáneo (fig. 22).



Figura 21. Imagen radiológica de la región lumbosacra del caso clínico. Incidencia ventro-dorsal. La flecha amarilla indica pérdida de continuidad del canal vertebral a caudal de L3.

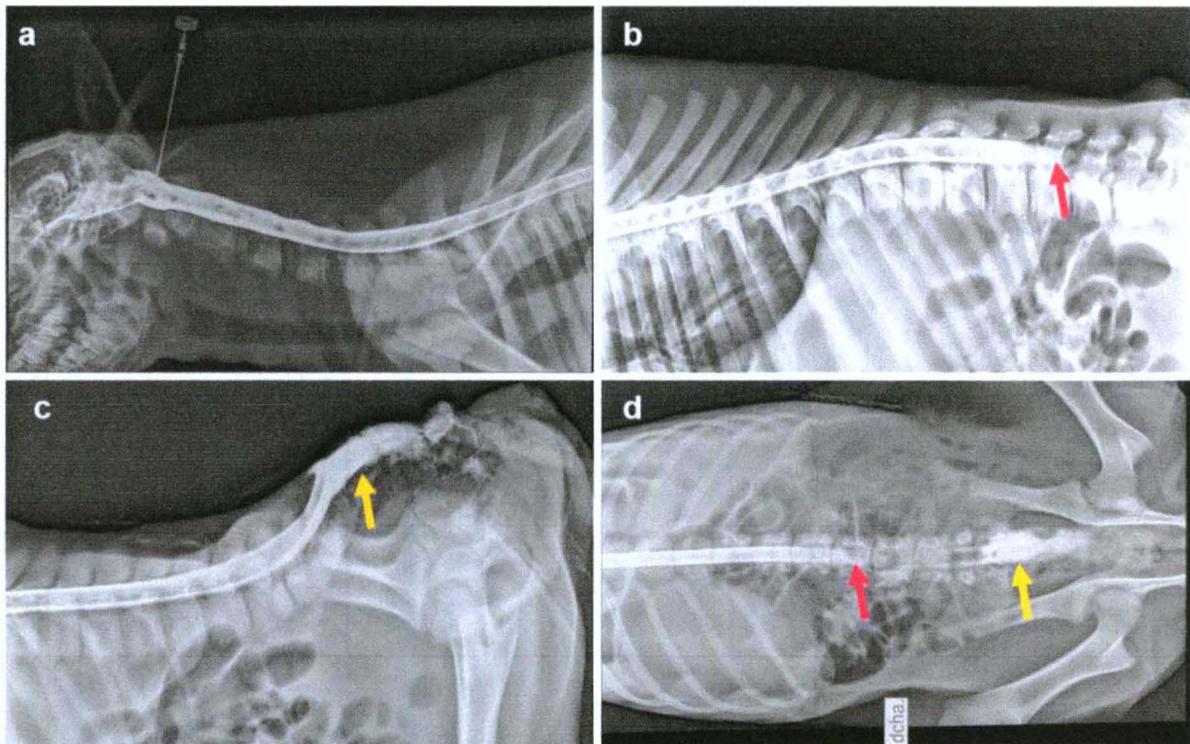


Figura 22. Imágenes mielográficas del caso clínico. (a) Sector cervical e inicio del torácico de la médula espinal. Incidencia latero-lateral. (b) sector torácico e inicio del lumbar de la médula espinal. Incidencia latero-lateral. (c) sector lumbar y sacro de la médula espinal. Incidencia latero-lateral. (d) sector lumbar y sacro de la médula espinal. Incidencia ventro-dorsal. Flechas amarillas: descarrilamiento del líquido de contraste en zona sacra y coccígea. Flechas rojas: pérdida de continuidad del canal vertebral en L3.

5.6. Estudios anatómicos

La ternera pesó 30 kg, externamente se encontraron alteraciones músculo esqueléticas como la presencia de prognatismo (fig. 23 a) y artrogriposis bilateral y simétrica en las articulaciones a nivel del tarso (fig. 23 b). Los músculos de los miembros pelvianos se vieron con un pobre desarrollo, de consistencia suave y coloración pálida (similar al músculo de pollo) (fig. 23b).

En el miembro pelviano izquierdo, en el músculo glúteo medio, encontramos el tejido muscular con un aspecto graso y una porción de tejido normal (fig. 23 c y d), el bíceps femoral se vio de similares características al glúteo medio, pero con mayor porcentaje de tejido con aspecto adiposo.

Los músculos gastrocnemio y flexor digital superficial se encontraron en su totalidad con aspecto graso. El flexor profundo se encontró en similares condiciones, pero con algunas fibras musculares normales entremezcladas. Por último, se observó que la cabeza medial del cuádriceps tenía una pequeña porción afectada.

En el miembro pelviano derecho, a nivel muscular, pudimos observar el bíceps femoral idéntico a como se encontraba en miembro posterior izquierdo. El glúteo medio presentaba un hematoma y su aspecto era graso y macular. El gastrocnemio, el flexor superficial y flexor profundo estaban idénticos al miembro anteriormente descrito. El Nervio ciático y sus ramas se observaron sin particularidades al igual que los tendones digitales.

A nivel de miembro posterior izquierdo se observó el linfonodo precural levemente aumentado de tamaño. Asimismo, estaban aumentados los linfonodos poplíteo izquierdo (I: 3 cm por 2,5 cm; D: 2,5 cm por 2 cm), e iliacos externos izquierdo (I: 3,6 cm por 2,2 cm; D: 2,6 cm por 1,3 cm) al compararlos con el correspondiente contralateral (fig. 24).

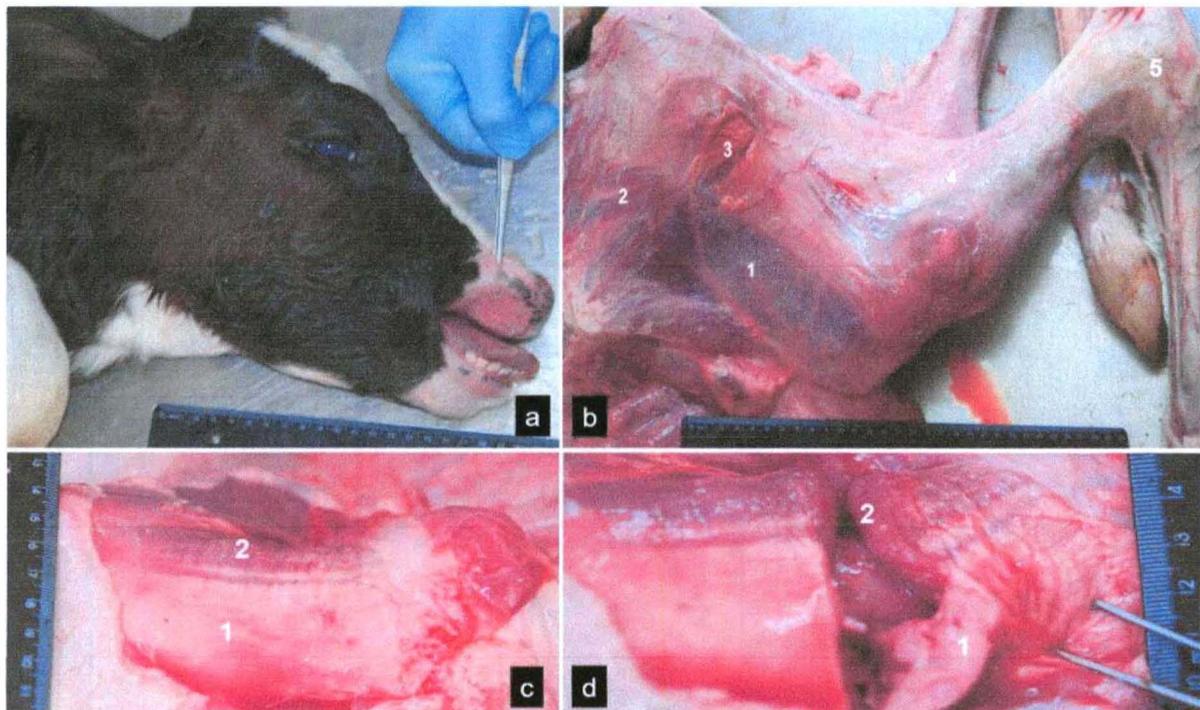


Figura 23. Alteraciones musculoesqueléticas en el caso clínico. (a) Prognatismo inferior. (b) vista lateral del miembro pelviano izquierdo, luego de retirar piel y subcutáneo. 1- Músculo cuádriceps femoral; 2- Músculos glúteos; 3- Músculo bíceps femoral; 4- Fascia de la pierna cubriendo al músculo gastrocnemio; 5- fijación flexural de las articulaciones a nivel del tarso. (c) Músculo glúteo medio. 1- Músculo glúteo medio; 2- Músculo glúteo medio.

porción de aspecto adiposo. 2- porción de aspecto normal. (d) Músculo glúteo medio al corte. 1- porción de aspecto adiposo. 2- porción de aspecto normal.

Figura 24. (a) vista lateral izquierda de la articulación femorotibiorotuliana. 1- Nódulo linfático poplíteo; 2- Tibia; 3- Nervio ciático. **(b)** Vista ventral de pelvis y región sublumbar. 1- vejiga; 2- Ligamento redondo; 3- Acetábulo; 4- Nódulo linfático ilíaco externo izquierdo.

Luego de retirada la piel, en la región sacra, se observó una abertura en la cara dorsal del sacro (fig. 25), coincidente con la depresión palpada en el examen objetivo particular. El canal vertebral abierto, dejaba en evidencia las estructuras terminales de la médula espinal, raíces medulares y meninges (fig. 25 y 26). Las meninges estaban distendidas discretamente y a la incisión, se observó una acumulación de líquido claro y transparente. Se observó ausencia de cierre en el canal vertebral (fig. 27 b). El hueso sacro presentaba una apertura de 25 mm x 25 mm en su cara dorsal, sin otras alteraciones en el resto de la estructura (fig. 27a).



Figura 25. Vista dorsal de región lumbar y sacra. Incisión de la apertura en el hueso sacro. 1- Base de la cola; 2- Raíces medulares y meninges.

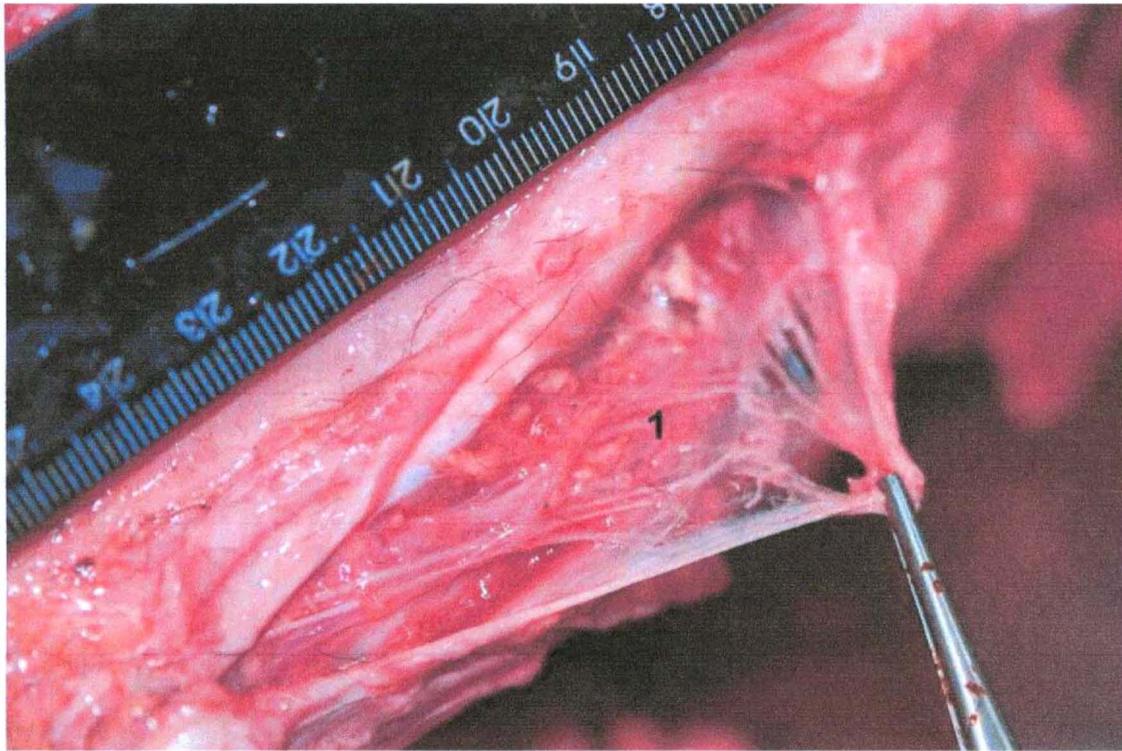


Figura 26. Vista dorsal de región sacra. Incisión de la apertura en el hueso sacro. 1- Raíces medulares y meninges.

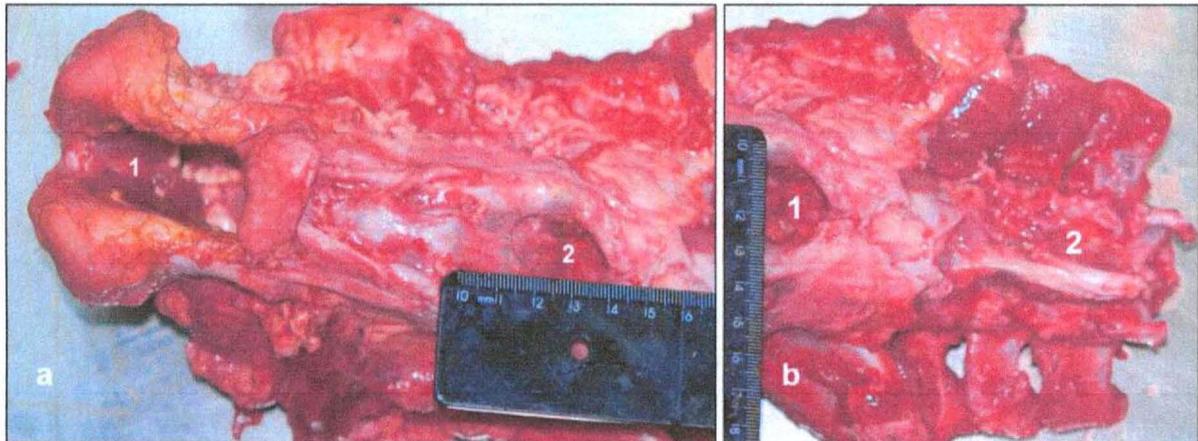


Figura 27. Hueso sacro y vértebras lumbares. (a) vista dorsal del sacro. 1- Canal vertebral; 2- Apertura dorsal en el hueso sacro. (b) vista dorsal de la región lumbosacra. 1- Apertura dorsal en el hueso sacro; 2- Ausencia de arcos vertebrales en vértebras lumbares 3 a 6.

A nivel de la médula espinal se constató que esta era completa, así como el resto de las estructuras nerviosas hasta la última vértebra lumbar (fig. 28), luego por el canal hacia dorsal salían los nervios sacros y coccígeos

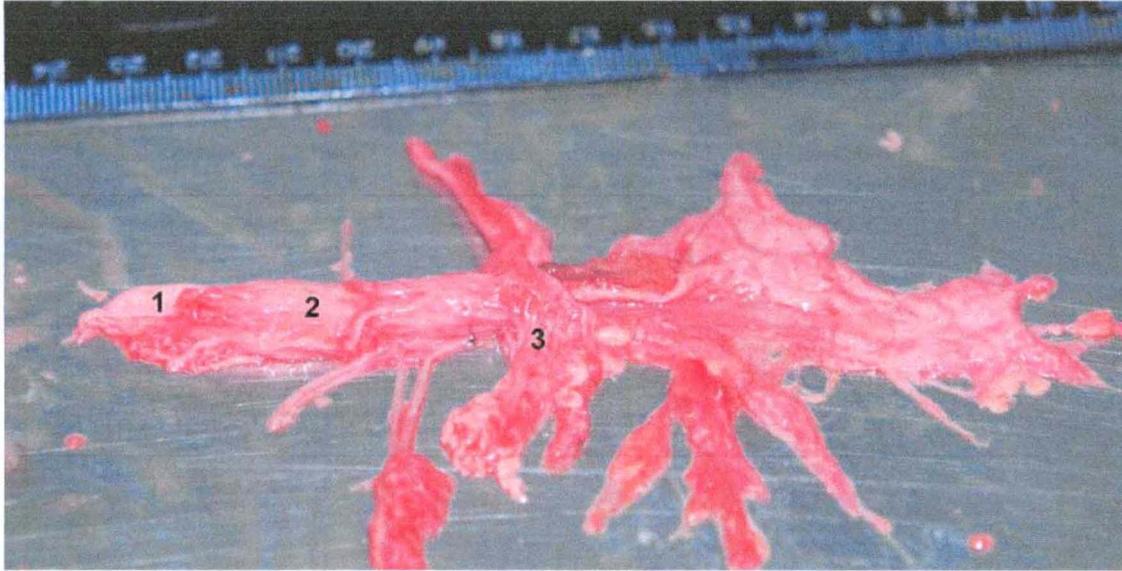


Figura 28. Terminación de la médula espinal. 1- Médula espinal; 2- Meninges; 3- Raíces espinales.

La cola de inserción alta, presentaba un aspecto rudimentario. Solo se observaron vértebras coccígeas en el primer tercio. El resto de la estructura era flácida, con dilataciones nodulares de consistencia firme, que al corte revelaron pelo en su interior (fig. 29).



Figura 29: Cola: Se observa aspecto rudimentario y ausencia de vertebras caudales en los dos tercios distales de la misma. *Dilataciones nodulares con pelo en su interior.

El corazón presentó un engrosamiento de la pared del ventrículo derecho (1,1 cm), con dimensiones similares a las del ventrículo izquierdo (1,5 cm) (fig. 30). No se observaron alteraciones particulares en el resto de los órganos.

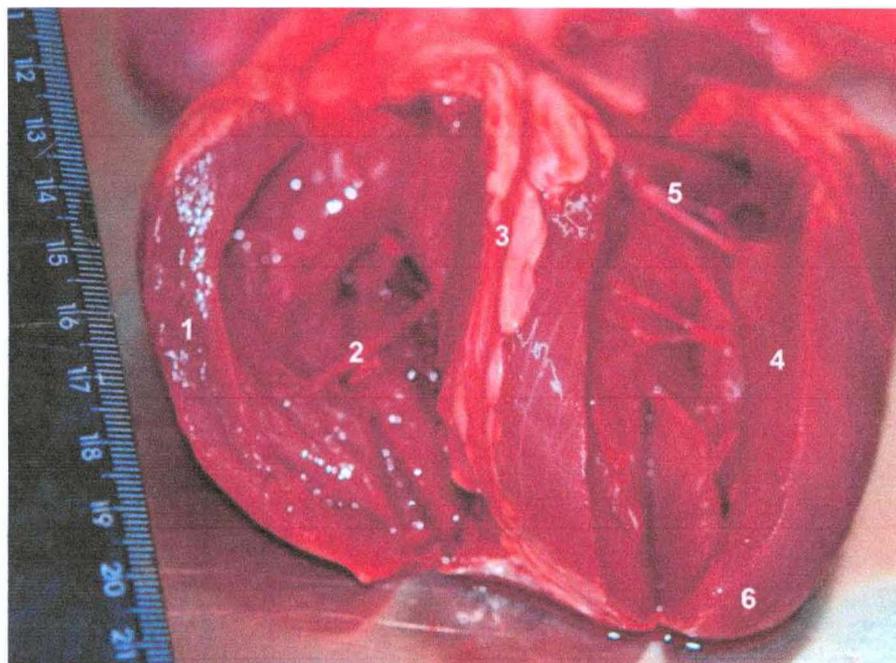


Figura 30. Corazón del caso clínico. 1- Pared del ventrículo derecho; 2- Trabécula septomarginal derecha; 3- Surco paraconal; 4- Pared del ventrículo izquierdo; 5- Válvula mitral; 6- Ápex.

6. DISCUSIÓN

En esta tesis presentamos un caso de espina bífida, un defecto congénito de la columna vertebral, en una ternera de la raza Holstein Friesian de 3 días de edad. Se trata de un defecto congénito que se observa con baja frecuencia en los bovinos. A pesar de ello, la enfermedad ha sido descrita en múltiples razas como: Holstein Friesian, Charolais, Hereford, Aberdeen Angus, Shorthorn, Sueca Roja y Blanca, Zebú, y cruza con Galloway (Cho y Leipold, 1977).

La enfermedad se caracteriza por un cierre incompleto de los arcos vertebrales, con la consecuente falta de formación del canal vertebral. La espina bífida puede darse bajo dos formas clínicas: oculta y abierta (Cho y Leipold, 1976; Nussbaum y col., 2003; Saura, 2011). En ambas presentaciones, se observa el cierre incompleto de los arcos vertebrales. Sin embargo, en la oculta se forma un tejido conjuntivo fibroso sobre el defecto que impide la protrusión de los elementos medulares. Ese tejido fibroso no está presente en la forma abierta, lo que posibilita la protrusión de las

meninges (meningocele) o de las meninges y elementos neurales (mielomeningocele). De acuerdo a esta clasificación, la ternera del caso clínico presentaba una espina bífida abierta, puesto que en los hallazgos anatómicos pudo constatar una dilatación meníngea con líquido claro (presumiblemente líquido cefalorraquídeo), compatible con un meningocele.

En los estudios radiológicos simples, pudo observarse que, a partir de la tercera vértebra lumbar, había un cierre incompleto de los arcos vertebrales, así como de la cara dorsal del hueso sacro. En la mielografía, la médula se mostraba con bordes netos hasta la vértebra L3 y el líquido de contraste se descarrilaba a tejido subcutáneo a nivel de la zona sacra. Estas observaciones son congruentes con lo reportado por varios autores (Doige y col. 1975; Cho y Leipold, 1977; Borges y col., 1997; Testoni^a y col., 2010; Testoni^b y col., 2010). Si bien puede verse afectada cualquier vértebra, se observa con mayor frecuencia en las vértebras lumbares y/o sacras (Yoshioka y col., 2017).

Es imposible conocer con exactitud cuál pudo haber sido el error en el desarrollo que llevó en este caso clínico a la espina bífida. Sin embargo, podemos teorizar respecto a diferentes causas, entre ellas: cierre anormal del tubo neural (neurosporo posterior) (García y Gil, 2013), rotura del tubo neural (Maxie y Youssef, 2007), e incluso fallas en la invaginación del mesodermo embrionario o arrestos en el cierre de los arcos vertebrales (Selzman y col., 1993).

La ternera de este caso presentaba artrogriposis bilateral de las articulaciones tibiotarsiana y tarsometatarsiana. La ocurrencia conjunta de la artrogriposis con la espina bífida lumbar y/o sacra ya ha sido comunicada. Cho y Leipold (1977) estudiaron 18 terneros con espina bífida, el 50% presentaba artrogriposis en miembros pelvianos. Esta asociación también fue reportada por otros autores (Doige y col. 1975; Borges y col., 1997; LeClerc y col., 1997; Testoni^a y col., 2010; Testoni^b y col., 2010).

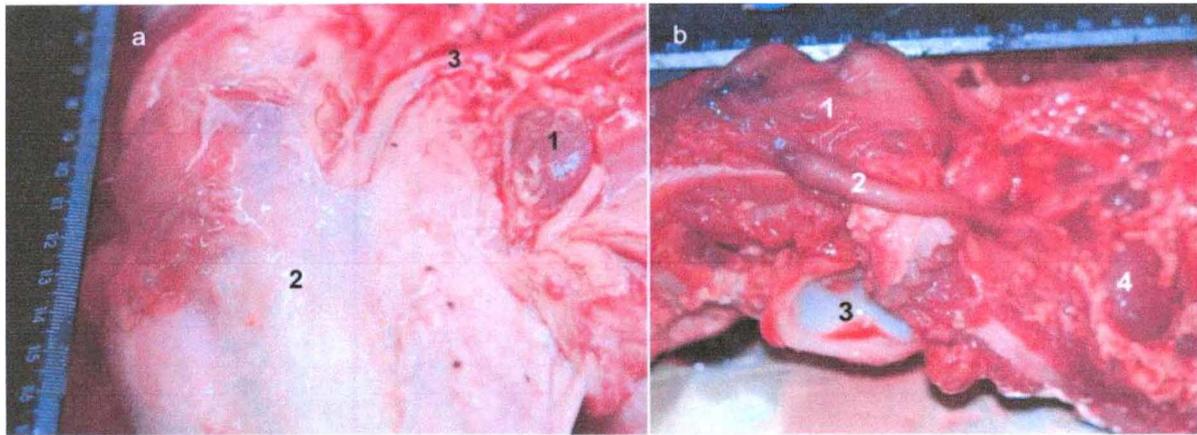
La artrogriposis observada en el caso clínico, obligaba al animal a mantener el decúbito esternal, si bien se encontraba alerta y las grandes funciones estaban conservadas. Esta observación es consistente con lo reportado por Testoni y col. (2010^a), quienes reportan que, en los siete animales con espina bífida estudiados, los

intentos de ponerse de pie fueron infructuosos por la inmovilidad de los miembros pelvianos.

La ternera presentaba la musculatura de los miembros pelvianos notoriamente hipoplásica. Hallazgos como este han sido constantes en todos los casos de espina bífida con artrogriposis comunicados en la literatura consultada (Doige y col. 1975; Cho y Leipold, 1977; Borges y col., 1997; LeClerc y col., 1997; Testoni^a y col., 2010; Testoni^b y col., 2010). La hipoplasia muscular y la artrogriposis pueden relacionarse con la espina bífida desde un punto de vista neurogénico (Doige, 1975). Cuando el desarrollo de las motoneuronas o de las vías nerviosas medulares se ven afectadas, los estímulos no llegan a los músculos, produciéndose una hipoplasia muscular y una rigidez articular congénita (Rousseaux, 1994).

Los procesos mielodisplásicos (hodromielia, siringomelia, hipoplasia de la sustancia gris) pueden acompañar a la espina bífida (Cho y Leipold, 1977). En este aspecto, Borges y col. (1997) establecen que esos mismos procesos displásicos podrían explicar una reducción en el número de motoneuronas necesarias para la inervación motora muscular del feto durante la vida uterina. Por lo que podría explicar la artrogriposis y la hipoplasia muscular. En nuestro caso no se pudo realizar el análisis histológico de la médula, puesto que el animal debió congelarse rápidamente. Sin embargo, un proceso mielodisplásico podría, probablemente, ser la explicación de la hipoplasia muscular y la ausencia de movimientos y sensibilidad en los miembros pelvianos.

Testoni^a y col. (2010) describen el aspecto del músculo hipoplásico como suave y pálido. En el caso reportado en esta tesis, la mayor parte de los grupos musculares de los miembros pelvianos se vieron de forma similar, con un aspecto graso. Doige (1975) realizó el estudio histopatológico del músculo de un ternero con espina bífida observando que las fibras musculares habían sido reemplazadas por tejido adiposo. El aspecto hipoplásico y graso de los músculos podría verse influenciado por fallas en la migración de células de los miótomos (células embrionarias precursoras de los miocitos), ya que cada esclerótomo embrionario tiene un miótomo asociado (Borges y col., 1997).



En el caso clínico presentado se observó un aumento de tamaño de los nodos linfáticos poplíteo, precural e ilíaco externo, posiblemente relacionado con un proceso infeccioso. Esto se sustenta con los resultados del hemograma que, si bien muestran que había una linfopenia, el aumento en la línea blanca se veía explicado por un aumento en los neutrófilos a causa de un proceso infeccioso agudo. En el líquido cefalorraquídeo no se observaron valores a destacar, salvo la celularidad y el lactato levemente aumentados, quizás relacionados a un muy incipiente proceso de meningitis (Jean y col., 1995; Curti y col., 2020). La anemia microcítica hipocrómica con anisocitosis posiblemente pueda haberse debido a fallas en el aporte de hierro.

La ternera presentó una hipertrofia de la pared del ventrículo derecho. Sin embargo, no existen reportes en la literatura consultada de malformaciones cardíacas asociadas a la espina bífida, y tampoco encontramos en el animal alteraciones que pudieran explicarlo. Si se ha reportado la presencia de un solo riñón o fusión de los dos riñones en uno, atresia del ano, aplasia uterina y defectos a nivel del diafragma como posibles alteraciones concomitantes (Doige, 1975). Sin embargo, no se observaron en el caso clínico de esta tesis.

En la literatura consultada, se ha descrito en los bovinos la asociación de espina bífida a nivel sacro con la malformación de Chiari (Cho y Leipold, 1977; LeClerc y col., 1997, Testoni y col., 2010^a; Testoni y col., 2010^b). La relación entre ambas alteraciones se explica por la falta de cierre caudal en la columna vertebral, que permitiría un “escurrimiento” de la médula espinal, siendo relativamente frecuente en los casos de espina bífida lumbosacra (Testoni^a y col., 2010). En el caso clínico presentado en esta tesis no se observó la presentación conjunta de las malformaciones, posiblemente a causa de que el sacro no estaba completamente

abierto en su cara dorsal. Particularmente, la ausencia de la malformación de Chiari puede apreciarse en la mielografía.

En relación a los estudios citogenéticos, Herzog (1983) comunica la presencia de fracturas cromosómicas en animales con espina bífida y artrogriposis. Asimismo, Artigas y col. (2019) reportan una elevada frecuencia de fracturas cromosómicas en un ternero con artrogriposis en miembros torácicos. En el caso reportado en esta tesis no se observaron alteraciones citogenéticas numéricas ni estructurales.

Las malformaciones congénitas de la columna vertebral, pueden darse solas o acompañadas de alteraciones en otros órganos. Algunas forman parte de síndromes complejos, como la Braquiespina, el Complejo de malformación vertebral bovino, el *Persosomus elumbis*, el *Squistosomus reflexus* y la espina bífida. Si bien cada uno presenta signos característicos, la expresividad variable de los fenotipos los convierte en diagnósticos diferenciales. En este caso, el *Squistosomus reflexus* pudo ser fácilmente descartado por las manifestaciones clínicas, mientras que el *Persosomus elumbis* se descartó gracias a los estudios radiográficos. El complejo de malformación vertebral bovino y el síndrome de Braquiespina se descartaron mediante pruebas moleculares de ADN.

Aunque no se pueden descartar por completo las causas ambientales como elemento efector del fenotipo, es importante destacar que la madre no recibió un manejo diferencial al del resto de las vacas gestantes. Además, si bien en el establecimiento se encontraron plantas tóxicas, aunque es imposible determinar si la madre las ingirió durante la gestación, no encontramos en la bibliografía consultada relación de la espina bífida con las especies registradas.

Existen reportes de que el virus de diarrea viral bovina (DVB) puede causar el nacimiento de terneros con severas malformaciones, entre ellas la espina bífida (Karakaya y col., 2013). Sin embargo, los análisis serológicos realizados descartan la infección por DVB tanto en la ternera como en su madre.

La información disponible acerca de la participación de factores genéticos en la espina bífida no va más allá de simples hipótesis. Goss y Hull (1939) lo plantearon en base a 3 terneros afectados hijos de un mismo toro. Testoni y col. (2010) encontraron similitud ancestral en los casos estudiados que contaban con genealogía,

señalando que los siete casos estudiados eran hembras de la raza Holstein Friesian. Desde entonces, ningún autor ha confirmado o negado la hipótesis genética. Para conocer la posible etiología genética, es imperioso contar un mayor número de reportes de casos, que permitan evaluar la prevalencia por raza, sexo y las relaciones de parentesco entre los animales afectados. Al día de hoy, las comunicaciones de espina bífida en bovinos son pocas, por lo que consideramos que la patología se encuentra subestimada en los bovinos.

7. CONCLUSIONES.

El caso reportado en esta tesis de grado era compatible con espina bífida abierta (meningocele) sin asociación con malformación de Chiari. La exploración clínica y los estudios radiográficos son de vital importancia para el diagnóstico, pero no siempre concluyentes. Por lo tanto, dada la similitud de la espina bífida con otros defectos congénitos de la columna vertebral, es fundamental contar con estudios moleculares y realizar la necropsia para un diagnóstico definitivo de la enfermedad. Para nuestro conocimiento, esta es la primera descripción clínica, genética y anatómica de un caso de espina bífida en bovinos en Uruguay.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Agerholm JS., Arnbjerg J., McEvoy F. (2006). Brachyspina syndrome in a Holstein calf. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(4):418-22.
2. Agerholm, J. S., Holm, W., Schimdt, M., Hyttel, P., Fredholm, M., McEvoy F. J.(2014) *Perosomus elumbis* in Danish Holstein cattle. *BMC Veterinary*, 10: 227.
3. Agerholm J.S. (2007). Complex vertebral malformation syndrome in Holstein cattle: the story so far. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49 (supl 1). Disponible en: file:///C:/Users/fccir/AppData/Local/Temp/1751-0147-49-S1-S5.pdf Fecha de consulta: 7/12/20..
4. Agerholm, J.S., Peperkamp K. (2007). Familial occurrence of Danish and Dutch cases of the bovine brachyspina syndrome. *BMC Veterinary Research*, 3: 8.
5. Agerholm, J.S., Bendixen, C., Andersen, O., Arnbjerg, J. (2001). Complex vertebral malformation in Holstein calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13: 283-289.
6. Artigas, R., Federici, M.T., Vázquez, N., Alcántara, M., Ramírez, M., Guerra, S., Dutra, F., Llambí, S. (2020). Identificación por catálogo y detección molecular de bovinos Holstein portadores de braquiespina en Uruguay. *FAVE–Sección Ciencias Veterinarias*, 19:50-54.
7. Artigas R., Vázquez, N., Federici, M.T., Llambí, S. (2019). Fragilidad del cromosoma X en un caso de artrogriposis bilateral del carpo en un bovino Holstein Friesian. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 30(1): 86.
8. Blowey R. W., Weaver A.D. (2006). Atlas a color de enfermedades y trastornos del ganado vacuno. 2ª ed. Madrid, Elsevier, 223 p.
9. Branda, A., Nicolini, P., Federici, M.T., Llambí s. (2019). Identification of holstein cows carriers of complex vertebral malformation by high resolution melting curves (HRM). *Archives of Veterinary Science*. 24:62-70.
10. Buck, B., Ulrich, R., Kuiper, H., Meyer, W., Hewicker-Trautwein, M., Distl, O. (2009). *Perosomus elumbis* in a black and white German Holstein calf. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 122:386-90.

11. Carrillo, D., Lenis, Y., Maldonado, J., Rodríguez, N. (2014) Conceptos básicos de desarrollo embrionario en la vaca. Lenis, Y. Manual didáctico sobre la reproducción, gestación, lactación y bienestar de la hembra bovina. Medellín, Ed. Universidad de Antioquia, p66-95.
12. Castro, M.B., Szabó, M.P., Hokamura, H.K., Romano, M.A. (2003). Perosomus elumbis in a Holstein calf in Brazil. *Veterinary Record*, 152:753.
13. Charlier, C., Agerholm, J., Coppieters, W., Karlskov-Mortensen, P., Li, W., Gerben de Jong, Fasquelle, C., Karim, L., Cirera, S., Cambisano, N., Ahariz, N., Mullaart, E., Georges, M., Fredholm, M. (2012). A Deletion in the Bovine FANCI Gene Compromises Fertility by Causing Fetal Death and Brachyspina. *Plos One* 7:8.
14. Cho, D. Y., Leipold, H. W. (1977). Spina bifida and spinal dysraphism in calves. *Zentralblatt für Veterinärmedizin A*, 24: 680–695.
15. Cho, D. y Leipold, H. (1977). Arnold-Chiari Malformation and Associated Anomalies in Calves. *Acta Neuropathologica*, 39:129-133.
16. Citek J. (2012). Pedigree analysis of Czech Holstein calves with *Schistosoma reflexum*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52:22.
17. Dennis, S.M. (1965). Congenital abnormalities in sheep. *Journal of Department of Agriculture*, 6:235-24055
18. Di Bernardino, D., Di Meo, G., Gallagher, D. (2001). ISCNDB International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids. *Cytogenetics and Genome Research*, 92: 283-299.
19. Doige, C.E. (1975). Spina bifida in a calf. *Canadian Veterinary Journal*, 16:22-25.
20. Dyce, K. M., Wensing, C. J. G., Sack, W. O. (2004). *Anatomía Veterinaria*. 5ª ed. Amsterdam, Elsevier, 872p.
21. Ferreira, D.O., Santarosa, B.P., Monteiro-Toma, C.D., Belotta, A.F., Chiacchio, S.B., Gonçalves, R.C., (2013). Estudo anatomorfológico, radiográfico e tomográfico de *Schistosomus reflexus* em ovino da raça Dorper: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65: 1096-1102.
22. García, J., Gil, F. (2013). *Embriología veterinaria: un enfoque dinámico del desarrollo animal*. Buenos Aires, Inter-Medica, 185 p.

23. Gloobe, H. (1989). Anatomía aplicada del bovino. San José, IICA, 226 p.
24. Gómez, C.A., Pinilla, G.A., Córdoba, J.D. (2018). Schistosomus reflexus en un feto bovino en Colombia. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 29: 1571-1574.
25. Goss, L.J.; Hull, F.E. (1939) Spina bifida (calf). Cornell Veterinarian, 29:239-240.
26. Haligur, M., Ozmen, O., Haligur. A., Hasircioglu. S., Ipek, V., Kale, M. (2012). Bovine Viral Diarrhea Virus Associated Malformations in a Holstein-Friesian Calf. Israel Journal of Veterinary Medicine, 67 :4.
27. Herzog, A., Hohn, H., Vainas, E. (1983). Zitogenetische Befunde bei Kalbern mit Spina bifida. Tierärztliche Umschau, 38(4):259-264.
28. Jana, D., Ghosh, M. (2001). Dystocia due to foetal monster with Schistosomus reflexus and ectopic viscera, a case report. Indian Veterinary Journal, 78:333-334.
29. Maxie, G. Youseef, S. (2007). Nervous system. En: Jubb, Kenedy, Palmer. Pathology of Domestic Animals. 5ª ed. Edinburg, Elsevier, 1:281-457.
30. Karakaya, E., Alpay, G., Yilmazbas-Mecitoglu, G., Alasonyalilar-Demirer, A., Akgül, B., Inan-Ozturkoglu, S., Ozyigit, M.O., Seyrek-Intas, D., Seyrek-Intas, K., Yesilbag, K., Gumen, A., Keskin, A. (2013). Perosomus elumbis in a Holstein calf infected with bovine viral diarrhoea virus. Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere, 41:387-91.
31. König, H.E., Liebich, H.G. (2005). Anatomía de los animales domésticos. Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso. Madrid, Panamericana, V 2.
32. Kumar, B., Yadav, D., Shah, N., Saxena, A. (2017). Dystocia due to Schistosoma Reflexus and its Management through Fetotomy: A Case Report. The Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology, 13: 91-93.
33. Laughon, K., Fisher, K., Halina, G. (2005). Schistosomus Reflexus Syndrome: A Heritable Defect in Ruminants. Anatomia, Histologia, Embryologia, 34(5):312-318.
34. LeClerc, S; Lopez, A; Illanes, O. (1997) Central nervous system and vertebral malformation resembling the Arnold-Chiari syndrome in a Simmental calf. Canadian Veterinary Journal, 38:300-301.

35. Leipold, H.W., Hiraga, T., Dennis, S.M. (1993) Congenital Defects of the Bovine Musculoskeletal System and Joints. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*; 9:93-104.
36. Llambí, S., Arruga, M. (2018). *Selecciones de genética veterinaria I*. Zaragoza, Universidad de Zaragoza, 144 p.
37. Mekonen, H.K., Hikspoor, J., Mommen, G., Kruepunga, N., Kohler, S.E., Lamers, W.H. (2017). Closure of the vertebral canal in human embryos and fetuses. *Journal of Anatomy*, 231(2):260–74 38.
38. Nussbaum, R.L., McInnes, R.R., Willard, H.F. (2002). *Genética médica*. 6ª ed. Rio de Janeiro, Thompson & Thompson, 640 p.
39. Olivares, R., Rojas, M. (2013). Esqueleto Axial y Apendicular de Vertebrado. *International Journal of Morphology*, 31(2):378-387.
40. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). Complex vertebral malformation in *Bos taurus*. Disponible en: <https://omia.org/OMIA1340/9913/> Fecha de consulta: 27/11/2020.
41. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). Perosomus elumbis in *Bos taurus*. Disponible en: <https://omia.org/OMIA000789/9913/> Fecha de consulta: 27/11/2020.
42. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). Perosomus elumbis in *Canis lupus familiaris*. Disponible en: <https://omia.org/OMIA000789/9615/> Fecha de consulta: 7/12/2020.
43. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). Schistosomus reflexus in *Bos taurus*. Disponible en: <https://omia.org/OMIA000890/9913/> Fecha de consulta: 27/11/2020.
44. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). Spina bifida with myelomeningocele in *Bos taurus*. Disponible en: <https://omia.org/OMIA000935/9913/> Fecha de consulta: 27/11/2020.
45. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). Brachyspina in *Bos taurus* Disponible en: <https://omia.org/OMIA000151/9913/> Fecha de consulta: 27/11/2020

46. Ozalp, G.R., Celikler, S., Simsek, G., Ozyigit, M.O., Inan, S. (2011). A Case of *Schistosoma Reflexum* in a Cat with Chromosomal Aberrations. *Reproduction y Domestic Animals*, 46:373-376.
47. Prestes, N., Megid, J. (2010). Una forma rara de ocurrencia de *schistosomus reflexus* en vacuno, relato del caso. *Veterinaria e Zootecnia* (Vol. 17(2). Disponible en: <https://go.gale.com/ps/anonymous?id=GALE%7CA387607278&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=01025716&p=AONE&sw=w>) Fecha de consulta: 1/12/2020.
48. Rojas, M, Smok, C. (2014). Modelando el Cuerpo del Embrión Durante el Período Somítico. *International Journal of Medical Surgery Science* 1 (1): 57-62.
49. Rousseaux, C. (1994). Congenital defects as a cause of perinatal mortality of beef calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 10: 35-51.
50. Sadler TW. (2012). *Langman Embriología Médica*. 12ª ed. Philadelphia, Wolters Kluwer, 384 p.
51. Saura, P.H., (2011). Mielomeningocele fetal por resonancia magnética. *Imagen Diagnóstica*, 2: 31-34.
52. Son, J.M., Yong, H.Y., Lee, D.S., Choi, H.J., Jeong, S.M., Lee, Y.W., Cho, S.W., Shin, S.T., Cho, J.K. (2008). A case of *perosomus elumbis* in a Holstein calf. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70:521-3.
53. Selzman, A; Elder, J; Mapstone, T. (1993). Urologic consequences of myelodysplasia and other congenital abnormalities of the spinal cord. *Urologic Clinics of North America*, 20:485-504.
54. Testoni, S., Diana, A., Olzi, E., Gentile, A. (2008) *Brachyspina* syndrome in two 38 Holstein calves. *Veterinary Journal*, 177:144–146.
55. Testoni, S., Dalla, A., Gentile, A. (2010). Imaging diagnosis-cerebellar displacement and spina bifida in a calf. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 51:162–164.
56. Thomsen, B., Horn, P., Panitz, F., Bendixen, E., Petersen, AH., Holm, LE., Nielsen, VH., Agerholm, JS., Arnbjerg, J., Bendixen, C. (2006). A missense mutation in the

bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Research*, 16:97-105.

57. Yoshioka, K., Ishikawa, A., Sugiyama, M., Nagasao, J., Kikuchi, M. (2017). A case of a giant mass in the lumbar region of a newborn calf. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 94(1): 1–6.