

Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias

ISSN 0365514-8 Versión Impresa
ISSN 1514-2590 Versión Electrónica
ISSN 1666295-4 Versión CD-ROM

ANALECTA VETERINARIA



Publicación de la
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Volumen 26 n° 1 año 2006



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias

ANALECTA

VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol. 26 n° 1, 2006

Publicación de la
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

Autoridades

Decano

Dr. Edgardo Nosetto

Vicedecano

Bac. Reinaldo Fonrouge

Secretario Académico

Méd.Vet. Enrique Félix Costa

Secretario de Postgrado

Dra. Pilar Peral García

Secretario de Extensión Universitaria

Dr. Jorge Romero

Secretario de Ciencia y Técnica

Ing.Zoot. Fernando Noel Dulout

Secretario de Asuntos Estudiantiles

Méd.Vet. Fernando Marino

Secretaria de Gestión de Calidad

Dra. María Gabriela Echeverría

ANALECTA VETERINARIA

Director

Dr. Nestor Oscar Stanchi

Editor Responsable

Dr. Eduardo Marotta

Secretario de Redacción

Méd. Vet. Daniel O. Arias

Comité Editorial

(Facultad de Ciencias Veterinarias)

Dra. Liliana Lagrecca

Dr. Eduardo Gimeno

Bact. Carlos Gómez

Dr. Florestán Maliandi

Dr. Pablo E. Martino

Méd.Vet. Enrique Pennimpe

Dra. Pilar Peral García

Dr. Carlos Perfumo

Clasificada nivel 1 (superior de excelencia) por
CAICYT-CONICET

Evaluadores de trabajos de Analecta Veterinaria:

L Basso (Argentina), HA Brusco (Argentina),
F Capano (Uruguay), A Conigliaro (Argentina), L Estol (Argentina), J Idiart (Argentina), E Montero Gei (Costa Rica), RA Fernández (Argentina), J Lasta (Argentina), L Rodríguez Roque (Costa Rica), A Fernández Alosa (Brasil), H Tersolo (Argentina), J Zorzópulos (Argentina), E Gimeno (Argentina), C Schenk (Argentina), E Coppos (Argentina), LM Friche Passos (Brasil), JM Gutiérrez (Costa Rica), R Cacchione (Argentina), F Cortés Benavides (España), M Carballo (España), RM Dauder (España), R de Torres (Argentina), P Ostroskywegman (España), J Surralles Calonge (España), N Auza (Argentina), M Barranteguy (Argentina), M Carballo (Argentina), JA Coppo (Argentina), C Corbellini (Argentina), F Costa (Argentina), C Eddi (Argentina), A Fosatti (Argentina), E Gentilini (Argentina), N Gómez (Argentina), S Gómez Cabrera (Argentina), C Gómez Dumm (Argentina), J González Tomé (Argentina), G. González (Argentina), A Guglielmo (Argentina), I von Landzewitsch (Argentina), N Leardini (Argentina), L León Vizcaino (España), C Lerena (Argentina), JC Lorente (Argentina), M Mariano (Argentina), H Molinuevo (Argentina), M Monina (Argentina), E Moras (Argentina), SJ de Oliveira (Brasil), A Parma (Argentina), J Pereira (Argentina), J Pistani (Argentina), B Ruksan (Argentina), B Rutter (Argentina), E Smitsaart (Argentina), J Troiano (Argentina), C Carfagnini (Argentina), J de Filippo (Argentina), C Machado (Argentina), I Sommerfelt (Argentina), P Soto (Argentina), E.Romero (Argentina), R Alberio (Argentina), A Soraci (Argentina).

La revista ANALECTA VETERINARIA es una publicación semestral de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Está destinada a la difusión de trabajos científicos en el campo de las Ciencias Veterinarias, generados en esta Unidad Académica y en otras instituciones. Asimismo, reflejará las actividades académicas de postgrado y de extensión que se desarrollan en esta Casa de Estudio.

The Journal ANALECTA VETERINARIA is a biannual publication of the College of Veterinary Sciences of the National University of La Plata, Argentina. It is dedicated to the diffusion of scientific reports in the field of the Veterinary Sciences, generated in this and in other institutions. Also, it will reflect the academic activities of graduate school and of extension that they are developed in this College.

ISSN 0365514-8 Versión Impresa

ISSN 1514-2590 Versión Electrónica

<http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/analecta.html>

ISSN 1666295-4 Versión CD-ROM

Registro Propiedad Intelectual 77383

Dirección postal: CC 296 (B1900AVW)

La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA

Las opiniones expresadas por los autores que contribuyen a esta revista no reflejan necesariamente las opiniones de este medio, ni de las entidades que la auspician o de las instituciones a que pertenecen los autores.

Queda prohibida la reproducción total o parcial por cualquier metodología del material impreso en esta revista sin el consentimiento expreso del Editor. Está autorizada la reproducción con fines académicos o docentes mencionando la fuente. El uso de nombres comerciales está destinado únicamente para la identificación y no implica el respaldo directo o indirecto de los Ministerios de la Nación Argentina ni de los países respectivos de donde provengan los trabajos. Tampoco se garantizan ni respaldan los productos promocionados en los avisos de publicidad.

Acceso Electrónico a ANALECTA VETERINARIA

Si tiene acceso a INTERNET, puede recuperar la revista electrónicamente y en forma gratuita accediendo a la página en la Web

www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/analecta.html

Los números de la revista a partir del Volumen 18 están disponibles en formato de archivo: pdf (Portable Document File-Adobe Acrobat Reader®) y pueden imprimirse en cualquier impresora que permita diferenciar escala de grises o colores. Se recomienda que la misma posea un resolución mínima de 600 x 600 dpi.

Para más información sobre cómo recibir ANALECTA VETERINARIA electrónicamente, enviar un e-mail a la dirección: analecta@fcv.unlp.edu.ar

Revisión de estilo: Per. Eleonora Rolleri

Diseño

Prof.Dr. Nestor Oscar Stanchi

Diseño de Tapa

Andrea López Osornio (DCV)

ANALECTA VETERINARIA está indizada en el Índice Latinoamericano de Revistas Científicas LATINDEX

(www.latindex.unam.mx),

Ulrich's International Periodicals Directory

(www.ulrichsweb.com)

Zoological Records

(www.biosis.org.uk/products_services/zrss.html)

BIOSIS (<http://www.biosis.org>)

Se solicita canje - On demande l'échange - We ask for exchange - Si prega lo scambio
Man bitter um austausch - Pedese permuta - Oni petas intersangon

Citación de la versión electrónica: La citación de los artículos aparecidos en la versión electrónica de ANALECTA VETERINARIA (VE) debería seguirse según el siguiente ejemplo:

Costa E.F. y col. Alteraciones en la diferenciación y proliferación celular cutánea en bovinos, inducidas por Hipervitaminosis D de origen vegetal. *Analecta vet* (VE) 1998; 18, 1/2: 7-13 (7 pantallas). Recuperable de www.fcv.unlp.edu.ar

Citación de la versión CD-ROM: La citación de los artículos aparecidos en la versión en CD-ROM de ANALECTA VETERINARIA (CD-ROM) debería seguirse según el siguiente ejemplo:

Tittarelli C.M. y col. Efecto de las lluvias sobre la composición mineral de gramíneas y *Lotus glaber mill* del partido de Magdalena. *Analecta vet* (CD-ROM) 2001; 21, 1: 54-57 (4 pantallas).

Impresión

ANALECTA

Pronunciación: «a-n&l-'ek-t&

Etimología: LatinModerno *analecta*, del Griego *analekta*, plural neutro de *analektos*, verbo de *analegein* recolectar, de *ana-* + *legein* reunir: selección miscellanea de pasajes escritos, cartas.



Foto de tapa: Facultad de Veterinaria (vista desde entrada de agronomía). Principios de siglo XX.

Todos los trabajos publicados en ANALECTA VETERINARIA son sometidos a revisores externos.

El Editor se reserva el derecho de editar los artículos para clarificarlos y modificarles el formato para adecuarlos al estilo de ANALECTA VETERINARIA.

All articles published in ANALECTA VETERINARIA are submitted to external scientific reviewers.

The Editor reserves the right to edit articles for clarity and to modify the format to fit the publication style of

ANALECTA VETERINARIA

Impreso en papel libre de ácido

Printed in acid-free paper

Impreso en Argentina

Printed in Argentina



**Artículos de Investigación
Research articles**

**PRODUCCION DE ENSILADO DE PESCADO EN BAJA ESCALA PARA USO DE EMPREN-
DIMIENTOS ARTESANALES.** Fish silage for small producers.

J Copes, K Pellicer, G del Hoyo, N García Romero.

5-8

**PHYSIOLOGICAL VARIATIONS OF SERUM ELECTROLYTES (Na, K, Ca, P, Mg, Cu) IN
FARM-HOUSED *Caiman latirostris* AND *Caiman yacare* (Crocodylia: Alligatoridae).**

Variaciones fisiológicas de electrolitos séricos (Na, K, Ca, P, Mg, Cu) en *Caiman latirostris*
y *Caiman yacare* (Crocodylia: Alligatoridae) alojados en criaderos.

JA Coppo, NB Mussart, NN Barboza, SA Fioranelli, GA Koza, WS Prado.

9-15

**Comunicaciones breves
Short communications**

**ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA PRODUCIDA POR *Clostridium piliforme* EN RA-
TONES N:NHI(S)-nu TRANSPLANTADOS CON LA LÍNEA TUMORAL A 549.** Study of the
interference produced by *Clostridium piliforme* in nih(s)nu in Mice Transplanted with the
Tumor Line A549.

M Ayala, S Milocco, G Principi, J Laborde, M Carriquiriborde, P Cagliada, C Carbone

16-18

RINOSCOPIA EN CANINOS. Canine Rhinoscopy.

AN Aprea, AL Giordano, HA Baschar, E Bonzo, A Massone.

19-21

ATRESIA DE LA VENA PORTA EN UN CANINO. REPORTE DE UN CASO. Vascular Portal
Atresia.

MG Allende, W Acosta, HA Baschar, A Massone, ML Diez, AN del Amo.

22-27

**Revisiones
Review**

**ADMINISTRACIÓN TRANSDÉRMICA DE FÁRMACOS: UNA ALTERNATIVA TERAPÉU-
TICA.** Transdermal Drug Administration: a Therapeutical Alternative.

NF Villarino, MF Landoni.

28-37

**FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA Y CONTROL DE LOS CICLOS ESTRALES EN LA GATA
DOMÉSTICA.** Reproductive Physiology and Contraception in Queen.

F Giménez, MC Stornelli, CA Savignone, CM Tittarelli, RL de la Sota, MA Stornelli.

38-43

PRODUCCION DE ENSILADO DE PESCADO EN BAJA ESCALA PARA USO DE EMPRENDIMIENTOS ARTESANALES

J Copes¹, K Pellicer¹, G del Hoyo¹, N García Romero².

¹Cátedra de Tecnología y Sanidad de los alimentos. ²Cátedra de Patología General.
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Resumen: *Las producciones alternativas en el ámbito agropecuario han cobrado especial interés para los pequeños productores como una forma de diversificar la estrategia de producción. La mayor limitante de estas producciones emergentes se basa en la necesidad de alimentos de buena calidad y bajo costo. El ensilado de pescado es un suplemento dietario desarrollado y usado con grandes resultados en otros países. La finalidad de este trabajo es comunicar la obtención de ensilado de pescado, con una metodología sencilla, accesible, económica y factible de ser implementada por productores con bajo nivel de tecnificación.*

Palabras claves: ensilado de pescado, acidificación.

FISH SILAGE FOR SMALL PRODUCERS

Abstract: *Alternative productions in the farming field have become of great importance to small producers as a way to expand their production strategy; the main obstacle being the demand of good quality food at a low cost. Fish silage is a diet supplement which has been developed and used successfully in other countries. The subject of this work is fish silage production with a simple, available and economical method that doesn't require the use of advanced technology.*

Key words: fish silage, acidification.

Fecha de recepción: 29/08/05

Fecha de aprobación: 20/01/06

Dirección para correspondencia: Julio A. Copes, Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

E-mail: jcopes@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

El ensilado de pescado es un producto que puede ser elaborado a partir de los residuos de la elaboración de productos de la pesca (1, 2).

Según Balsinde Ruano (3) y Oetterer (4), el ensilado de pescado es un alimento que posee gran digestibilidad, cualidad que le proporciona un gran beneficio en alimentación animal, sin dejar de mencionar que las proteínas que lo constituyen son de un elevado valor biológico.

Esta modalidad se ha desarrollado en muchos países europeos, como así también en América Latina (5, 6) con la finalidad de proveer un suplemento dietario para la alimentación de cerdos, aves, pilíferos, ranas, peces, etc.

La metodología para la obtención de ensilados es de bajo costo, relativamente fácil y se pueden adecuar los volúmenes a las necesidades de cada producción.

En la elaboración del ensilado se genera un descenso del pH a valores cercanos a 4. De esta manera, se activan las enzimas propias del pescado produciendo su autólisis. Como consecuencia se modifican características intrínsecas que inhiben el desarrollo de bacterias del deterioro y patógenas, que le confiere al producto una conservación prolongada en el tiempo, a temperatura ambiente.

Los ensilados pueden ser biológicos y químicos. Los primeros, son aquellos que a la molienda del pescado, se le adicionan hidratos de carbono (ej. melaza) y microorganismos (*Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus*, *Candida lipolytica*, etc.). En el caso de los químicos, se utilizan diferentes ácidos, tales como: ácido fórmico, sulfúrico, clorhídrico, propiónico o mezclas de acético, fórmico y fosfórico, fórmico y sulfúrico o propiónico y sulfúrico (7, 8, 9). El resultado final en ambos casos es un descenso del pH.

Según las consideraciones anteriormente citadas, se tomó como objetivo de este trabajo el desarrollo de un ensilado de pescado en pequeña escala a partir de residuos de pejerreyes, con la finalidad de obtener un suplemento dietario proteico de alto valor biológico para ser utilizado en micro emprendimientos de acuicultura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como materia prima se utilizaron residuos del fileteado de pejerrey (cabeza, tronco y vísceras), filetes defectuosos y algunos pescados enteros. Se obtuvieron un total de 12 kg, en 5 oportunidades, conservándose a -18 °C durante 2 meses.

Previo descongelado, se picó con una máquina manual (picadora de carne) marca Alexander Werk N° 10. El primer picado se efectuó empleando una rejilla con orificios de salida de 1 cm de diámetro y se almacenó en recipientes plásticos con tapa. Luego se acidificó el producto

con el agregado de 2,8 % de ácido fórmico (Douglas Indus. Arg.), posteriormente se procedió a mezclar el preparado y se lo conservó a temperatura ambiente. Un segundo picado se realizó a las 24 horas utilizando una rejilla de 0,5 cm de diámetro.

A las 24 horas del primer mezclado, se controló el pH, obteniéndose un valor de 4,40. Se adicionó a la mezcla una solución de ácido sulfúrico al 20% en forma gradual, hasta estabilizar el pH en 4.

A los 30 días, se tomó una alícuota de aproximadamente 25 g y se sumergió durante 48 horas en agua para observar su estabilidad en el medio acuoso.

La evaluación del producto se llevó a cabo mediante la toma de pH, análisis microbiológicos, determinación de humedad y determinación del porcentaje de proteína.

Las determinaciones de pH se realizaron con un pH metro (Hanna HI 8424) introduciendo el electrodo a 2, 5 y 10 cm de profundidad desde la superficie del ensilado, en forma diaria durante toda la experiencia. El valor final, se obtuvo de un promedio de 10 tomas.

Los análisis microbiológicos se realizaron mediante el conteo de psicótrofos totales, hongos y levaduras, los días 15, 20, 25 y 32. Las colonias aisladas en los recuentos de psicótrofos totales, se colorearon con la tinción de gram.

También, se evaluó la presencia de *Salmonella* spp los días 20 y 30. Todos los análisis bacteriológicos se realizaron siguiendo la metodología descripta en Food and Drugs Administration (FDA) (10).

Se determinó humedad en estufa de secado San Jor SE 30 T a 105 °C hasta peso constante y proteínas por el método de Kjeldhal.

RESULTADOS

El picado obtenido con la metodología citada produjo una pasta uniforme, que permitió el contacto homogéneo con los ácidos (7). Luego del segundo picado y con el uso de los dos ácidos (ácido fórmico y sulfúrico) se logró el pH buscado (4), manteniéndose cerca de ese valor durante 30 días (Fig. 1).

Al día cero el ensilado presentó características de textura untuosa y su color fue gris claro. Después de 5 días, se transformó en una pasta de color marrón, adhesiva (queda adherido a las paredes de un cuchillo) que mantuvo su forma.

Las alícuotas del ensilado sumergidas en agua mantuvieron la forma sin ningún tipo de modificación dentro de las 24 horas, mientras que a las 48 horas, se observó que la forma se mantuvo, pero se evidenciaron pequeñas grietas.

Los estudios microbiológicos mostraron un bajo recuento de bacterias psicótrofas con una disminución luego del día 25, lo cual no influye en

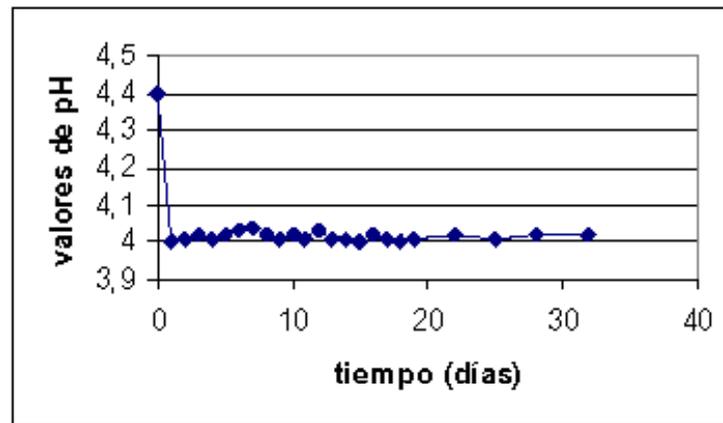


Fig. 1: Promedio de valores de pH obtenidos del ensilado de pejerrey.

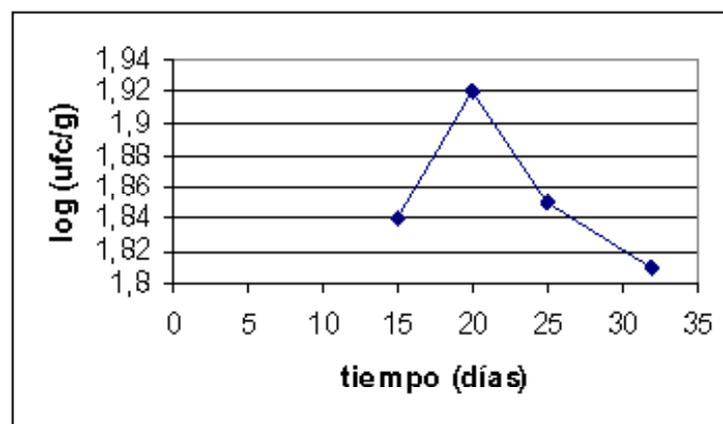


Fig. 2: Valores obtenidos en los recuentos de microorganismos psicrótrofos totales log (UFC/g).

la conservación del producto. La figura 2 muestra los valores obtenidos en el recuento de microorganismos psicrótrofos totales (log [UFC/g]).

En la tinción de Gram, se identificaron gérmenes Gram positivos, de los cuales un 90% presentó forma de bacilos grandes, y el 10% restante fueron formas cocoideas. No se obtuvo desarrollo de hongos y levaduras. La investigación de *Salmonella* spp. arrojó resultado negativo.

El análisis de humedad no arrojó diferencias con respecto al tiempo de almacenamiento, ya que en el día 1 se obtuvo un 77% y en el día 30 fue de 76%.

Con el método de Kjeldhal, el porcentaje de proteínas en el día 30 fue de 16,6%.

DISCUSIÓN

Una de las etapas más importantes en la elaboración del ensilado de pescado es la molienda, para lo cual han sido descritas distintas técnicas de molienda de pescado y sus residuos (3, 7).

En este trabajo se emplearon herramientas accesibles para los pequeños productores, como

las máquinas manuales de picar carne. La utilización de una rejilla de mayor diámetro (1 cm), posterior acidificación y nuevo picado con una rejilla de menor diámetro (0,5 cm) solucionó el problema que generan las especies que poseen escamas en la elaboración de ensilados. Vale destacar que esta metodología puede ser realizada sin inconvenientes por una sola persona.

Con respecto a la acidificación, el agregado de 2,8% de ácido fórmico no fue suficiente para llegar a un pH de 4, lo cual se logró con la adición de ácido sulfúrico al 20%.

El pH alcanzado con el agregado de ácidos genera características intrínsecas que no son aptas para el desarrollo de muchas especies bacterianas, por lo cual resulta irrelevante la carga microbiana inicial de la materia prima. También, consideramos importante resaltar, que en los meses de otoño e invierno las temperaturas son bajas, influyendo en el desarrollo microbiano en los ensilados que utilizan esta metodología.

En este caso, no influyó la temperatura, ya que, a los 15 días de realizado, las características organolépticas observadas concordaron con los

resultados obtenidos por otros autores (3, 4, 7), así como también los porcentajes de humedad y proteínas.

Con respecto a la firmeza del producto, el tiempo durante el cual mantuvo su forma sumergido en el agua y la capacidad de mezclarse con otros componentes (fibra, proteínas, antibióticos, etc.) le confieren al mismo una gran versatilidad al momento de elegir un alimento como suplemento dietario.

También es importante mencionar que este tipo de suplemento es de muy bajo costo (si es comparado con harina de pescado).

Por lo expuesto, concluimos que el producto posee una sumatoria de ventajas para los pequeños productores que justifican la implementación del ensilado químico en los establecimientos de acuicultura:

Materia prima económica y de fácil obtención.

Maquinaria de proceso barata y sin complicaciones de operatividad.

Insumos accesibles (ácidos).

Sencilla operatividad y manipulación.

Prolongada vida útil.

BIBLIOGRAFÍA

1. Berenz Z. Utilización del Ensilado de Residuos de Pescado en Pollos. Capítulo 2. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú, Callao, Perú. On line. <http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/APH134/cap2.htm>. 1990.
2. Guevara Y, Bello R. Evaluación del ensilado de pescado elaborado por vía microbiológica como suplemento proteico en dieta de pollos de engorde. FAO Informe de Pesca #441:107-114. 1989.
3. Balsinde Ruano M, Fraga Castro I, Galindo Lopez J. Inclusión del ensilado de pescado: Alternativa en la elaboración de un alimento extruido para el camarón de cultivo. Rev Panorama Acuícola. On line. www.panoramaacuicola.com. 2004.
4. Oetterer M, Espíndola Filón, Morales-Ulloa D, Ferraz de Arruda L, Borghesi R. Bioconversão de resíduos do pescado para obtenção de subprodutos. Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição. www.gep.cttmar.univali.br/download/pdf/spp_iwarp/oetterer_marilia_ensilagem.pdf. 1994.
5. Mattos Y, Carcelén F, Arvaizo T. Uso de ensilado biológico de pescado en la alimentación de cuyes mejorados. Rev Inv Vet Peru. 2003; 14 (2): 89-96.
6. Bertullo, E. Desarrollo del ensilado de pescado en América Latina 2da. Consulta de Expertos sobre Tec. Pesq. en América Latina FII819/RLAC/2, pág 24-45. 1989.
7. Bello R. Experiencias con Ensilado de Pescado en Venezuela. Capítulo 1: Ensilados químicos. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Universidad Central de Venezuela Caracas, Venezuela. On line. <http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/APH134/cap1.htm>
8. Rodríguez T, Montilla J, Bello R. Ensilado de pescado a partir de la fauna de acompañamiento del camarón. I Elaboración y evaluación biológica. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 40(3);426-438. 1990a.
9. Rodríguez T, Montilla J, Bello R. Ensilado de pescado a partir de la fauna de acompañamiento del camarón. II. Prueba de comportamiento en pollos de engorde. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 1990b; 40 (4): 548-559.
10. FDA. Food & Drug Administration (2001) Center for Food Safety & Applied Nutrition. Bacteriological Analytical Manual *On-line*. Authors: Larry J. Maturin and James T. Peeler. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>. 2001.

PHYSIOLOGICAL VARIATIONS OF SERUM ELECTROLYTES (Na, K, Ca, P, Mg, Cu) IN FARM-HOUSED *Caiman latirostris* AND *Caiman yacare* (Crocodylia: Alligatoridae)

JA Coppo, NB Mussart, NN Barboza, SA Fioranelli, GA Koza, WS Prado

Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste

ABSTRACT: The purpose of the study was to establish the reference interval for serum electrolytes from captive northeastern Argentine caimans, as well as to detect physiological variations related to species, sex, age, feeding and year season. Samples from 223 healthy subadults, both sexes specimens of *Caiman latirostris* (n=109) and *Caiman yacare* (n=114), were obtained. Serum values of sodium (149.1 ± 5.8 meq/l) and potassium (4.62 ± 0.7 meq/l) were determined by flame photometry. Calcium (9.07 ± 0.8 mg/dl), inorganic phosphorus (4.28 ± 0.8 mg/dl), and magnesium (2.62 ± 0.31 mg/dl) were measured by spectrophotometry. Copper concentration (98.9 ± 16.2 µg/dl) was determined by atomic absorption spectrophotometry. Magnesium levels were significantly higher in *C. latirostris* than in *C. yacare*, and also they were higher in males than in females ($p < 0.05$). Potassium was lower in *C. latirostris*. Growth produced significant decrease of calcium and inorganic phosphorus. All serum electrolytes registered lowest values in winter. Handling and feeding systems applied on farmed reptiles caused calcium, inorganic phosphorus, sodium, magnesium, and copper values higher than those registered in zoo specimens. Obtained data are applicable for caimans nutritional control, as well as for diagnosis and illness prevention.

Key words: *Caiman latirostris*, *Caiman yacare*, serum electrolytes, physiological variations

VARIACIONES FISIOLÓGICAS DE ELECTROLITOS SÉRICOS (Na, K, Ca, P, Mg, Cu) EN *Caiman latirostris* Y *Caiman yacare* (Crocodylia: Alligatoridae) ALOJADOS EN CRIADEROS

RESUMEN: El propósito del estudio fue establecer el intervalo de referencia para el ionograma sérico de caimanes autóctonos del noreste argentino mantenidos en cautiverio, así como detectar variaciones fisiológicas atribuibles a especie, sexo, edad, alimentación y estación del año. Se emplearon 223 ejemplares sanos, sub-adultos de ambos sexos, de las especies *Caiman latirostris* (n=109) y *Caiman yacare* (n=114). Mediante fotometría de llama se determinaron las concentraciones séricas de sodio ($149,1 \pm 5,8$ meq/l) y potasio ($4,62 \pm 0,7$ meq/l). Por espectrofotometría se obtuvieron los valores de calcio ($9,07 \pm 0,8$ mg/dl), fósforo inorgánico ($4,28 \pm 0,8$ mg/dl) y magnesio ($2,62 \pm 0,31$ mg/dl). El cobre ($98,9 \pm 16,2$ µg/dl) fue determinado por espectrofotometría de absorción atómica. La concentración de magnesio fue significativamente más alta en *C. latirostris* que en *C. yacare* y mayor en machos que en hembras ($p < 0,05$). El potasio fue más bajo en *C. latirostris*. El crecimiento produjo disminuciones significativas de calcio y fósforo inorgánico. Todos los electrolitos registraron sus niveles más bajos en invierno. Los sistemas de manejo y alimentación aplicados en un criadero produjeron valores de calcio, fósforo inorgánico, sodio, magnesio y cobre superiores a los registrados en un zoológico. Los datos obtenidos son aplicables al control nutricional, así como al diagnóstico y prevención de las enfermedades de estos reptiles.

Palabras claves: *Caiman latirostris*, *Caiman yacare*, electrolitos séricos, variaciones fisiológicas

Fecha de recepción: 21/02/06

Fecha de aprobación: 05/06/06

Dirección para correspondencia: José Antonio Coppo, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina. Tel./fax 03783-425753.

E-mail: jcoppo@vet.unne.edu.ar

INTRODUCTION

Argentine caiman population was diminishing until the decade of 1980, when severe controls against stealthy hunt were imposed. Nowadays, these measures and the introduction of rearing programs as *ranching* system, allowed an increase of its populational density (1).

The *ranching* system consists on the gathering of eggs from wild nests, and an ulterior captive rearing, with restitution of juvenile caimans to the same environment, in a similar number to the proportion of specimens that would have survived under natural conditions, in safeguard of the ecological balance (2). Caimans constitute an important income source for the regional economies, through the export of leather and meat. This production generates currencies nearby to 8 million dollars per year in Argentina (3).

Caiman latirostris and *Caiman yacare* are autochthonous species that inhabit fresh water of our country. The age determination of these reptiles is impossible if date of birth is ignored (4). Therefore, caimans are divided in four important biological categories, according to their total longitude: I (0.23-0.40 m: younger than one year), II (0.41-1.30 m: subadults), III (1.31-1.70 m: adult reproducers, males and females), and IV (> 1.70 m: mature males) (1). Adults caimans are unselective carnivores that can consume either live animals or carrion; in hatcheries they are maintained on balanced food with mineral supplement (2). Environmental temperature is important in feeding behavior and the digestive process. Most crocodilians cease feeding when the temperature goes below 25 °C. The optimal feeding temperature is considered between 25 and 35 °C (5).

Knowledge of serum electrolyte concentrations and their physiological variations are incomplete and controversial in autochthonous caimans. Electrolytes are responsible of the internal environment osmolarity, and their imbalances originate serious illnesses (6). All crocodilians have salt-excretory lingual glands, even those that are fresh water inhabitants, such *C. latirostris* as *C. yacare*. *Alligatoridae* members' lingual glands are much simpler in structure and haven't much ability to concentrate or secrete NaCl compared with other families (7). Periodic water submergence is necessary for all crocodilians in order to counteract water loss. Water intakes consists of incidental drinking and drinking when feeding; water is also absorbed through the skin. Juvenile crocodilians may lose up to 20% of liveweight per day through dehydration. Daily movement between land and water is necessary to maintain their correct osmoregulation (5).

Loss of sodium in fresh water crocodiles is fairly low, and the main sodium route loss is through the skin. Evaporative water loss oc-

curs from the respiratory tract, the mouth, and the skin. Kidneys are the primary route for the excretion of waste nitrogenous but not for NaCl excretion; kidneys are not able to regulate water and salt reabsorption (5). Alligators and caimans are less tolerant to saltwater but they can survive for a considerable period of time in a saltwater environment. This is probably due to their efficient regulation of water loss and sodium absorption. Hatching and juvenile crocodiles have a greater rate of water loss than adult crocodiles, and osmoregulation via behavior and movements between a dry and wet environment is especially important (5).

When Nile crocodiles reared in fresh water are exposed acutely to saltwater, suffer marked dehydration, lethargy, stop eating and loss mass. Cloacal urine osmolality did not increase with increasing salinity. There was a trend of decreasing cloacal urine sodium and chloride and increasing cloacal urine potassium with increased salinity, indicating that urine was not an important route for sodium and chloride excretion (8). *Crocodylus niloticus* held in hypertonic media showed a body weight loss and raised plasma and urinary sodium, potassium, chloride, and osmotic concentration. Within few hours after returning to fresh water, rapid imbibition had greatly restored body weight and produced significant plasma dilution. The compensatory drinking behavior displayed by crocodiles may thus involve the renin-angiotensin system (9).

Mineral nutrition deficiencies are frequent in farmed *C. latirostris* and *C. yacare* (2, 4, 10). Data on caiman serum electrolyte concentrations could be useful to optimize the diagnosis of their sanitary, metabolic and nutritional dysfunctions (11). It could also cooperate with the search of real nutritional requirement of these reptiles in captivity.

The purpose of this try was to determine serum electrolyte reference values from subadults *C. latirostris* and *C. yacare* specimens, as well as to obtain physiological variations related to species, sex, liveweight, dimensions, feeding and year season. The study is part of a larger project that intends to improve their rearing system.

MATERIALS AND METHODS

Experimental subjects

During 2 years, 223 subadults caimans (1), 50% of each sex, clinically healthy, from *C. latirostris* (n=109) and *C. yacare* (n=114) species, were studied. Some of them (n=29) were maintained at the Corrientes City's Zoo, in small ponds, without roof, with running water, which was constantly renovated; they were fed on chicken viscera and fish. Remaining animals (n=194) were housed at the «El Cachapé» farm (Chaco, northeastern Argentina), in roofed tanks with underground water,

which was renewed daily and stayed at 26.9 ± 3.5 °C (heated by gas), fed with meat flour supplemented with vitamins and minerals; sporadically they received bovine viscera. To evaluate growth, reptiles were divided in 3 development stages, considering liveweight and corporal length.

Taking of samples

Hematic and morphometric studies were performed 4 times a year, in each season, during morning hours (8-9 a.m), after a 12-hours fast. Liveweight was obtained using a hanging roman portable scales and corporal dimensions were evaluated with a metallic tape measure. Blood sampling was carried out through the postoccipital venous sinus puncture, while reptile was manually held and its jaw remained tied. Blood was centrifuged to obtain serum, which was maintained cooled at 5 °C until its analysis, which was made before 3 hours of extraction.

Laboratory techniques

Sodium and potassium were evaluated using Biopur reagents, in a Metrolab 305-D flame photometer (586 and 768 nm respectively). Serum copper was determined by atomic absorption spectrophotometry, in apparatus GBC932 Plus (324.7 nm). Remainder electrolytes were measured in a Labora Mannheim 4010 UV-visible spectrophotometer, using Wiener Lab reagents, through regular laboratory methods: calcium (cresolphthalein complexone, 570 nm), inorganic phosphorus (phosphomolybdate, 620 nm), and magnesium (xylylidyl blue, 510 nm). All biochemical determinations were checked by an intra-laboratory quality control, using comparative electrolyte patterns (Standatrol).

Statistical analysis

Distributive normality was verified by Wilk-Shapiro test (WS). Parametric statistics included measures from central tendency (arithmetic mean, \bar{x}) and dispersion (standard deviation, SD). Fiduciary probability was evaluated by confidence intervals (CI±95%). Homogeneity of the variance was verified by Bartlett test. Analysis of variance

(ANOVA) was made by one way linear model. Mean comparisons were carried out by Tukey test. Coefficient of linear association was evaluated by correlation (Pearson test). Calculations were made with the aid of a statistical software (*Statistix* 1996). For all inferences a 5% significance was specified, below which the equality null hypothesis was rejected.

RESULTS

Descriptive statistics obtained in all studied caimans are detailed in Table 1. Values approximately normal distributed (WS), allowed the use of parametric statistics. Data dispersion (SD) did not exceed the limits recommended by parametric statistics. Confidence intervals (CI) were adjusted around arithmetic means (\bar{x}), but individual ranges were wide.

Electrolyte values obtained on each studied species are shown in Table 2. Potassium serum levels were significantly higher in *C. yacare*, and magnesium serum concentrations were significantly higher in *C. latirostris* ($p < 0.05$).

Physiological variations related to sex and age (established groups according to the increase of liveweight and total length) are shown in Table 3. Serum magnesium values were significantly higher in males than in females. Calcium and inorganic phosphorus decreased significantly according to age increase (liveweight and length increases).

Pearson test revealed high linear association degree ($p < 0.05$) between liveweight and variables as total longitude ($r = 0.90$), muzzle tail longitude ($r = 0.83$), head longitude ($r = 0.79$), head wide ($r = 0.86$), and thoracic perimeter ($r = 0.88$). When considering growth stages, liveweight correlated to serum concentrations of calcium ($r = 0.88$), inorganic phosphorus ($r = 0.92$) and sodium ($r = 0.84$). Total length increment also correlated to the decrease of such electrolytes.

Variations of serum electrolytes during year seasons (temperature) and place of origin (feeding and handling systems) are shown in Table 4. Sodium, potassium, calcium, inorganic phosphorus, magnesium and copper concentrations were

Table 1. Values obtained in total studied population ($n = 223$).

Tabla 1. Valores obtenidos en la población total estudiada ($n = 223$).

Parameter	$\bar{x} \pm SD$	WS	CI±95%	range
Na (meq/l)	149.1 ± 5.8	0.941	148.2 149.9	134 159
K (meq/l)	4.62 ± 0.7	0.948	4.53 4.72	3.3 5.9
Ca (mg/dl)	9.07 ± 0.8	0.952	8.95 9.19	7.80 11.22
P (mg/dl)	4.28 ± 0.8	0.949	4.13 4.42	2.42 6.90
Mg (mg/dl)	2.62 ± 0.31	0.993	2.57 2.66	1.90 3.36
Cu (µg/dl)	98.9 ± 16.2	0.956	91.5 106.3	31 168

x: arithmetic mean, SD: standard deviation, WS: Wilk-Shapiro distributive normality test (critical value: 0.947, $\alpha = 0.05$), CI±95%: confidence interval.

Table 2. Values obtained on each species.
Tabla 2. Valores obtenidos en cada especie.

Parameter	<i>C. latirostris</i> (n = 109)		<i>C. yacare</i> (n = 114)	
	x ± SD	CI±95%	x ± SD	CI±95%
Na (meq/l)	149.4 ± 5.6	148.3 150.6	148.7 ± 6.1	147.5 149.9
K (meq/l)	4.75 ± 0.6 ^a	4.61 4.88	4.91 ± 0.7 ^b	4.36 4.64
Ca (mg/dl)	9.15 ± 0.9	8.98 9.33	8.98 ± 0.8	8.81 9.17
P (mg/dl)	4.22 ± 0.8	4.01 4.43	4.32 ± 0.9	4.12 4.53
Mg (mg/dl)	2.71 ± 0.31 ^a	2.66 2.77	2.52 ± 0.28 ^b	2.45 2.58
Cu (µg/dl)	95.1 ± 14.2	84.2 103.9	103.5 ± 15.9	93.1 115.7

x: arithmetic mean, SD: standard deviation, CI±95%: confidence interval. In each line, different letters indicate significant differences (Tukey test, p < 0.05).

Table 3. Variations according to sex, liveweight, and total length in both species (x).
Tabla 3. Variaciones según sexo, peso vivo y longitud total en ambas especies (x)

Parameter	sex		liveweight (kg)			total length (cm)		
	male	female	< 3.5	3.6-5.0	> 5	< 99	100-110	> 110
Na (meq/l)	148.7	149.9	150.0	149.3	148.2	150.1	149.5	146.7
K (meq/l)	4.54	4.68	4.64	4.56	4.67	4.66	4.59	4.62
Ca (mg/dl)	9.09	8.92	9.10 ^a	9.08 ^a	9.01 ^b	9.12 ^a	9.06 ^b	9.02 ^b
P (mg/dl)	4.29	4.26	4.42 ^a	4.37 ^a	4.09 ^b	4.50 ^a	4.38 ^a	4.01 ^b
Mg (mg/dl)	2.71 ^a	2.52 ^b	2.64	2.59	2.65	2.63	2.60	2.61
Cu (µg/dl)	102.0	97.8	98.2	99.3	98.5	99.8	101.5	95.6

x: arithmetic mean. In each line, different letters indicate significant differences (Tukey test, p < 0.05).

Table 4. Variations according to year season and feeding system in both species (x).
Tabla 4. Variaciones según estación del año y sistema de alimentación en ambas especies (x)

Parameter	year season				feeding	
	spring	summer	autumn	winter	farm	zoo
Na (meq/l)	149.7 ^a	151.4 ^a	146.8 ^b	146.2 ^b	149.8 ^a	145.4 ^b
K (meq/l)	5.02 ^a	4.85 ^a	4.38 ^b	4.04 ^b	4.59	4.65
Ca (mg/dl)	9.37 ^a	9.43 ^a	8.76 ^b	8.62 ^b	9.09	8.98
P (mg/dl)	4.59 ^a	4.70 ^a	4.22 ^b	3.61 ^c	4.31	4.25
Mg (mg/dl)	2.62 ^a	2.68 ^a	2.70 ^a	2.55 ^b	2.77 ^a	2.41 ^b
Cu (µg/dl)	110.2 ^a	125.1 ^a	103.4 ^a	66.5 ^b	113.7 ^a	88.5 ^b

x: arithmetic mean. In each line, different letters indicate significant differences (Tukey test, p < 0.05).

significantly lower in winter than in summer. No significant differences were registered between summer and spring (warm and mild temperatures respectively). Sodium, magnesium and copper serum levels were significantly higher in reptiles reared by *ranching* system than in those housed at the zoo.

DISCUSSION

In crocodiles, the lack of fast causes an increase of certain plasma components (12). Eventual variations due to postprandial effect and circadian rhythm (6) were excluded from the experimental design, because samples were taken during fast, in uniform morning hours. Wide individual ranges verified in this study should be attributed to reptilian physiological particularities, because its blood parameters

fluctuate considerably due to feeding system, habitat, climate and sex (11). Blood values from other aquatic animals, such as amphibians, also register greater oscillations due to their scarce regulation mechanisms, and to a higher tolerance to hemodilution and hemoconcentration (6).

Sodium serum concentration mean value obtained in the present study for *C. latirostris* and *C. yacare*, was similar to the natremia reported for fresh water specimens as *C. niloticus*: 154±1 meq/l (13) and *Alligator mississippiensis*: 148±5 meq/l (14) and 141 meq/l (15), as well as for saltwater specimens as *C. porosus*: 143-161 meq/l (12) and *Crocodylus acutus*: 149 meq/l (15). Since sodium is the main responsible of the internal environment osmotic pressure (6), this fact ratifies that crocodiles are able to regulate efficiently their osmolarity, so much in fresh water

as in saltwater external environments.

Potassium serum levels obtained here matched to those published for fresh water specimens as *C. niloticus*: 3.8 ± 0.5 meq/l (13) and *A. mississippiensis*: 4.1 ± 0.7 meq/l (14) and 3.8 meq/l (15). On the other hand, kalemias from saltwater specimens would be higher: 7.9 meq/l in *C. acutus* (15) and 3.8 - 7.2 meq/l in *C. porosus* (12).

Calcemia from caimans studied here was slightly lower than that reported in fresh water specimens as *C. niloticus*: 11.88 mg/dl (13) and *A. mississippiensis*: 11.3 ± 0.5 mg/dl (14) and 10.4 mg/dl (10, 16). However, it was considerably higher than those obtained in saltwater specimens as *C. acutus*: 13.6 mg/dl (13) and *C. porosus*: 9.64 - 13.8 mg/dl (12). Serum calcium would be also high on land reptiles as *Iguana iguana*: 9.0 - 25.1 mg/dl, *Boa constrictor*: 10 - 22 mg/dl, and *Testudo radiata*: 10.8 - 14.4 mg/dl (15).

The inorganic phosphorus value registered here in *C. latirostris* and *C. yacare* was lower than those obtained in *A. mississippiensis*: 8.2 ± 2.2 mg/dl (14), *C. niloticus*: 9.3 mg/dl (16) and *C. porosus*: 3.7 - 8.9 mg/dl (12). Perhaps these low values should be related to nutritional reasons, keeping in mind that in most vertebrates, the quantity of serum phosphates is directly proportional to dietary phosphorus intake (6).

On the contrary, serum magnesium concentrations obtained in this study were approximately similar to those published for *C. niloticus*: 2.18 mg/dl (13), *C. porosus*: 1.94 - 3.40 mg/dl (12), *A. mississippiensis*: 3.64 mg/dl (10) and *C. acutus*: 4.65 mg/dl (13). Data on copper serum concentrations from reptiles, were not found.

Data on *C. latirostris* obtained here matched to those reported on 12 juvenile animals from the same species (11) in sodium serum concentration (150.8 ± 2.9 meq/l), but considerably differ from levels of potassium (6.12 ± 1.03 meq/l), calcium (14.3 ± 4.5 mg/dl) and inorganic phosphorus (9.58 ± 1.99 mg/dl). Electrolyte serum values published for *C. latirostris* ($n = 65$) in other investigation (4) are similar to those found in the current study for potassium (4.6 ± 0.16 meq/l), calcium (8.9 ± 0.6 mg/dl) and inorganic phosphorus (5.64 ± 0.46 mg/dl), although the sodium level was lower (144 ± 1 meq/l). Data about calcium and inorganic phosphorus obtained in another assay (17) on 50 *C. latirostris* juvenile and adults specimens, are not very different (10.12 ± 1.52 and 5.4 ± 2.0 mg/dl respectively) to those registered here.

Some electrolyte values obtained here on *C. yacare* are similar to those published on the same species (11) by other investigators (sodium: 148.2 ± 3.1 meq/l, potassium: 4.58 ± 1.22 meq/l and inorganic phosphorus: 5.16 ± 0.93 mg/dl). On the contrary, ion levels reported on 33 *C. yacare*

juvenile specimens (4) were surprisingly lower (sodium: 129.3 ± 2.9 meq/l, potassium: 3.51 ± 0.23 meq/l and calcium: 5.86 ± 0.84 mg/dl). In this try, potassium values were significantly higher in *C. yacare* than in *C. latirostris*; results obtained in another study were in the other way around (4). Higher values of inorganic phosphorus in *C. latirostris* than in *C. yacare* (4, 11), were not corroborated. Reference data on magnesium and copper serum concentrations were not found from autochthonous caimans.

Differences between sexes were scarce in current study. *Crocodylus palustris* subadult specimens did not register significant differences related to sex either, although calcium and potassium serum values were higher in juvenile males than in juvenile females (18). During late vitellogenesis of adult female *A. mississippiensis*, elevated plasma vitellogenin and estradiol-17beta were not correlated with plasma phosphorus but were correlated with plasma calcium concentration (19).

The increase of age in studied caimans (increases of liveweight and total length) correlated to calcium and inorganic phosphorus serum concentration decrease. This is a common fact in growing vertebrates and it is related to endocrine mechanisms that cause deposition of calcium phosphate (hydroxyapatite) in bones (6).

Phosphorus and calcium are also necessary for development of crocodile dermal bones (osteoderms). Calcium concentration in osteoderms from *Crocodylus johnstoni*, was inversely related to the solubility of phosphate (but not to those of sodium nor potassium), and varied according to age (size), but not sex nor reproductive status (20).

Maybe the lowest winter values registered in all studied electrolytes should be related to the ceasing of mineral intake caused by the interruption of feeding during cold station (5). *A. mississippiensis* frequently suffers malnutrition due to corporal reserves depletion happened during the winter; the feeding is resumed in spring (14). Temperature acute decreases increased blood pH, but had no significant effect on plasma sodium, chloride and bicarbonate concentration, and only had minor effects on plasma potassium concentration from *A. mississippiensis* (21).

Calcium, inorganic phosphorus, sodium, magnesium and copper serum concentrations were lower (significantly for last three electrolytes) in caimans fed on diet supplied at the zoo, than in those fed on diet given at the hatchery. This fact perhaps reflects mineral deficiencies in the diet composition, considering that -in mammals- mineral serum levels, especially inorganic phosphorus, magnesium and copper, are nutritional indicators that vary according to diet mineral amount (6). Copper hepatic and renal

concentrations from *C. niloticus* are similar to those reported in other vertebrates and acquire relevance for the evaluation of water degree contamination (22).

Preys captured by crocodiles in wild life provide appropriate minerals and trace-elements levels, but the food consumed during captivity not always have appropriate electrolytical proportions (10). Nowadays the mean problem of northeastern Argentine caiman *ranching* system is the feeding improvement; dietary calcium and phosphorus deficiencies cause metabolic and endocrine dysfunctions in crocodiles (4). Imbalance of dietary calcium / phosphorus rate generates severe osseous anomalies in these reptiles (10). Juvenile caimans can suffer nutritional secondary hyperparathyroidism due to the lack dietary calcium (2).

Electrolytes carry out indispensable homeostatic functions, such as bones and teeth formation, polarization of membranes, integration of enzymatic systems, energy storage, acid-base balance, breathing, and clotting (6). Divalent metal ions such as calcium and magnesium, but not copper, are necessary to activate the serum complement cascade in *A. mississippiensis* (23). The yolk of *A. mississippiensis* egg is the primary source of calcium, phosphorus and magnesium for the embryo development; these elements are depleted rapidly from the yolk once the embryo enters the growing phase (24).

An episode of mineral deficiency was registered when a food change was made on *C. yacare*. The diet of replacement of a bovine meat supplemented with minerals and vitamins, into another diet made by meat and blood flour (without supplement), caused marked decrease of calcium and inorganic phosphorus plasma concentrations, although it also generated plasma albumin increase (4). Calcium fall reached surprisingly low levels (initial: 11.78 mg/dl, final: 2.48 mg/dl). Nevertheless, this information should contain some error, because such hypocalcemia is incompatible with life; calcemias below 7 mg/dl cause tetany on muscular cells, specially when plasma albumin are high (6).

Biochemical values can be useful to evaluate caiman physiological state and to detect its illnesses on an early stage (11), but should have been correctly determined in the laboratory and they should be compared with adequate reference intervals (6). Several authors early quoted do not describe the techniques used in their works. Other investigators used dry chemistry methods, such as reactive strips. According to each case, heparinized plasma or serum were used. In certain studies, reptiles were not divided according to sex, age, or year season. Blood extraction technique could be another cause of values variation, but they are not always specified in consulted

references (15).

Standardization of clinical pathology techniques is important to appreciate the laboratory tests as effective tools on caiman breeding, mainly because ideal conditions for intensive crocodile rearing have not yet been established. Consequently, mortality is often directly linked to handling and nutritional failures (25).

In conclusion, serum electrolyte reference values from subadults *C. latirostris* and *C. yacare* captive specimens, as well as significant physiological variations related to species, sex, age (liveweight, dimensions), environmental temperature (year season), and feeding system, are established. Obtained data can be applied to caiman rearing improve in Argentine northeastern.

ACKNOWLEDGMENTS

To Dr. L.M. Ortiz, for her important technical collaboration. To Prof. M.S. Troia and Prof. E. Quirch for the revision of English grammar. The financial support of CIDET-UNAM (Grant 16Q/267), and Wiener Lab (Rosario, Argentina) is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Waller T, Micucci PA. Relevamiento de la distribución, hábitat y abundancia de los crocodilos de la Provincia de Corrientes, Argentina. Memorias de la 1ra. Reunión Regional del Grupo de Especialistas en Cocodrilos, Santa Marta (Colombia). 1993; p. 341-385.
2. Prado WS, Gómez O, Balla P. Crianza en cautiverio y reintroducción de individuos (*C. latirostris* y *C. yacare*). Boletín Técnico de la Fundación Vida Silvestre Argentina. 2001; 55: 26-38.
3. Larriera A. Programa de ranching experimental en Argentina. Anales del III Congreso Internacional sobre Manejo de Fauna Silvestre, Santa Cruz (Bolivia). 1997; p. 166.
4. Ferreyra H, Uhart M. Evaluación y evolución del estado sanitario de *Caiman latirostris* y *Caiman yacare* en el Refugio El Cachapé. Boletín Técnico de la Fundación Vida Silvestre Argentina. 2001; 55 (Anexo III): 1-15.
5. Lane TJ. Crocodilians. In: Reptile Medicine and Surgery (Mader DR Ed.), Ed Saunders, Philadelphia (USA). 1996; p. 78-98.
6. Coppo JA. Fisiología Comparada del Medio Interno, Ed Dunken, Buenos Aires (Argentina). 2001; p. 212-216.
7. Taplin L, Grigg GC. Salt glands in the tongue of the estuarine crocodile *Crocodylus porosus*. Science. 1981; 212: 1045-1048.
8. Leslie AJ, Spotila JR. Osmoregulation of the Nile crocodile, *Crocodylus niloticus*, in Lake St. Lucia, Kwazulu/Natal, South Africa. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2000; 126: 351-365.
9. Balment RJ, Loveridge JP. Endocrines and osmoregulatory mechanisms in the Nile crocodile, *Crocodylus niloticus*. Gen Comp Endocrinol. 1989; 73: 361-367.

10. Frye FL. Reptile Clinician's Handbook, Ed Krieger, Florida (USA). 1994; p. 214.
11. Uhart M, Prado W, Beldoménico P, Rossetti C, Ferreyra Armas MC, Martínez A, Bardón JC, Avilés G, Karesh W. Estudios sanitarios comparativos de yacarés (*Caiman latirostris* y *Caiman yacare*) silvestres y cautivos. Boletín Técnico de la Fundación Vida Silvestre Argentina. 2001; 55: 39-50.
12. Millan JM, Janmaat A, Richardson KC, Chambers LK, Formiatti KR. Reference ranges for biochemical and haematological values in farmed saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) yearlings. Aust Vet J. 1997; 75: 814-817.
13. Watson PA. Effects of blasting on Nile crocodiles, *Crocodylus niloticus*. Proceedings of the 10th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group IUCN, Gainesville, Florida (USA). 1990: p. 240-252.
14. Schoeb TR, Heaton-Jones TG, Clemmons RM, Carbonneau DA, Woodward AR, Shelton D, Poppenga RH. Clinical and necropsy findings associated with increased mortality among American alligators of Lake Griffin, Florida. J Wildl Dis. 2002; 38: 320-337.
15. Stein G. Hematologic and blood chemistry values in reptiles. In: Reptile Medicine and Surgery (Mader DR Ed.), Ed Saunders, Philadelphia (USA). 1996; p. 479-483.
16. Foggin CM. Diseases and disease control on crocodile farms in Zimbabwe. In: Wildlife Management: Crocodiles and Alligators (Webb GJ, Manolis SC, Whitehead PJ, Ed.), Ed Surrey Beatty, Chipping Norton (USA). 1987; p. 351-362.
17. Troiano JC, Althaus R. Hallazgos hematológicos en *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae) en condiciones de cautiverio. Memorias del IV Workshop sobre Conservación y Manejo del Yacaré Overo, Santo Tomé (Santa Fe, Argentina). 1994; p. 12-24.
18. Stacy BA, Whitaker N. Hematology and blood biochemistry of captive mugger crocodiles (*Crocodylus palustris*). J Zoo Wildl Med. 2000; 31: 339-347.
19. Guillette LJ, Woodward AR, Crain DA, Masson GR, Palmer BD, Cox MC, You-Xiang Q, Orlando EF. The reproductive cycle of the female American alligator (*Alligator mississippiensis*). Gen Comp Endocrinol. 1997; 108: 87-101.
20. Jeffree RA, Markich SJ, Tucker AD. Patterns of metal accumulation in osteoderms of the Australian freshwater crocodile, *Crocodylus johnstoni*. Sci Total Environ. 2005; 336: 71-80.
21. Douse MA, Mitchell GS. Time course of temperature effects on arterial acid-base status in *Alligator mississippiensis*. Respir Physiol. 1991; 83: 87-102.
22. Almlí B, Mwase M, Sivertsen T, Musonda MM, Flaoyen A. Hepatic and renal concentrations of 10 trace elements in crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the Kafue and Luangwa rivers in Zambia. Sci Total Environ. 2005; 20: 75-82.
23. Merchant ME, Verret B, Elsey RM. Role of divalent metal ions in serum complement activity of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2005; 141: 289-293.
24. Packard MJ, Packard GC. Mobilization of calcium, phosphorus, and magnesium by embryonic alligators (*Alligator mississippiensis*). Am J Physiol. 1989; 257: 1541-1547.
25. Huchzermeyer FW. Diseases of farmed crocodiles and ostriches. Rev Sci Tech. 2002; 21: 265-276.

ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA PRODUCIDA POR *Clostridium piliforme* EN RATONES N:NIH(S)-nu TRANSPLANTADOS CON LA LÍNEA TUMORAL A 549

**M Ayala, S Milocco, G Principi, J Laborde, M Carriquiriborde,
P Cagliada, C Carbone**

Cátedra de Animales de Laboratorio. Facultad de Ciencias Veterinarias.
Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: *Clostridium piliforme*, produce una enfermedad fatal en el ratón, que se manifiesta como hepatitis con compromiso intestinal e interfiere en los resultados de las pruebas. El objetivo de este trabajo fue estudiar la interferencia que causa *Clostridium piliforme* en ratones N:NIH(S)-nu (nude) transplantados con la línea tumoral A 549. Se utilizaron 100 animales nude divididos en 4 grupos de 25 ratones cada uno: grupo 1, con el tumor e infectados con *Clostridium piliforme*; grupo 3, sin tumor e infectados con *Clostridium piliforme*; grupos control 2 y 4, con y sin tumores respectivamente, no infectados con el microorganismo. En el grupo 1; 19 manifestaron signos clínicos a los 4 días postinoculación (p.i.) observándose lesiones en el hígado e intestino; en el grupo 3; 20 desarrollaron signos clínicos a los 4 días p.i., 5 murieron y el resto se sacrificó hallándose las mismas lesiones que en el grupo 1. Los grupos 2 y 4 no presentaron lesiones. El 78% de los animales inoculados con *Clostridium piliforme* manifestaron signos clínicos a los 4 días p.i. No hubo diferencias entre los animales con o sin tumor. Se concluyó que *Clostridium piliforme* interfiere provocando la muerte de los animales con o sin tumor.

PALABRAS CLAVE: *Clostridium piliforme*, ratones, interferencia, tumores.

STUDY OF THE INTERFERENCE PRODUCED BY *Clostridium piliforme* IN NIH(S)nu IN MICE TRANSPLANTED WITH THE TUMOR LINE A549

ABSTRACT: *Clostridium piliforme* produces a fatal infection in mice, as hepatitis involving the intestine and interferes in experimental results. The aim of this work was to evaluate the interference caused by *Clostridium piliforme* in N:NIH(S)-nu mice (nude) transplanted with the tumor line A 549. One hundred nude mice were divided into four groups of 25 animals each one: group 1, animals with tumor and experimentally infected with *Clostridium piliforme*; group 3 animals with no tumor and inoculated with the microorganism; and control groups 2 and 4 with and without tumor respectively, not infected with the microorganism. In group 1, nineteen mice showed clinical signs 4 days after inoculation, typical lesions in liver and intestine were observed. In group 3; 20 mice showed clinical signs 4 days after inoculation, 5 of them died, necropsy was performed on the rest of the animals, the same kind of lesions as in group 1 were found. In groups 2 and 4 no lesions were observed. 78% of the animals inoculated with *Clostridium piliforme* have shown clinical signs 4 days after inoculation. There were observed no differences in the animals with or without tumor transplantation. It was concluded that *Clostridium piliforme* interferes causing the death of the animals with or without tumor.

KEY WORDS: *Clostridium piliforme*, mice, interference, tumor.

Fecha de recepción: 09/12/05

Fecha de aprobación: 20/03/06

Dirección para correspondencia: Miguel Ayala, Cátedra de Animales de Laboratorio. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 118. C.P. 1900. La Plata. Te/fax: 0221-4211276.

E-mail: mayala@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Clostridium piliforme es el agente etiológico de la enfermedad de Tyzzer. Es un microorganismo gram negativo, con forma de bastón, de 8 a 10 µm de largo por 0,5 µm de ancho, con tendencia al pleomorfismo; forma esporos terminales, es móvil y presenta flagelos peritricos. Es PAS positivo, se tiñe rápidamente con colorantes básicos de anilina y con la técnica de impregnación argéntica, que es la más adecuada para su demostración en cortes histológicos. No crece en medios para cultivos bacterianos, por lo que es un parásito intracelular obligado, se multiplica bien en el saco vitelino de huevos embrionados de pollo o en cultivos primarios de hepatocitos de embrión de pollo o de ratón.

Produce una enfermedad fatal en varias especies como rata, ratón, conejo, hámster, merión, caballo y perro, la cual se presenta como hepatitis con compromiso intestinal. La enfermedad clínica se manifiesta generalmente al destete y se caracteriza por diarrea y muerte de los individuos afectados. La forma subclínica es la más importante (1). Cuando se someten los animales a un estrés experimental, como por ejemplo cambios en el macro y microambiente o inmunodepresión con drogas o agentes físicos este agente adquiere patogenicidad interfiriendo con los resultados finales de las pruebas de diagnóstico, investigación y control de calidad. Se transmite por vía fecal-oral, por lo que el primer sitio de infección es el epitelio intestinal y desde allí se disemina por vía sanguínea a otros órganos como el corazón y el hígado, produciendo focos de necrosis en los mismos (2,3,4).

El objetivo de este trabajo fue estudiar la interferencia que produce el *Clostridium piliforme* en ratones de la cepa N:NIH(S)-*nu* transplantados con la línea tumoral de adenocarcinoma pulmonar humano A549.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales: se utilizaron 100 ratones hembras de la cepa N:NIH(S)-*nu*, libres de patógenos específicos (SPF) de 8 a 10 semanas de edad, proveniente de la colonia del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Los animales se mantuvieron bajo estrictas barreras sanitarias, a 22 °C ± 1 de temperatura y humedad del 50%, con aire filtrado (Filtros HEPA 99,9%) a razón de 15 renovaciones por hora, en cajas de acero inoxidable (n = 5), con lecho de viruta estéril. Se les proporcionó agua de bebida suplementada con vitaminas y alimento (Cooperación S.R.L.), autoclavados y *ad-libitum*, de acuerdo con las recomendaciones internacionales (5, 6).

Diseño experimental: los ratones se dividieron en 4 grupos: grupo 1: 25 animales con

desarrollo tumoral inoculados por vía intravenosa (iv) con un homogenato de hígado e intestino provenientes de ratones infectados con *C. piliforme*, grupo 2: 25 animales con desarrollo tumoral e inoculados por vía iv con un homogenato de hígado e intestino de ratones libres de *C. piliforme*; grupo 3: 25 animales inoculados por vía intravenosa (iv) con un homogenato de hígado e intestino provenientes de ratones infectados con *C. piliforme*, y grupo 4: 25 ratones como grupo control.

Inoculación experimental: Las células de la línea tumoral A549 se transplantaron por vía subcutánea a los ratones de los grupos 1 y 2 a las 4 semanas de edad, previamente anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg, IP) (7, 8, 9), realizando una incisión en la piel laxa del dorso con un trócar. Los animales de los grupos 1 y 3 se inocularon a las 6 semanas de edad por vía iv con un homogenato de hígado e intestino proveniente de ratones infectados con *C. piliforme* en una concentración de 10⁶ microorganismos en 0,1 ml de solución (6).

Técnica de Inmunofluorescencia (IF): para la identificación del *C. piliforme* se realizaron improntas de hígado e intestino de los animales en los cuales se observaron lesiones. Las improntas se fijaron con acetona, se enfrentaron con un suero control positivo anti-*Clostridium piliforme* (producido y validado en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP) durante 30 minutos a 37 °C, se lavaron con solución buffer fosfato (PBS), se cubrieron con un conjugado anti-ratón marcado con fluoresceína (Merck) y se incubaron a 37 °C durante una hora. Posteriormente se lavaron con PBS y se observaron en un microscopio de fluorescencia para confirmar la presencia del microorganismo (6, 10, 11).

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos. El 76 % de los ratones del grupo 1 y el 80% del grupo 3 presentaron signos clínicos de la enfermedad a los 4 días p.i. El 16% y el 25 % de los animales de los grupos 1 y 3 respectivamente murieron durante el periodo agudo de la enfermedad. En la necropsia se observó que presentaban focos de necrosis en el intestino y en el hígado. El 24% y el 25% de los ratones de los grupos 1 y 3 respectivamente no presentaron signos clínicos de la enfermedad. La prueba de IF resultó positiva en el 78% de los ratones inoculados con *C. piliforme*, observándose la morfología típica del agente causal de la enfermedad de Tyzzer.

Los ratones de los grupos control 2 y 4 no presentaron lesiones correspondientes a esta enfermedad.

Tabla 1: SMC: Animales que no presentaron manifestaciones clínicas de la enfermedad de Tyzzer, CMC: animales que presentaron signos clínicos y MFA: animales que murieron en la fase aguda de la enfermedad.

Table 1: SMC: Animals without clinical signs of Tyzzer's disease, CMC: Animals with clinical signs of Tyzzer's disease, and MFA: Animals which died during the acute period of the disease.

Grupos	SMC	CMC	MFA
1 Con tumor e inoculado con Cl. piliforme	6 (24%)	19 (76%)	4
2 Con tumor y sin inocular con Cl. piliforme	25 (100%)	0 (0%)	0
3 Sin tumor e inoculados con Cl. piliforme .	5 (20%)	20 (80%)	5
4 Sin tumor y sin inocular con Cl. piliforme.	25(100%)	0 (0%)	0

DISCUSIÓN

El 78% de los animales inoculados con *C. piliforme* manifestaron signos clínicos a los 3 ó 4 días p.i. por lo tanto las infecciones con este microorganismo se pueden considerar fatales en las colonias, no habiéndose observado diferencias en las respuestas entre los animales con o sin tumor. Se concluyó que *Clostridium piliforme* es un microorganismo que interfiere en las pruebas, produciendo una enfermedad aguda que desemboca en la mayoría de los casos en la muerte de los individuos, por lo cual en las investigaciones en las que se utiliza el ratón como reactivo biológico este agente debe estar ausente de la colonia durante toda la experiencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ayala MA, Suzuki E, Noguchi A, Nakayama K, Naiki H. Experimental sublethal infection with *Bacillus piliformis* (Tyzzer's disease) in mice. Proceeding Second Meeting on The Cooperative Research Project in The Area of Veterinary Sciences Between National University of La Plata and Japan International Cooperation Agency 1993; 223-226.
2. Fujiwara K. Tyzzer's disease. Japan Exp. Med. 1978; 48:467-480.
3. Tyzzer E. A fatal disease Japanese waltzing mouse caused by a spore bearing bacillus (*Bacillus piliformis* N. sp) J. Med Res. 1917; 37: 307-338.
4. Cagliada P, Ayala M, Carbone C, Nosetto E. Studies on the diagnosis of Tyzzer's disease in laboratory mice colonies. Laboratory Animals Ltd, United Kingdom. Proceedings of the International Joint Meeting. XXII ICLAS General Assembly & Conference VII FELASA Symposium. 2000; 38-40.
5. Derrell C. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Research Council (USA), 1996; p.21-55.
6. Ayala M, Carbone C, Cagliada M, Nosetto E. Aislamiento de *Clostridium piliforme* en colonias de ratones en Argentina. Analecta Veterinaria 1996; (2) 27-28.
7. Flecknell P. Anestesia de animales de laboratorio. Ed. Acribia. Zaragoza (España), 1998; p. 168-171.

8. Cagliada P, Ayala M, Milocco S, Principi G, Colussi A, Galosi C, Carbone C. Evaluación del Stock Nude NHI: nu/nu como modelo animal para el mantenimiento de la línea tumoral humana A549. Reunión Científica Internacional / Regional "Avances en el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio"; 2004 p. 132.

9. Kraus-Berthier L, Jan M, Guilbaud N, Naze M, Pierré A, Atassi G. Histology and Sensitivity to Anticancer Drugs of Two Human Non-Small Cell Lung Carcinomas Implanted in the Pleural Cavity of Nude Mice Experimental Therapeutics, Preclinical Pharmacology. Clinical Cancer Research. 2000; (6), 297-304.

10. Fujiwara K, Ganaway JR. *Bacillus piliformis*. Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals; National Institute of Health (USA); 1994 p. 117-120.

11. Ayala M, Milocco S, Cagliada P, Maschi F, Laborde J, Carriquiriborde M, Galosi CM, Carbone C. Estudio de la enfermedad de Tyzzer (*Clostridium piliforme*) en ratones de la cepa BALB/c NACKT infectados experimentalmente. Revista de Medicina Veterinaria. 2005; 86 (6): 238-239.

RINOSCOPIA EN CANINOS

AN Aprea¹, AL Giordano¹, HA Baschar², E Bonzo³, A Massone⁴

¹Servicio de Diagnóstico por Imágenes-Área Endoscopia, ²Servicio Central de Cirugía, ³Cátedra de Bioestadística, ⁴Instituto de Patología Prof. Epstein
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: Se presenta un informe de las rinoscopias en caninos realizadas durante el año 2004 en el Servicio de Diagnóstico por Imágenes – Área Endoscopia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. El 61% de los casos fue derivado al Servicio por presentar descarga nasal, en el 86% se hallaron masas, de las cuales el 60% eran TVT (Tumor Venéreo Transmisible). Del 40% de las restantes el 71% eran tumores malignos. Se presenta una breve revisión bibliográfica del tema.

Palabras Clave: rinoscopia- caninos

CANINE RHINOSCOPIES

ABSTRACT: The present paper reports on canine rhinoscopies performed by the Diagnostic Imaging Unit – Endoscopy Department (Faculty of Veterinary Science, La Plata National University). 61% of the cases submitted to the unit showed nasal discharge. In 86% they were masses of which 60% were Transmissible Venereal Tumors. Of the remaining 40%, 71% were malignant tumors. A brief literature review on the topic is introduced.

Key Words: rhinoscopy - canines

Fecha de recepción: 27/12/05

Fecha de aprobación: 27/06/06

Dirección para correspondencia: Adriana Aprea, CServicio de Diagnóstico por Imágenes-Área Endoscopia. C.C. 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: aaprea@fcv.unlp.edu.ar

Introducción

El diagnóstico de las enfermedades nasales es complicado debido a inaccesibilidad de la cavidad nasal y a que los signos clínicos no son específicos de cada enfermedad (1, 2). Los animales con enfermedades nasosinusales o de nasofaringe, presentan generalmente estornudos, estornudo inverso, epistaxis, dificultad respiratoria, deformación facial y/o descarga nasal (3). Es necesario el uso de exámenes complementarios para llegar al diagnóstico definitivo. La rinoscopia brinda acceso a la cavidad nasal para examinar mucosa, luz, presencia de cuerpos extraños, confirmar las modificaciones de la arquitectura de cornetes (a veces sospechada por estudios radiológicos), realizar biopsias y en algunos casos para procedimientos terapéuticos (3, 4). Esta práctica debe estar siempre acompañada por una correcta historia, examen clínico y un protocolo que incluye radiografías, cultivo para hongos y bacterias, histopatología (HP) y pruebas de alergia. La rinoscopia puede ser anterior o posterior. En la anterior se examina la cavidad nasal, ingresando por orificios nasales. Se evalúa cada meato nasal. La rinoscopia posterior se utiliza para explorar coanas y rinofaringe, para lo cual se introduce el endoscopio por cavidad oral. En el borde libre del paladar blando se retroflexiona el tubo de inserción, pudiendo observar hacia rostral las coanas (3, 4, 5, 6, 7). Estas técnicas se pueden realizar separadamente, pero rutinariamente se realizan las dos, permitiendo tener un examen completo tanto de cavidades, coanas y rinofaringe. El examen endoscópico se lleva a cabo bajo anestesia general. Durante la misma es posible ejecutar también lavados nasales y radiografías (6, 7, 8). El presente trabajo tiene por objetivo describir los signos clínicos que motivaron la realización del estudio endoscópico, los hallazgos anormales de la cavidad nasal y su correspondencia con hallazgos microscópicos.

Materiales y métodos

Se realizaron rinoscopias anterior y posterior a 31 pacientes caninos y felinos con signos clínicos de enfermedad nasal. Se utilizó un gastrofibroscopio Olympus Gif N30 de 5 mm de diámetro externo. Se realizó rutinariamente lavado nasal con toma de muestra para citología, bacteriología y micología. Durante el estudio endoscópico se realizó biopsia ante la presencia de masa accesible. Se analizó estadísticamente la casuística mediante medidas de resumen de datos cualitativos y cuantitativos. Se analizaron diferencias significativas ($p < 0,05$) mediante la prueba de comparación de proporciones (Epidat versión 3.0 OPS-Xunta de Galicia).

Resultados

Sobre un total de 31 casos, el 90% correspondieron a caninos, mientras que se registraron solamente 3 felinos. En este trabajo se analizará la casuística en 28 caninos. Los caninos de raza indefinida correspondieron a casi la mitad de la casuística (46%), seguidos por collie (11%) y viejo pastor (7%). No se observaron razas puras braquicéfalas pero el 31% de los de raza indefinida eran braquicéfalos. Más de la mitad de los pacientes (57%) se registraron en la franja etaria de 5 a 8 años, siendo las edades extremas registradas de 2 y 14 años.

Los signos clínicos más frecuentemente relatados por los dueños figuran en la tabla 1.

Tabla 1. Signos clínicos

Table 1. Clinical Signs

Signos clínicos
Descarga nasal: 61% (de éstas, el 35% también presentaba estornudos, tos o ruidos que alertaba al dueño)
Deformación frontal o nasal: 25%
Descarga nasal secreción bucal u ocular: 7%
Estornudos: 4%

En el 86% de las rinoscopias, los hallazgos endoscópicos fueron masas con distinta ubicación. En el 14% restante se hallaron eritemas, lesiones ulcerativas y moco (Tabla 2).

Tabla 2: Hallazgos endoscópicos

Table 2: Endoscopic Findings

Hallazgos	
Masas: 86%	Anterior: 37,5%
	Antero posterior: 33%
	Anterior: 29%
Eritemas, úlceras: 14%	

El diagnóstico de las 24 masas arrojó 60% de TVT (Fig. 1) (de los cuales 83% eran machos). En aquellas masas que no eran TVT, 29% fueron benignas (pólipos y neoplasias epiteliales benignas) y 71% fueron malignas (neoplasia epitelial maligna, carcinoma de glándulas mucosas con bajo índice de malignidad, carcinoma pobremente diferenciado, condrosarcoma y osteosarcoma osteoblástico). En 4 casos no se realizó ni citología ni HP. De los 24 casos con hallazgos de masa, en 58% se observaba como signo clínico descarga sanguinolenta, en 4% rinorragia y en 38%

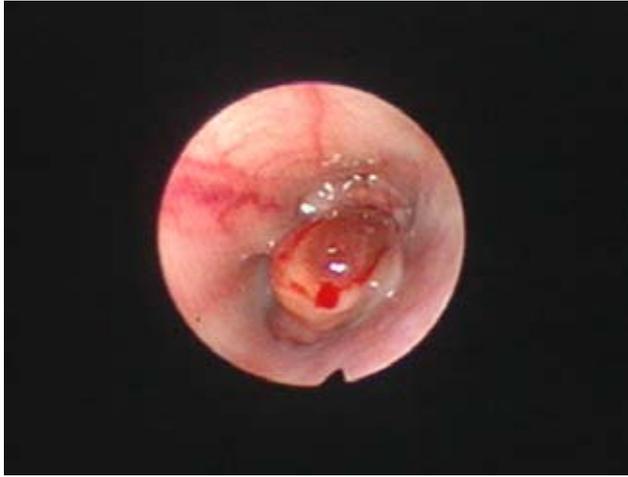


Fig 1. TVT en rinofaringe.

Fig.1. TVT in nasopharynx

descarga no sanguinolenta, no observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) en cuanto a tipo de descarga y malignidad de la masa.

Discusión

La implementación de la rinoscopia como método de diagnóstico en las enfermedades nasales permite identificar masas en rinofaringe, no identificables con otros métodos, posibilitando el abordaje quirúrgico correcto. Permite la identificación directa de lesiones, la toma de muestras para citología e histopatología, pudiendo arribar más fácilmente a un diagnóstico definitivo. La mayor frecuencia de tumores malignos coincide con la bibliografía internacional.

Bibliografía

1. Gieger T, Northrup N. Clinical Approach to Patients with Epistaxis. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 2004, 26 (1): 30-44.
2. Hawkins E. Métodos Complementarios para la Cavidad Nasal y Senos Paranasales. En: Nelson-Couto (ed). *Medicina Interna de Animales Pequeños.* Ed. Inter-Médica, Buenos Aires, 2005; pp. 232-242.
3. Lecoindre P. Atlas d'Endoscopie chez les carnivores domestiques. Éditions MED'COM, Paris, 2001
4. Padrid P, McKiernan B. Rhinoscopy. En: Todd Tams (ed) *Small Animal Endoscopy.* Ed. Mosby, Missouri, 1999. pp 357-362.
5. Willard M, Radlinsky M. Endoscopic examination of the choanae in dogs and cats: 118 cases. *JAVMA* 1999, 215 (9): 1301-1305.
6. Forbes L, Hawkins E. Evaluation of rhinoscopy and rhinoscopy assisted biopsy in diagnosis of nasal disease in dogs: 119 cases. *JAVMA* 1992, 201 (9): 1425-1429.
7. Knotek Z, Fichtel R, Husník JB. Endoscopic Diagnostics of Chronic Diseases of the Nasal Cavity in Dogs. *Acta Vet Brno.* 2000, 69: 319-326.

8. Lecoindre. Endoscopy of the respiratory tract Proceedings WSAVA Congress 2002 <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2610>

ATRESIA DE LA VENA PORTA EN UN CANINO. REPORTE DE UN CASO

MG Allende¹, W Acosta², HA Baschar³, A Massone⁴, ML Diez¹, AN del Amo⁵

¹Servicio Central de Cirugía. ²Servicio de Diagnóstico por Imágenes. ³Medicina Operatoria. ⁴Cátedra de Anatomía y Fisiología Patológicas. ⁵Cátedra de Clínica de Pequeños Animales Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: *La atresia vascular portal es una anomalía congénita poco frecuente en los caninos. Los shunts porto sistémicos (SPS) son comunicaciones entre la vena porta y el sistema venoso, de manera que la sangre portal pasa a la circulación general sin ingresar al hígado. Los mismos pueden ser congénitos o adquiridos y presentar una ubicación intra o extra hepática. En asociación a la atresia portal se han hallado shunts simples congénitos y múltiples adquiridos. El presente trabajo describe la presentación clínica de un perro con atresia de la vena porta y shunts portosistémicos múltiples adquiridos, así como los hallazgos en los estudios de laboratorio, radiológicos, ultrasonográficos e histopatológicos post mortem.*

Palabras clave: atresia portal -shunt- comunicaciones vasculares- canino

VASCULAR PORTAL ATRESIA

ABSTRACT: *The vascular portal atresia is a congenital anomaly rarely seen in canines. The portal systemic shunts (PSS) are connections between portal vein and vein system, so that portal blood accesses to general circulation without trespassing the liver. These shunts can be congenital or acquired and also they can present an intra or extra liver location. In association with portal atresia there have been found simple congenital and multiple acquired shunts. The present report describes a clinical presentation of a dog with portal vein atresia and multiple acquired portal systemic shunts, so as the laboratory, radiological, ultrasonographical findings, including histopathological studies post mortem.*

Key words: portal atresia- shunts- dog

Fecha de recepción: 25/07/05

Fecha de aprobación: 20/01/06

Dirección para correspondencia: Miriam Allende, Servicio Central de Cirugía. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. C.C. 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: mallende@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

En pacientes normales, la vena porta y sus tributarias componen el sistema portal, el cual termina formando un lecho capilar dentro del páncreas hepático. La vena porta colecta sangre del páncreas, bazo y todo el tracto gastrointestinal exceptuando al recto. A nivel del hilio hepático, ésta tiene un diámetro aproximado de 1,2 cm. La vena porta está formada por la confluencia de las venas esplénica, mesentérica caudal y mesentérica craneal. Existe un pequeño vaso, la vena gastroduodenal, que desemboca en la porta cerca del hilio hepático (1).

La vena cava caudal recibe en dirección craneal a las venas renales, las venas frénico-abdominales y antes de abandonar el abdomen recibe a las hepáticas a nivel de la cara diafragmática del hígado. Por último son tributarias las venas frénicas derecha e izquierda (1). Se consideran estructuras anómalas a los vasos que aboquen a la vena cava caudal en craneal de las venas frénico-abdominales antes de las venas hepáticas (2). La misma recibe la denominación de shunt porto sistémico o anastomosis portocaval. Estas comunicaciones entre la vena porta y el sistema venoso hacen que la sangre portal ingrese a la circulación general eludiendo al hígado (2). Pueden ser congénitas o adquiridas y presentarse en ubicación intra o extra hepática (2, 3). Algunas comunicaciones congénitas representan permanencia de anastomosis vasculares fetales; tal vez motivadas por la ausencia de las señales metabólicas apropiadas que disparan el cierre venoso fetal (3). Éstas, por lo general son vasos únicos de localización intrahepática (2). En cambio las adquiridas, suelen ser secundarias a un insuficiente lumen portal, ya que, cualquier alteración que genere aumento de presión en la vena porta (intra o extra hepática) activa estas comunicaciones venosas (4). Estas últimas son típicamente múltiples, extra hepáticas y conectadas a la vena cava representando el 20% de los casos reportados (2).

La anomalía congénita de la vena porta más reportada en caninos es la hipoplasia en su trayecto extra y/o intra hepático (5). La aplasia de la vasculatura portal intrahepática se cita como anomalía congénita excepcional (6). Los pacientes con estas anomalías vasculares pueden presentar signos clínicos muy variables. Algunos animales son llevados a la consulta por presentar disuria o hematuria motivadas por urolitiasis (4). Otros problemas frecuentes, suelen ser retardo en el crecimiento, pérdida ponderal o presentar signos de encefalopatía hepática, generados por un inadecuado clearance de toxinas derivadas desde el intestino. Muchos perros tienen predilección por comer frutas o vegetales (4). A menudo los signos son intermitentes y se exacerban después que el animal ingiere una dieta hiper proteica.

Los mismos incluyen ataxia, presión de la cabeza contra objetos, convulsiones o coma (2). La disminución del flujo sanguíneo hepático y la falta de factores tróficos como insulina y glucagón derivan en atrofia hepática (3). Otro signo informado es la ascitis desencadenada por hipoalbuminemia severa o asociada a desórdenes hepáticos adquiridos, como la fibrosis periportal y a la hipertensión portal. Las alteraciones gastrointestinales más comunes son anorexia intermitente, vómitos y diarrea (2, 4).

El rango etario de los animales afectados con anomalías congénitas es de 2 meses a 8 años, siendo la mayoría menores a un año de edad (4).

Entre los hallazgos de laboratorio pueden observarse hipocolesterolemia, hipoglucemia, hipoalbuminemia e hipoglobulinemia; mediana elevación de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), elevación de la amoniemia, anemia microcítica y poiquilocitosis. En la orina se pueden hallar cristales de biurato de amonio y de uratos (3).

En el presente trabajo se describen el caso clínico y la planificación diagnóstica de un canino con atresia de la vena porta y shunts portosistémicos múltiples adquiridos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Una hembra canina de 7 meses de edad, mestiza, de 8 kg de peso, fue atendida en la Cátedra de Clínica de Pequeños Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias (Universidad Nacional de La Plata), por presentar una severa distensión abdominal de 20 días de evolución. El apetito era normal, la alimentación consistía en carne picada y alimento balanceado, había sido vacunada y desparasitada dos meses antes. Vivía desde hacía cuatro meses en la casa junto a otros tres perros sanos.

Durante el examen físico se observó disnea leve, las mucosas aparentes eran levemente ictéricas y la temperatura rectal era 38,9 °C. La auscultación torácica estaba dentro de los límites normales (frecuencia cardíaca: 160) excepto el área de auscultación cardíaca que se hallaba desplazada hacia craneal. La severa distensión abdominal impedía la palpación visceral, por lo que se realizó la paracentesis abdominal. El líquido obtenido, de aspecto translúcido ambarino, se envió para estudio físico-químico y recuento celular. La palpación abdominal posterior no evidenció ninguna anomalía.

Se remitió sangre para hemograma, química sérica de rutina y amoniemia.

Se indicaron estudios radiológicos de tórax y ultrasonográficos de tórax y abdomen, con el objeto de identificar posibles anomalías cardíacas o vasculares.

Posteriormente se realizó una laparoto-

mía exploratoria para categorizar el presunto cortocircuito portocava mediante arteriografía intraquirúrgica.

Debido a la reducción del funcionamiento hepático, se realizó la premedicación anestésica con un opioide reversible (butorfanol) y con un anticolinérgico (atropina); la inducción se realizó con máscara con sevoflurane.

Se colocó una vía central en yugular para medir presión venosa central. Se realizó una laparotomía xifo-retroumbilical, posteriormente se aspiró el líquido ascítico contenido en la cavidad abdominal. Luego se procedió a explorar la cavidad, para esto se retrajo el duodeno hacia la izquierda y ventralmente, para poder visualizar la vena cava caudal, la porta en ventral de la vena cava y las venas renales (Figura 1).

Posteriormente se exteriorizó un segmento de yeyuno para hacer una yeyunoportografía, se canalizó una vena yeyunal con un catéter n° 20 cerca del borde mesentérico del intestino, se lo aseguró con dos suturas y se le acopló una válvula de tres vías para poder medir presión venosa yeyunal. El líquido de contraste (Triyoson) se administró en forma lenta en dos tiempos, permitiendo una exposición radiográfica con incidencia laterolateral y otra ventrodorsal. Por último se obtuvo una muestra incisional hepática para su estudio histopatológico (Figura 2). Al ser informado el propietario sobre la condición del animal y el pronóstico, se decidió la eutanasia y autorizó la necropsia.

Fueron remitidas muestras de la vena porta y parénquima hepático para estudio histopatológico.

RESULTADOS

Los hallazgos del hemograma y de la química sérica no arrojaron datos orientativos de la distensión abdominal a excepción de un aumento leve de los valores de bilirrubina y descenso de las proteínas plasmáticas (4,5 g/l). La amoniemia fue normal. El estudio del líquido abdominal era compatible con trasudado (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis del líquido abdominal.

Table 1. Analysis of abdominal fluid.

pH	8
Proteínas	300 mg/dl
Glucosa	500 mg/dl
Sangre	++
Densidad	1.015
Color	amarillento claro, traslúcido
Recuento celular	400 células por ml

La radiografía y la ecocardiografía arrojaron hallazgos normales. En el estudio ultrasonográfico abdominal se observó aumento de la ecogenidad de distribución homogénea y generalizada del parénquima hepático. No se vieron estructuras

lineales intrahepáticas compatibles con vasos portales.

La exploración quirúrgica del abdomen permitió observar un hígado de menor tamaño que el normal (tamaño aproximado 60%). También se constató una disminución del calibre y marcado aumento de la consistencia a la palpación de la vena porta; así como una serie de vasos tortuosos de pequeño diámetro comunicando el inicio de la vena porta con la vena cava caudal (Figura 3).

En la yeyunoportografía intraquirúrgica, se observó el llenado de la vena yeyunal, de la mesentérica craneal y de numerosas venas tortuosas de escaso calibre en dirección a la vena cava. No hubo ingreso del radiopaco en la vena porta en proximal del hígado en las proyecciones latero-lateral (Figura 4a) comparadas con la misma técnica en un animal normal (Figura 4b) y ventro-dorsal (Figuras 5a y 5b).

La medición de la presión venosa central fue de 4 cm de H₂O y de la yeyunal 6 cm de H₂O.

Durante la necropsia se observó la vena cava caudal y sus tributarias, la vena mesentérica craneal y la vena porta. Se vieron múltiples vasos tortuosos de distintos calibres desde el comienzo de la vena porta hacia la cava abocando cranealmente a las venas renales. Hacia craneal de estas neovascularizaciones se observó la vena porta como un cordón fibroso continuando esta anomalía en las ramas que entraban a los respectivos lóbulos hepáticos. Los mismos no poseían lumen. Al examen macroscópico, el hígado era pequeño, homogéneo, firme al tacto y con escasa vascularización; la superficie era ligeramente granular (Figura 6).

El estudio histopatológico reveló distorsión de la arquitectura lobulillar, fibrosis periacinar, con dilatación de la vena centrolobulillar con formación de microtrombos y presencia de pigmentos intracitoplasmáticos (hemosiderina) en las células de van Kupffer. El examen microscópico de la vena porta reveló la ausencia de luz intravascular con reemplazo fibrótico.

DISCUSIÓN

A pesar que la amoniemia del paciente resultó dentro de valores normales, no se desechó el diagnóstico presuntivo de encefalopatía hepática, dado que la hiperamoniemia no es consistentemente demostrable (6).

El estudio ultrasonográfico hizo sospechar la ausencia del sistema portal hepático al no haberse hallado imágenes compatibles con los vasos portales, a pesar de no detectarse los shunts. Otro método diagnóstico más preciso como la scintigrafía recto portal no fue realizado por no contar con el equipamiento necesario (6).

Durante la laparotomía exploratoria se pudo constatar que la vena porta era un cordón fibroso firme al tacto. Al intentar colocar un caté-

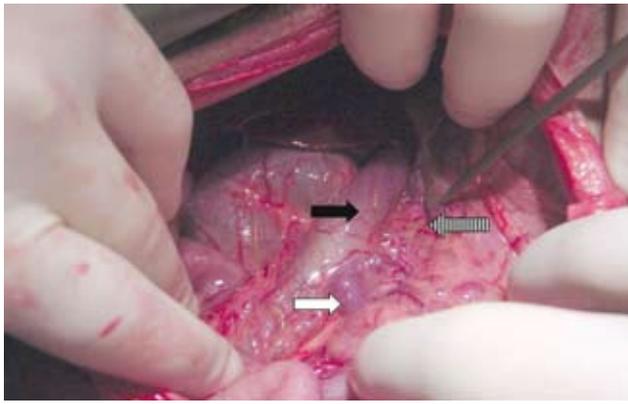


Fig.1. Laparatomía exploratoria mostrando la vena cava caudal (flecha negra), la vena renal dilatada (flecha blanca) y la vena porta como un cordón fibroso (flecha rayada).

Fig. 1. Exploratory laparotomy showing caudal cava vein (black arrow) dilated renal vein (white arrow) and portal vein as a fibrous cord (streaky arrow).

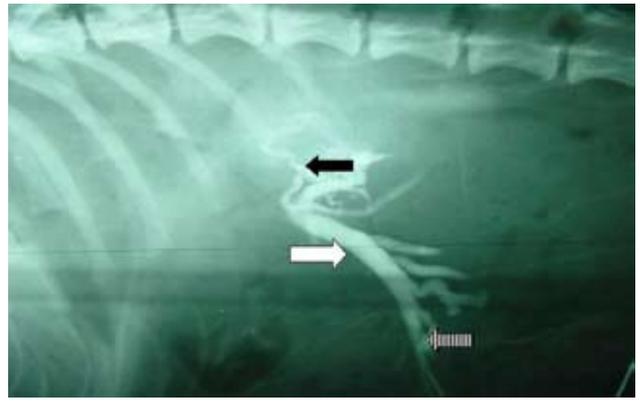


Fig.4a. Yeyuno-portografía latero lateral evidenciando el líquido radiopaco inyectado en una vena yeyunal (flecha rayada), marcando el recorrido de la vena mesentérica craneal (flecha blanca) y las neoformaciones vasculares o shunts (flecha negra).

Fig. 4 a. Lateral view of a yeyunum portal venography showing a radiopaque liquid in a yeyunal vein (streaky arrow), demonstrating cranial mesenteric vein distance (white arrow) and shunts (black arrow).



Fig. 2. Biopsia hepática.

Fig. 2. Hepatic biopsy

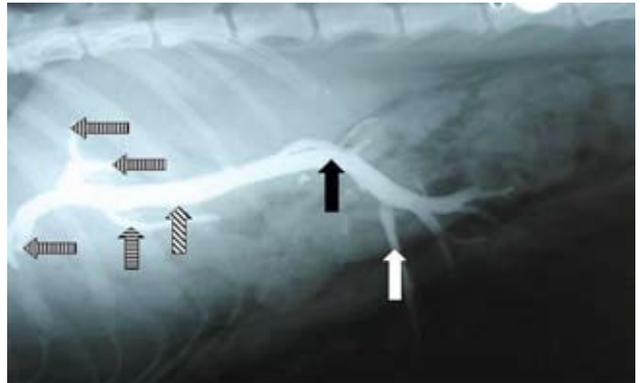


Fig.4b. Yeyuno-portografía normal mostrando la vena yeyunal (flecha blanca), vena mesentérica craneal (flecha negra), vena porta (flecha rayada diagonal) y sistema portal (flechas rayadas).

Fig. 4b. Normal yeyunum portal venography showing yeyunal vein (white arrow), cranial mesenteric vein (black arrow), portal vein (diagonal streaky arrow) and portal system (streaky arrows).

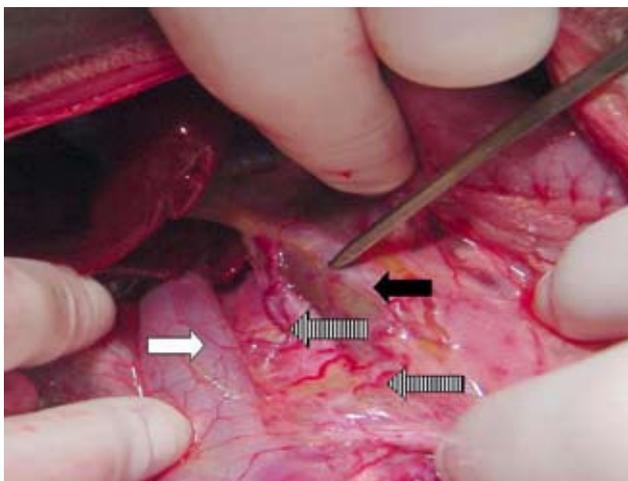


Fig. 3. Vena cava caudal (flecha blanca) shunt porto-cava (flechas rayadas), vena porta (flecha negra).

Fig. 3. Caudal cava vein (white arrow), porto-caval shunt (streaky arrow), portal vein (black arrow).

ter para medir su presión se confirmó la ausencia de lumen vascular. Además se observaron múltiples vasos comunicantes entre el inicio de la vena porta extra-hepática y la vena cava caudal. En la yeyuno-portografía intraquirúrgica, se visualizó el llenado de la vena yeyunal, de la mesentérica craneal y de numerosas venas tortuosas de escaso calibre en dirección a la vena cava. No hubo ingreso del radiopaco en la vena porta en proximal del hígado, lo que se interpretó como ausencia de lumen portal (7, 8, 9). Las anastomosis múltiples extra-hepáticas se citan en la bibliografía como defectos adquiridos secundarios a otras alteraciones vasculares congénitas (3). Estas representan aproximadamente el 20% de todas las anastomosis porto-sistémicas caninas (2) y surgirían en

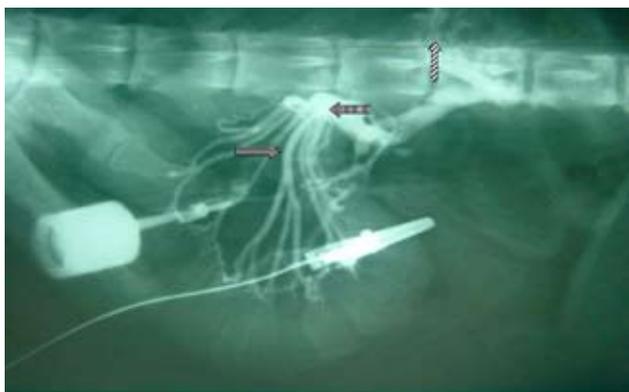


Fig.5a. Yeyunoportografía ventro-dorsal mostrando las venas yeyunales (flecha rayada horizontal), la vena mesentérica craneal (flecha rayada vertical) y las neoformaciones vasculares o shunts (flecha rayada diagonal).

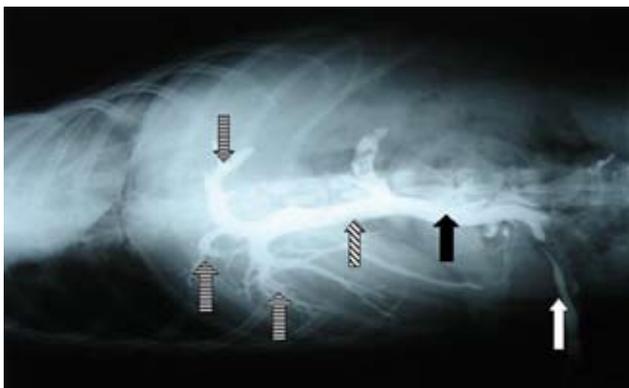


Fig.5b. Yeyuno-portografía normal: vena yeyunal (flecha blanca), vena mesentérica craneal (flecha negra), vena porta (flecha rayada diagonal) y sistema porta (flechas rayadas).

Fig. 5b. Normal yeyunum portal venography: yeyunal vein (white arrow), cranial mesenteric vein (black arrow), portal vein (diagonal streaky arrow) and portal system (streaky arrows).



Fig.6. Vena porta (flecha) y sus colaterales con aspecto de cordón fibroso.

Fig. 6. Portal vein (arrow) and colaterals as a fibrous cord.

parte debido al incremento de la resistencia al flujo sanguíneo portal y la resultante hipertensión portal (2, 3). Al intentar colocar un catéter en la vena porta fibrosada para medir su presión, se confirmó la ausencia de lumen vascular. Este hallazgo impidió tanto el registro de su presión, como la relación de las presiones porto/cava y porto/central. No se realizaron las ligaduras de las múltiples comunicaciones porto-cavales por hallarse contraindicadas al agravar la hipertensión portal (3). La micro-hepatia se adjudicó a la falta de aporte de nutrientes necesarios para el desarrollo, ya que los mismos ingresan al parénquima por la vena porta (2, 3).

Los hallazgos descritos en el estudio histopatológico conciden con los citados en la bibliografía como resultado de la hipertensión portal crónica (5, 10). Ambos hechos se consideraron la causa de la colecta abdominal, motivo de la consulta de este caso. Otro método diagnóstico más preciso como la scintigrafía recto portal no fue realizado por no contar con el equipamiento necesario (11, 12).

BIBLIOGRAFÍA

1. Getty R. Anatomía de los Animales Domésticos, Salvat Editores. Barcelona (España), 1982; p.1705-8.
2. Fossum TW. Cirugía del Hígado. Anomalías Vasculares Portosistémicas. Ed. Intermedica (Buenos Aires), 1999; p.408-19.
3. Johnson SE. Pathophysiology Laboratory Diagnosis and Diseases of the Liver. Textbook of Veterinary Internal Medicine. Ettinger SJ, Feldman EC (eds) WB Sanders Company Fourth Ednition. Philadelphia (USA), 1995; p.1313-57.
4. Nelson RW, Couto CG. Anastomosis Portosistémicas Congénitas. Medicina Interna de Animales Pequeños. Segunda Edición, Ed. Intermedica (Buenos Aires), 1998; p.567-8.
5. Van den ingh T, Rothuizen J, Meyer H. Circulatory disorders of the liver in dogs and cats. 1: VetQ 1995; Jun 17(2): 70-6.
6. Center S. Pathophysiology, Laboratory Diagnosis, and Diseases of the liver Textbook of Veterinary Internal Medicine. Ettinger SJ, Feldman EC.(eds) WB Sanders Company Fourth Ednition. Philadelphia (USA), 1995; p.1261-371.
7. Lamb CR, Daniel G. Diagnostic Imaging of dogs with suspected portosystemic shunting. Compend Contin Educ Pract Vet. 2002; Vol 24:626-35.
8. Boothe HW, Howe LM, Edwards JF, Slater MR. Multiple extrahepatic portosystemic shunts in dogs: 30 cases (1981-1993). J Am Vet Med Assoc 1996; 208 (11): 1849-54.
9. Kelly R. The liver and Biliary System. En: Pathology of Domestic Animals. Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N.(eds) 1993; Academic Pres Inc (USA) vol. 2: 319-424.

10. Trall DE. Textbook of veterinary Diagnostic Radiology. W.B Sanders Company, Philadelphia (USA), 1998; p. 461.
11. Morandi F, Cole RC, Tobias KM, Berry CR, Avenell J, Daniel GB. Use of $^{99m}\text{TcO}_4^-$ trans-splenic portal scintigraphy for diagnosis of portosystemic shunts in 28 dogs. *Vet Radiol Ultrasound*. 2005 Mar-Apr; 46 (2): 153-61
12. Lamb CR. Diagnostic Imaging of Dogs with Suspected Portosystemic Shunting. *Compendium August*; Vol. 24, N° 8: 626-35.

ADMINISTRACIÓN TRANSDÉRMICA DE FÁRMACOS: UNA ALTERNATIVA TERAPÉUTICA

NF Villarino, MF Landoni

Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias.
Universidad Nacional de La Plata. CONICET.

RESUMEN: *La vía de administración epicutánea provee una alternativa de administración muy importante para aquellas drogas potencialmente tóxicas cuando son administradas por otras vías, para terapias prolongadas y terapias de reemplazo. Existen tres formas de administrar fármacos a través de la piel; (i) sistemas de administración transdermal (parches), (ii) drogas aplicadas como spot-on y pour-on y (iii) la aplicación epicutánea de fármacos a través de cremas y geles. La penetración de drogas a través de la piel depende de varios factores (relativos al animal, a las drogas y a las formulaciones) que pueden modificar la eficacia de un tratamiento. La presente revisión analiza cada uno de estos factores, así como las metodologías cuantitativas disponibles para su análisis.*

PALABRAS CLAVE: administración transdermal, epicutánea, modelos, penetración.

TRANSDERMAL DRUG ADMINISTRATION: A THERAPEUTICAL ALTERNATIVE

ABSTRACT: *Epicutaneous administration represents an important alternative of administration for drugs that are toxic when administrated by other routes, long term therapies and replace therapies. There are three ways for drug administration through the skin (i) transdermal administration systems (patches), (ii) drugs applied by spot-on and pour-on and (iii) epicutaneous application of drugs formulated as creams or gels. Drug penetration through the skin depends on many factors, dependent on animal, drugs and formulation, which can modify the efficacy of a treatment. This review analyzes each of those factors, as well as, the available methodologies for their analysis*

KEY WORDS: Transdermal administration, epicutaneous, models, penetration.

Fecha de recepción: 24/10/05

Fecha de aprobación: 20/02/06

Dirección para correspondencia: N.F. Villarino. Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 118 cc 296 . B1900AVW. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Email: nicovillarino@yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PIEL

La piel es el órgano de mayor tamaño del organismo, asimismo, uno de los más complejos. La piel está constituida por la epidermis, dermis y subcutis. Cada una de estas estructuras es física y funcionalmente diferente, con apéndices (pelos, glándulas sebáceas y sudoríparas) en diferentes proporciones, las cuales varían de acuerdo a la especie animal y la localización anatómica.

La función primaria de la piel es la protección frente a agentes ambientales, tanto físicos (radiación UV, calor, frío), como químicos y microbiológicos. La piel también participa en la termorregulación, actúa como órgano sensorio y tiene funciones endócrinas (síntesis de vitamina D y conversión de feromonas) (1). La piel posee una compleja estructura, y está compuesta por una amplia gama de tipos celulares incluyendo, células sanguíneas y del sistema inmune.

2.1 EPIDERMIS

Las células de la epidermis pueden dividirse en corneocitos y no corneocitos. Este último grupo incluye melanocitos (2), células de Langerhans y células de Merkel. Las células de Langerhans controlan la proliferación de los corneocitos y son importantes células presentadoras de antígenos (3), mientras que las células de Merkel se ubican en la región basal y funcionan como nociceptores. En este punto cabe aclarar que el término nociceptor incluye receptores que responden estímulos de origen variado (dolor, temperatura, presión) (4).

Los corneocitos están dispuestos en capas y conectados por medio de desmosomas y hemidesmosomas (5). Las células cornificadas del estrato córneo se renuevan de forma cíclica, siendo la duración de estos ciclos menor de tres semanas (6).

Estrato córneo

El estrato córneo está constituido por células muertas que poseen en su interior una proteína insoluble, amorfa y rica en sulfuro llamada queratina (7). Estas células están rodeadas de una capa lipídica continua constituida por ceramidas, ácidos grasos y colesterol (7), a la que se denomina bicapa lipídica intercelular (7). Esta estructura funciona como una barrera altamente lipofílica, la cual evita la pérdida excesiva de agua y previene la penetración de moléculas (8).

Elias y Feingold (9) desarrollaron un modelo que describe la organización del estrato córneo al que denominaron "ladrillos y cemento". De acuerdo a este modelo, los corneocitos queratinizados conforman una barrera de alta tortuosidad (espacial) que dificulta el pasaje de

moléculas, independientemente de su tipo. Asimismo, los lípidos hidrofóbicos organizados intercelularmente como láminas finas firmemente agrupadas incrementan la impermeabilidad del estrato córneo, en este caso específicamente para sustancias hidrofílicas

El estrato córneo, representa el blanco primario de todos los métodos utilizados para mejorar la penetración transepitelial de fármacos. Sin embargo, como se discutirá posteriormente, el mejoramiento de la penetración es un objetivo difícil de alcanzar, debido a la alta velocidad de restitución que posee el estrato córneo.

Las estrategias más comúnmente aplicadas para modificar el estrato córneo se basan en: (a) remoción de lípidos aplicando solventes orgánicos (lo que conduce a un gran pérdida de agua) y (b) remoción de corneocitos y lípidos (*tape stripping*). Ambas estrategias inducen cambios en las conductancias de iones y síntesis de citocinas lo que inicia una respuesta metabólica de las células nucleadas de la epidermis, conduciendo a una restitución de la barrera lipídica y restauración la impermeabilidad. Existen técnicas no invasivas que permiten monitorizar el tiempo de la respuesta de reparación de esta barrera, como el método de pérdida de agua transepidermal (TEWL) (10).

2.2 DERMIS

La dermis está conformada, principalmente, por mucopolisacáridos. Las principales células encontradas en esta región son fibroblastos, los cuales producen tejido conectivo. Esta región se caracteriza por estar altamente innervada y poseer una gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos (10).

2.3 APÉNDICES

Los apéndices representan estructuras muy importantes en los animales domésticos cumpliendo fundamentalmente funciones de protección. El estrato córneo se invagina dentro de las estructuras de la piel constituyendo el folículo piloso.

Desde el punto de vista de la penetración de drogas el número y tipo de apéndices cutáneos es muy relevante. A nivel de los apéndices, el espesor del estrato córneo disminuye e, inclusive, puede desaparecer. Consecuentemente los apéndices cutáneos se transforman en vías de penetración muy importantes. El número de apéndices varía de acuerdo a la especie y a la región anatómica (11).

Entre las especies domésticas, los ovinos presentan la mayor densidad de folículos pilosos (10.000 folículos/cm²). Este es un número extraordinariamente alto si lo comparamos con los humanos que poseen solamente 40-70 folículos/cm² (10).

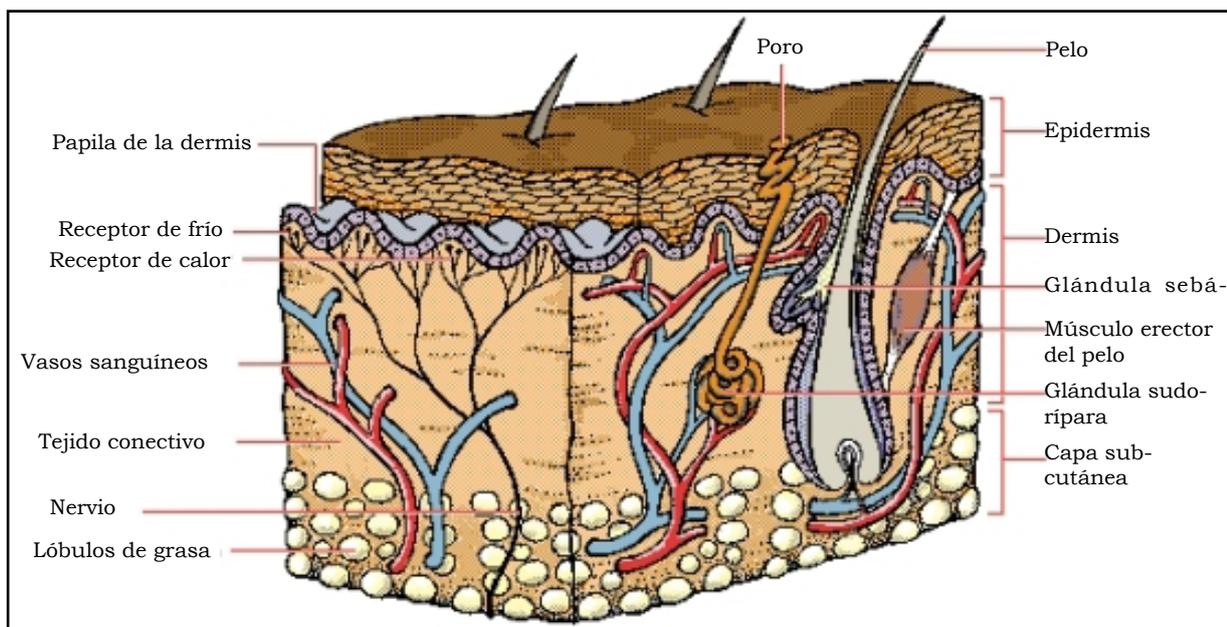


Fig. 1. Estructura de la piel
Fig.1 Skin structure

3. PENETRACIÓN DE DROGAS

La liberación del principio activo desde la formulación aplicada en la superficie de la piel y su transporte hacia la circulación sistémica o su concentración local es un proceso que incluye diversos pasos: (a) disolución del principio activo en y liberación desde la formulación, (b) partición desde la formulación hacia la capa más externa de la piel, o sea el estrato córneo (EC), (c) difusión dentro del estrato córneo, (d) partición desde el estrato córneo hacia la dermis y (e) difusión hacia los capilares sanguíneos y/o penetración a los tejidos subyacentes (12).

Posteriormente a la administración epicutánea de las formulaciones/sistemas de liberación las drogas pueden penetrar la piel por diferentes vías, concentrarse localmente y/o penetrar en el torrente sanguíneo.

3.1 VÍAS DE PENETRACIÓN DE DROGAS

La penetración de las drogas a través de los dominios lipídicos del estrato córneo es un proceso lento, seguido de una rápida difusión a través de la epidermis viable y la dermis papilar (13). Ambos procesos se llevan a cabo por difusión pasiva. La velocidad y la magnitud de este transporte están gobernadas por la ley de Fick, según la cual la velocidad de difusión es directamente proporcional al coeficiente de difusión y al de partición del principio activo y a la solubilidad del mismo en el medio acuoso que rodea la membrana, siendo inversamente proporcional al grosor de la membrana a ser atravesada.

Las drogas aplicadas de forma epicutánea pueden atravesar la piel a través de diferentes rutas: (a) intercelular, (b) transcelular, (c) transfolicular, (d) vía glándula sebácea (e) vía glándula sudorípara y (f) mixta (7, 10, 13, 14), siendo la vía intercelular la más común (6).

Se ha reportado que las drogas no polares atraviesan el estrato córneo por la ruta intercelular, mientras que las drogas polares lo hacen por la ruta transcelular (4). Las glándulas sebáceas son más permeables que los cornecitos, por lo tanto la unidad pilo sebácea (folículo piloso, pelo y glándula sebácea) constituye una vía alternativa que permite que las drogas alcancen la dermis evadiendo la impermeabilidad del estrato córneo intacto (7).

3.2 FACTORES QUE LIMITAN LA PENETRACIÓN

El pasaje de los fármacos administrados en forma tópica a través de todas las estructuras que conforman la piel es imprescindible si se pretende alcanzar concentraciones efectivas a nivel local o sistémico. Sin embargo, este es un objetivo difícil de lograr, dado que este pasaje (penetración) es altamente variable (15), lo cual se refleja en las diferencias significativas en la concentración alcanzada en el sitio de acción.

Los factores que determinan la penetración de las drogas a través de la piel pueden ser divididos de acuerdo a su determinante primario en: a) dependientes del paciente, b) dependientes del principio activo y c) dependientes de la formulación.

3.2.1 FACTORES DEPENDIENTES DEL PACIENTE

Existen diferentes estructuras que actúan como barrera para la penetración de drogas: (i) la capa epicutánea (un manto ácido y una capa acuosa), (ii) la capa electrolítica subcórnea, (iii) la epidermis (iv) la unión dermatoepidérmica (v) la dermis y (vi) la unidad pilosebácea (foliculo piloso, pelo y glándula sebácea) (7). Como se mencionara previamente, el estrato córneo es considerado como la principal barrera de la piel (13, 16).

La penetrabilidad de las drogas a través del estrato córneo varía dependiendo de la especie y edad del animal. El pH de la piel (determinante fundamental del estado de ionización de las moléculas), la temperatura medioambiental (como determinante del grado de hidratación cutánea) (17) y el estado de hidratación general son factores que pueden alterar la magnitud del proceso de penetración de las drogas aplicadas epicutáneamente (13).

Considerando que el estrato córneo posee carga negativa, (7) las moléculas catiónicas (ej. PSGAGs) (18) no penetrarán fácilmente el estrato córneo.

Los pelos alteran la penetración de las drogas actuando como barrera física, limitando el contacto necesario entre la droga y el epitelio para la posterior penetración (10). Las consecuencias de la alta densidad pilosa sobre la penetración de drogas son discutidas. Algunos autores consideran que existe una correlación negativa entre la densidad pilosa y la penetración (10), mientras que otros consideran que la alta densidad de folículos pilosos mejora la penetración de las drogas debido a que las invaginaciones del epitelio en los folículos pilosos incrementaría el área total de contacto formulación/piel (19).

Otro factor importante a considerar es el metabolismo epidermal de drogas (19). La epidermis tiene la capacidad de metabolizar drogas antes de que sean absorbidas a la circulación sistémica (efecto de 1° paso cutáneo), habiendo sido reportada la presencia de enzimas que catalizan reacciones metabólicas tanto de fase 1 como de fase 2 (13). Esta actividad metabólica de la piel podría ser de utilidad para activar prodrogas las cuales pueden ser formuladas para maximizar la penetración transdermal (20).

Las secreciones de las glándulas sebáceas y sudoríparas constituyen otra importante variable en el pasaje de las drogas a través de la piel (10). La zona anatómica de aplicación es otro factor importante en la penetración transepitelial de los fármacos (10). En este contexto, existen importantes diferencias en el grosor y contenido lipídico de la piel entre las diversas zonas anatómicas con características de zonas de aplicación. Un factor relacionado es el flujo sanguíneo local, cuya modificación determina cambios en los pa-

trones de penetración de drogas (21). Estudios de flujo sanguíneo local utilizando eco-doplers han permitido demostrar diferencias intra-animal así como inter-animal (11).

3.2.2 FACTORES INHERENTES A LAS DROGAS

En forma general, la capacidad de las drogas de difundir a través de las membranas biológicas depende de a) peso molecular (< 400), b) tamaño molecular, c) grado de ionización y d) solubilidad.

Con respecto a las propiedades fisicoquímicas de las drogas, la capacidad intrínseca de penetración de las moléculas está determinada por el adecuado equilibrio entre la liposolubilidad e hidrosolubilidad. Siendo el coeficiente de partición lípido/agua uno de los factores determinantes de la magnitud de las concentraciones iniciales de droga en la capa más superficial del estrato córneo.

Otro factor relacionado con el principio activo es su grado de ionización (7). En este punto es importante tener en cuenta que el grado de ionización del principio activo para aplicaciones epicutáneas estará determinado no sólo por el pH de la piel, sino también por el pH de la formulación.

Como se mencionara previamente, la dermis posee un alto contenido de agua y se comporta como barrera para la penetración de las drogas, fundamentalmente para aquellos componentes lipofílicos con un coeficiente de partición lípido/agua mayor a 600 (22). Se ha estimado que el estrato córneo provee una resistencia difusional de la penetración 1000 veces superior para las drogas hidrosolubles comparado con aquella para drogas liposolubles (10).

3.2.3 DEPENDIENTES DE LAS FORMULACIONES

La más simple de las formulaciones para la administración transdérmica de drogas consiste en un vehículo semisólido (ungüentos o cremas), conteniendo una suspensión de la droga homogéneamente distribuida.

La primera etapa del proceso de penetración esta representado por la liberación de la droga, la cual es controlada por la formulación, siendo éste el primer paso limitante del proceso (12). Una vez liberado desde la formulación el principio activo difunde hasta alcanzar la interfase formulación-piel, sitio en el que alcanza un equilibrio (estado estacionario).

La penetración de un principio activo desde la formulación aplicada epicutáneamente hasta la circulación sistémica o tejidos locales involucra múltiples procesos; (a) disolución y liberación dentro y desde la formulación (b) partición dentro

del estrato córneo, (c) difusión a través del estrato córneo, (d) partición desde el estrato córneo hacia la fase acuosa de la epidermis, (e) difusión a través de la dermis y (f) acceso a la circulación sistémica y/o tejidos circundantes (24).

Las propiedades relacionadas a las drogas que influyen su flujo a través de la piel son, de acuerdo a la ley de Fick, el coeficiente de difusión y de partición del principio activo y la solubilidad del mismo en el medio acuoso que rodea la zona de pasaje.

El gradiente de concentración es influenciado por la partición de la droga dentro de la piel y desde la piel hacia los tejidos subyacentes (25). El grado de partición dentro de la piel puede ser estimado a partir del coeficiente de partición octanol-agua (25), siendo la curva de correlación coeficiente de partición octanol-agua ($\log P$) vs ritmo de penetración una parábola, lo que define una relación asintótica (26).

Compuestos con bajo coeficiente de partición ($\log P$) poseen baja permeabilidad debido a su pobre capacidad de partición dentro del dominio lipídico del estrato córneo. Compuestos con un alto $\log P$ también mostrarán baja permeabilidad, en este caso debido a su escasa partición fuera del estrato córneo. La máxima penetración se observa en compuestos con $\log P$ en el rango de 1 a 3 (26).

Otra característica del principio activo que determina la partición de la droga dentro de la piel y en el vehículo es la actividad termodinámica en la formulación. El grado de actividad termodinámica puede ser mejorado incrementando la concentración de la droga o manipulando la formulación para reducir la solubilidad de la droga en el vehículo. La solubilidad de la droga en el estrato córneo puede ser mejorada incorporando sustancias denominadas "mejoradoras" de la penetración, entre ellas DMSO y propilenglicol (27).

La estructura química de la droga también influye la difusibilidad (28). Esto sería consecuencia de la interacción de los grupos polares de la molécula con el dominio lipídico del estrato córneo. La temperatura corporal es otro factor a considerar ya que puede alterar la cinética molecular y el emplazamiento espacial del principio activo (17).

4 MEJORAMIENTO DE LA PENETRACIÓN

Existen drogas no apropiadas para la aplicación epicutánea. Esto puede ser consecuencia de (i) sus características fisicoquímicas (excesivo tamaño, excesiva carga eléctrica, insuficiente solubilidad, tendencia a causar irritación directa, etc.) o (ii) sus características cinético / dinámicas (biotransformación cutánea, alta extracción en sangre o baja potencia) (10).

En los últimos años se han desarrollado diversas estrategias tecnológicas con el objetivo de mejorar la capacidad de penetración de las drogas. Estas estrategias pueden ser de tipo químico (mejoradores de la penetración) (29) o físico (iontoforesis, ultrasonido y microagujas) (30).

4.1 MEJORADORES DE LA PENETRACIÓN TRANSEPITELIAL DE FÁRMACOS

Aún cuando existe un gran número de sustancias con características apropiadas para mejorar la penetración de drogas, son muy pocas las que inducen un mejoramiento significativo *in vivo* de la penetración transepitelial, el cual se refleje en las concentraciones sistémicas y/o locales del principio activo (31). Otra característica que reduce el número de mejoradores aptos para uso *in vivo* es la irritación cutánea que estos compuestos provocan a las dosis efectivas para incrementar la difusibilidad de fármacos a través del estrato córneo (32, 33).

4.1.1 MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo exacto por el cual las sustancias mejoradoras aumentan la penetración de fármacos a través de la piel no ha sido dilucidado en forma completa y, es probable que tengan múltiples efectos una vez que acceden al estrato córneo (34).

Se han propuesto un gran número de acciones para estos compuestos que explican el incremento en la permeabilidad observada *in vivo*. Estas acciones pueden ser divididas en dos grupos:

(a) Acciones que incrementan la permeabilidad de la piel (7, 19, 30, 35, 37):

- Desnaturalización o modificación de la queratina intracelular causando un aumento de la hidratación (incremento del coeficiente de difusión de la droga en el estrato córneo).

- Alteración de los desmosomas que mantienen la cohesión entre los corneocitos (desordenamiento de la estructura del estrato córneo con un incremento de la difusibilidad).

- Modificación del dominio lipídico con reducción de la resistencia de la barrera epidérmica.

- En la dermis viable, estimulación/modificación del metabolismo celular con la consecuente hiperplasia.

- Inhibición del metabolismo celular con disminución del espesor de la piel.

(b) Acciones que modifican las propiedades fisicoquímicas de las drogas:

- Incremento del coeficiente de partición de la droga en la piel por aumentar la actividad termodinámica de la droga en el vehículo (34).

La combinación de sustancias mejoradoras de la permeabilidad (SCOPE) (*synergic combination of permeability enhancers*) puede considerarse como una alternativa en el desarrollo de las formulaciones. Ha sido reportado que la combinación de dos o mas mejoradores químicos de la penetración conduce a un sinergismo de suma (34). Inclusive un grado mayor de mejoramiento en la penetración de drogas tras la aplicación epicutánea podría lograrse combinando métodos físicos y químicos (30).

4.1.2 CARACTERÍSTICAS DEL MEJORADOR IDEAL DE LA PENETRACIÓN (63)

- Atóxico, no irritante e hipoalérgico.
- Rápida acción.
- Con un tipo y duración de actividad predecible y reproducible.
- Sin actividad farmacológica sistémica.
- Con efecto reversible.
- Compatible con excipientes y drogas.

4.2 MÉTODOS FÍSICOS PARA MEJORAR LA PENETRACIÓN TRANSEPITELIAL DE FÁRMACOS

Los métodos físicos que mejoran la penetración de fármacos a través de la piel son numerosos. Sin embargo, la mayoría se basa en la aplicación de corrientes y/o campos eléctricos. Básicamente, estas técnicas se aplican con el objetivo de (a) promover la penetración de fármacos que normalmente no atraviesan la barrera cutánea (fármacos de alto peso molecular como pueden ser hormonas), (b) aumentar la penetración de aquellos fármacos que penetran en concentraciones subterapéuticas y (c) reducir los períodos de latencia de aquellos productos aplicados tópicamente.

4.2.1 ULTRASONIDO

El ultrasonido mejora la penetración transdermal de drogas alterando la estructura del estrato córneo (39). El principal cambio estructural

observado en la piel tras la aplicación de ondas de sonido de baja frecuencia es la aparición de cavidades (cavitación) (30). Ha sido demostrado que la utilización de ondas de baja frecuencia (16- 20 kHz) mejora más de 1000 veces la penetración de ciertos fármacos, entre ellos insulina, eritropoyetina e interferón (35, 38).

4.2.2 IONTOFORESIS

La iontoforesis consiste en la aplicación de pequeñas corrientes eléctricas (~ 0.5 mA/cm²) a través de electrodos. La corriente eléctrica actuaría como un transportador de las drogas a través de las estructuras de la piel (39). Los mecanismos principales que conducen al incremento de la penetración son (i) repleción de iones, (ii) disminución de la resistencia de la piel aumentando la permeabilidad y (iii) electroósmosis (40).

La eficiencia de la iontoforesis depende, básicamente, de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas (polaridad, valencia) y de la interacción principio activo/formulación (40). La efectividad clínica de la iontoforesis ha sido reportada especialmente para formulados de anestésicos locales y drogas antiinflamatorias (41).

4.2.3 ELECTROPERMEABILIZACIÓN

La electropermeabilización consiste en aplicar pulsos de corriente eléctrica (~100-1000V/cm) sobre la piel por períodos cortos (micro o milisegundos) (42). La corriente aplicada induce la formación reversible de poros acuosos en el estrato córneo (11, 43) los cuales conforman una nueva ruta para la penetración de fármacos (44).

4.2.4 OTROS MÉTODOS FÍSICOS MEJORADORES DE LA PENETRACIÓN TRANSEPITELIAL DE FÁRMACOS (ver tabla 1)

Microagujas: son agujas microscópicas lo suficientemente grandes como para crear orificios en el estrato córneo de la piel y permitir el pasaje de moléculas, pero no para generar dolor (30).

Tabla I Características de los mejoradores químicos y físicos de la penetración cutánea de fármacos

MÉTODO	AUMENTA TRANSPORTE	NO CAUSA DOLOR O REACCIÓN	BAJO COSTO
Sustancias químicas	X	XX	XXX
Iontoforesis	XX	XXX	X
Permeabilización eléctrica	XX	XX	X
Ultrasonido	XX	XXX	X
Microagujas	XX	XXX	X
Inyección Jet	XXX	X	X
Permeabilización térmica	XX	XXX	X

Los métodos mejoradores son comparados en base a baja (x) moderada (xx) o alta (xxx) eficacia en su categoría.

Inyección Jet : consiste en la inyección a alta presión/velocidad dentro de la piel de gotas de líquido o partículas sólidas conteniendo la droga (30).

Permeabilización térmica: representa la formación de canales acuosos dentro del estrato córneo de la piel, tras la aplicación de pulsos térmicos (4).

5. LIPOSOMAS

El desarrollo de liposomas y tranferosomas ha permitido mejorar la eficacia de los fármacos aplicados por la vía epicutánea. Los liposomas son estructuras concéntricas biocompatibles formadas por bicapas lipídicas que rodean una fase acuosa. Los liposomas transportan tanto drogas hidrofóbicas como hidrofílicas, pudiendo entregar los principios activos intracelularmente (45, 46).

El desarrollo de inmunoliposomas ha permitido maximizar la utilidad de este tipo de formulaciones evitando el acumulo en células del sistema retículo endotelial (46).

6. MÉTODOS *IN VIVO* e *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE PENETRACIÓN TRANSEPITELIAL DE DROGAS

6.1 MÉTODOS *IN VITRO*

Los métodos *in vitro* aplicados al estudio de la penetración de drogas representan las técnicas más difundidas. En estos métodos se utilizan tanto piel animal o humana como membranas artificiales (piel artificial).

6.1.1 CELDA DE DIFUSIÓN

La celda de difusión de Franz representa, desde su desarrollo en 1975, el principal método utilizado para evaluar la penetración transepitelial de fármacos (24, 47, 48, 49). La celda de difusión es un sistema compuesto por dos cámaras, una donante y otra aceptora, separadas por piel o membrana artificial. El estrato córneo es orientado hacia la cámara donante a través de la cual se aplican las drogas a estudiar. Las celdas de difusión son mantenidas a 32-35 °C (50).

Aún cuando este método es considerado un sistema confiable de *screening* para evaluar la bioequivalencia/ biodisponibilidad (51) tiene varias limitaciones, por un lado, no contiene como variable de análisis a las rutas de eliminación de drogas (sistema vascular y metabolismo en la dermis) y, por otro, no pondera las modificaciones fisiológicas de la piel (contenido de agua, pH cutáneo, descamación del estrato córneo, temperatura) (10, 37). Es importante remarcar que la piel una vez montada en celdas de Franz o sistemas similares permanece con un grado constante de hidratación durante todo el periodo

del ensayo. Este factor podría afectar la bicapa lipídica (52) o inducir la formación de vesículas extracelulares en el estrato (53).

Con sus desventajas este modelo *in vitro* es un buen indicador cualitativo de la penetración cutánea de fármacos (54).

6.2 METODOS *IN VIVO*

6.2.1 ESTUDIOS EN ANIMALES

La penetración de drogas a través de las estructuras de la piel ha sido estudiada utilizando animales vivos. En estos casos, la capacidad de penetración de formulaciones o drogas aplicadas localmente es estimada evaluando las concentraciones alcanzadas en la circulación sistémica u orina. Feldman y Maibach (55) demostraron, utilizando hidrocortisona marcada (¹⁴C), que existen diferencias en la penetración de drogas relacionadas al sitio de aplicación. Asimismo, se ha reportado que ciertas drogas podrían quedar secuestradas en las estructuras de la piel (57) o concentrarse localmente sin penetrar en la circulación sistémica (55). Estos factores indicarían que las concentraciones de una droga mensuradas en la circulación sistémica no son reflejo de la penetración absoluta de un fármaco. Es por esta razón que las concentraciones sistémicas de una droga no son útiles para predecir concentraciones en los tejidos o en el líquido sinovial tras la administración tópica (56).

6.2.2 BIOPSIA CUTÁNEA

La biopsia cutánea representa un método que permite evaluar la cantidad de droga que penetra a través de las diferentes estructuras de la piel en función del tiempo. Sin embargo, este método, sólo permitiría evaluar la penetración al tiempo de la toma de muestra.

6.2.3 EXTRACCIÓN DEL ESTRATO CÓRNEO

La extracción del estrato córneo mediante una cinta adhesiva es otra de las técnicas que han sido utilizadas para evaluar la progresión de una droga a través del estrato córneo (57), así como para evaluar la influencia de este pasaje en el proceso de penetración de fármacos.

6.2.4 MICRODIÁLISIS

La técnica de microdiálisis es otro método importante utilizado para evaluar la penetración de fármacos tras la aplicación epicutánea (51). Esta técnica, poco invasiva, permite evaluar la penetrabilidad de fármacos aplicados localmente

Las principales limitaciones de esta técnica son reflejo de la interacción entre la droga en estudio (basado en sus propiedades fisicoquímicas -relación hidrosolubilidad/ liposolubilidad, PKa, etc-) y las características del líquido de diálisis

(58) así como la relación entre el tamaño molecular de la droga y el tamaño del poro de la membrana de diálisis. La mayoría de las membranas de microdiálisis solo son permeables a componentes hidrofílicos de bajo peso molecular (58).

El análisis comparativo de la penetración transepitelial evaluada usando microdiálisis y la celda de difusión tipo Franz, demuestran una buena correlación cuali y cuantitativa entre la penetración *in vitro* y los coeficientes de absorción *in vivo* (51).

6.2.5 MODELO ANTIEDEMATOSO

El modelo de edema intraepitelial ha sido utilizado para evaluar la penetración de diferentes fármacos a través del estrato córneo de animales vivos (50). Sin embargo, es importante considerar que este método de evaluación no serviría para predecir concentraciones de drogas en los tejidos subyacentes, ni la biodisponibilidad de la droga cuando es administrada epicutáneamente.

7. EVALUACIÓN DE LA PENETRABILIDAD

La aplicación de la ley de Fick al análisis la curva de disposición de droga tras la administración epicutánea, permite determinar los parámetros de que reflejan la penetración como, flujo de droga (J) y coeficiente de penetrabilidad (59). La penetración de una molécula a través de las estructuras de la piel genera un gradiente de concentración alcanzando un flujo de régimen estacionario que se puede describir con la siguiente fórmula:

$$\text{Flujo (Js)(\text{ig/cm/h})} = (\text{Dq/Dt}) \times (1/A)$$

Donde Dq es la cantidad de droga que atraviesa la piel, Dt es el tiempo, siendo la relación Dq/Dt representativa del flujo de droga en estado estacionario expresado en ig/h, y A el área de aplicación.

El flujo de una droga está estrechamente relacionado con el coeficiente de penetrabilidad que relaciona el flujo del soluto con el gradiente de concentración a través de la membrana o piel.

Coefficiente de penetrabilidad (K_p) = Js/dosis aplicada.

El flujo máximo (J_{max}) puede ser medido experimentalmente como el flujo desde una solución saturada a partir de k_p multiplicado por la solubilidad de la droga en la fase donante y representa una estimación de la cantidad máxima de droga que puede atravesar un área definida por unidad de tiempo (60).

El desarrollo de modelos matemáticos para describir y estimar la permeabilidad de la piel es un área de crecimiento constante, especialmente

para predecir la penetrabilidad de sustancias hidrofóbicas a través del estrato córneo (61). Estos modelos pueden ser categorizados de acuerdo a: (1) la relación de penetrabilidad/estructura cuantitativa (QSPRs), (2) expresiones basadas en mecanismos de difusión o (3) combinación de ambos.

8. PAUTAS PARA EL DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN

El desarrollo de una formulación es un ejercicio complejo en el cual se deben tener en cuenta tanto los efectos clínicos del principio activo (su farmacología) así como, los factores biofarmacéuticos del sistema de liberación, entre ellos : (i) solubilidad de la droga en el vehículo (27), (ii) interacción de la droga con los excipientes (34) (ii) elección de los mejoradores químicos de la penetración (29), (iv) toxicidad de los excipientes (32, 33) y (v) tiempo de acción de los mejoradores de la penetración (34).

CONCLUSIÓN

A pesar de que la vía de administración epicutánea no ha sido extensamente explotada en medicina veterinaria, sus ventajas potenciales respecto a otras vías de administración son innumerables, entre ellas (i) disminución de las dosis, (ii) evitamiento del efecto de primer pasaje, (iii) posibilidad de administrar drogas sin abrasión de epitelio y, en algunos casos, (iv) fácil manejo de la forma farmacéutica aplicada (posibilidad de controlarla y/o removerla).

La administración epicutánea de drogas representa una vía de administración alternativa más práctica, segura y menos invasiva que las vías convencionales de administración basadas en el uso de agujas. En un futuro, serán posibles los tratamientos continuos con un mayor espectro de drogas, fundamentalmente con aquellos fármacos que requieran de administración endovenosa, intervalos interdosis cortos, así como para drogas con baja biodisponibilidad tras la administración oral o que posean efectos tóxicos cuando son administradas por otras vías. Es importante hacer hincapié en el desarrollo de los inmunoliposomas lo que posibilitará tratamientos más dirigidos e, inclusive, la inmunización segura y efectiva de animales a través de la aplicación epicutánea de antígenos (24, 62).

BIBLIOGRAFIA

1. Menon GK. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002; 54, S3-17.
2. Jimbow K, Le, SK, King MG, Hara H, Chen H, Dakour J, Marusyk H. Melanin pigments and melanosomal proteins as differentiation markers unique to normal and neoplastic melanocytes. *J. Invest Dermatol* 1993; 100: 259-268.

3. Aiba S, Katz SI. Phenotypic and functional characteristics of in vivo-activated Langerhans cells. *Journal of Immunology* 1990; 145: 2791-2796.
4. Tachibana T. The Merkel cell: recent findings and unresolved problems. *Archives of Histology and Cytology* 1995; 58: 379-396.
5. Borradori L, Sonnenberg A. Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J. Invest. Dermatol.* 1999; 112: 411-418.
6. Walters KA, Roberts MS. *The Structure and Function of Skin*, (Ed.) Marcel Dekker (New York), 2002; 1-40.
7. Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur. J. Pharmacol. Sci.* 2001; 14 (2): 101-114.
8. Lampe MA, Burlingame AL, Whitney J, Williams ML, Brown BE, Roitman E, Elias PM. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J. of Lipid Res.* 1983; 24: 120-130.
9. Elias PM, Feingold KR. Coordinate regulation of epidermal differentiation and barrier homeostasis. *Skin Pharmacol.* 2001; 14 (1):28-34.
10. Riviere J, Papich M. Potential and problems of developing transdermal patches for veterinary applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 50: 175-203.
11. Monteiro-Riviere N. Altered epidermal morphology secondary to lidocaine iontophoresis: in vivo and in vitro studies in porcine skin. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1990. 15, 74-85.
12. Kalia YN, Guy RH. Modeling transdermal drug release. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 48 (2-3): 159-72.
13. Ramachandran C, Fleisher D. Transdermal delivery of drugs for the treatment of bone diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000; 42 (3): 197-223.
14. Degim I, Acartürk F, Erdogan E, Lortlar DN. Transdermal administration of Bromocriptine. *Biol. Pharm. Bull.* 2003; 26: 501-505.
15. Dehghanyar P, Mayer BX, Namiranian K, Mascher H, Mueller M, Brunner M. Topical skin penetration of diclofenac alter single -and multiple dose application *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2004; 42 (7): 353-359.
16. Barry BW. Drug delivery routes in skin: a novel approach *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54 (1): 31-40.
17. Akomeah F. and Nazir T. Effect of heat on the percutaneous absorption and skin retention of three model penetrants. *Eur J Pharm Sci.* 2004; 21: 337-345.
18. Platt.D. The role of oral disease -modifying agents glucosamine and Chondroitin Sulphate in the management of equine Degenerative joint disease *Equine Vet. Educ./ AE/* 2001; p. 262-263.
19. Magnusson BM, Walters KA, Roberts, MS. Veterinary drug delivery: potential for skin penetration enhancement. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 50 (3): 205-227.
20. Hotchkiss SA. *Dermal Metabolism*, Ed. Marcel Dekker (New York), 1998; p. 43-101.
21. Caron D, Queille-Roussel C, Shah VP, Schaefer H. Correlation between the drug penetration and the blanching effect of topically applied hydrocortisone creams in human beings. *J Am Acad of Dermatol.* 1990; 23: 458-462.
22. Barry BW. Breaking the Skin Barrier. *The Nature Biotechnology* 2004; 22: 165-167.
23. Cevc G, Schatzlein A, Richardsen H. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1564: 21-30.
24. Higaki K, Nakayama K, Suyama T, Amnuaikit C, Ogawara K, Kimura T. Enhancement of topical delivery of drugs via direct penetration by reducing blood flow rate in skin *Inter. J Pharm.* 2005; 288: 227-233
25. Müller M. Permeation, metabolism and site of action concentration of nicotinic acid derivatives in human skin: Correlation with topical pharmacological effect. *Eur J Pharm Sci.* 2003; 20: 181-185.
26. Guy RH, Hadgraft J. Physicochemical aspects of percutaneous penetration and its enhancement. *Pharmacol Res.* 1988; 5: 753-758.
27. Aungst BJ, Blake JA, Hussain MA. Contributions of drug solubilization, partitioning, barrier disruption, and solvent permeation to the enhancement of skin permeation of various compounds with fatty acids and amines. *Pharmacol Res.* 1990; 7: 712-718.
28. Scheuplein RJ. Mechanism of percutaneous absorption. *J Invest Dermatol.* 1965; 45: 334-346.
29. Karande P, Jain A, Mitragotri S. Discovery of transdermal penetration enhancers by high-throughput screening. *Nature Biotechnology* 2004; 22 (2):192-197.
30. Prausnitz. M.R., Mitragotri, S., Langer, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3 (2):115-24.
31. Mitragotri S. Breaking the skin barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004; 56 (5): 555-556.
32. Kim N, El-Khalili M, Henary ML, Streckowski L, Michniak B. Percutaneous penetration enhancement activity of aromatic S,S-dimethyliminisulfuranes. *Inter. J. Pharm* 1999; 187: 219-229.
33. Chuong CM, Nickoloff B, Elias P. What is the 'true' function of skin? *Exp Dermatol.* 2002; 11: 159-187.
34. Williams AC, and Barry BW. Penetration enhancers. *Adv Drug Del Rev.* 56: 603-618.
35. Mitragotri S, Edwards DA, Blankschtein D, Langer R. A mechanistic study of ultrasonically-enhanced transdermal drug delivery. *J Pharm Sci.* 1995; 84: 697-706.
36. Sintov AC, Krymmerk I, Gavrillov V, Gorodischer R. Transdermal delivery of paracetamol for paediatric use: effects of vehicle formulations on the percutaneous penetration. *J Pharm Pharmacol.* 2003; 55: 911-919.
37. Ponc M. Skin constructs for replacement of skin tissues for *in vitro* testing. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002; 54: 19-30.

38. Mitragotri S, Blankschtein D, Langer R. Transdermal drug delivery using low-frequency sonophoresis. *Pharm. Res.* 1996; 13, 411-420.
39. Banga AK, Bose S, Ghosh TK. Iontophoresis and electroporation: comparisons and contrasts. *Intern J Pharm.* 1999; 179: 1-19.
40. Naik A, Kalia YN, Guy RH. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharm Sci and Tech. Today* 2000; 3: 318-326.
41. Shchekoldin P, Kozlova L, Budkar L. A new method for treating rheumatoid arthritis patients by electrophoresis using mefenamic acid. *Voprosy Kurortologii, Fizioterapii i Lechebnoi Fizicheskoi Kultury* 1993; 4: 17-21.
42. Prausnitz MR, Bose VG, Langer R, Weaver JC. Electroporation of mammalian skin: a mechanism to enhance transdermal drug delivery. *Proc Nat Acad Sci. USA.* 1993; 90, 10504-10508.
43. Monteiro-Riviere NA. *Comparative Anatomy, Physiology, and Biochemistry of Mammalian Skin*, CRC Press, (Boca Raton), 1991; p. 3-72.
44. Prausnitz MR. A practical assessment of transdermal drug delivery by skin electroporation. *Adv Drug Deliv Rev.* 1999; 35, 61-76.
45. Cevc G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004; 56: 675-711.
46. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Rev Drug Discov.* 2005; 4: 145-160.
47. Bonina F, Puglia C, de Caprariis P, Palagiano F, Rimoli M., Saija A. *In vitro* and *in vivo* evaluation of polyoxyethylene esters as dermal prodrugs of ketoprofen, naproxen and diclofenac. *Eur J Pharm Sci.* 2001; 14: 123-134.
48. Jacobi U, Taube H, Schäfer UF, Sterry W, Lademann J. Comparison of four different *in vitro* systems to study the reservoir capacity of the stratum corneum. *J of Control. Rel.* 2005; 103: 61-71.
49. Mukherjee B, Mahapatra S, Gupta R, Patra B, Tiwari A, Arora P. A comparison between povidone-ethylcellulose and povidone-eudragit transdermal dexamethasone matrix patches based on *in vitro* skin permeation. *Eur J Pharm and Biopharm.* 2005; 59 (3): 475-483.
50. Escribano E, Calpena AC, Queralt J, Obachand R, Doménech J. Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. *Eur J Pharm I Sci.* 2003; 19 (4): 203-210.
51. Kreilgaard M. Assessment of cutaneous drug delivery using microdialysis *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54, 99-121.
52. Warner RR, Boissy YL, Lilly NA, McKillop K, Marshall JA, Stone KJ. Water disrupts stratum corneum lipid lamellae: damage is similar to surfactants. *J Invest Dermatol.* 1999; 960-966.
53. van Hal DA, Jeremiasse E, Junginger HE, Spies J, Bouwstra JA. Structure of fully hydrated human stratum corneum: a freeze-fracture electron microscopy study. *J Invest Dermatol.* 1996; 106: 89-95.
54. Nokhodch A, Nazemiyed H, Ghafourian T, Hassan Zadeh D. The effect of glycyrrhizin on the release rate and skin penetration of diclofenac sodium from topical formulations. *Il Farmaco.* 2003; 57 (11):888-895.
55. Feldmann RJ, Maibach HI. Regional variation in percutaneous penetration of ¹⁴C cortisol in man. *J Invest Dermatol* 1967; 48: 181-183.
56. Radermacher J, Jentsch D, Scholl NA, Lustinetz T, Frolich J C.. Diclofenac Concentration in Synovial Fluid and Plasma after Cutaneous Application in Inflammatory and Degenerative Joint Disease. *Br. J. of Clin. Pharm.* 1991; 31 (5): 537-541.
57. Roberts MS, Cross SE, Amissov YG. Factors affecting the formation of a skin reservoir for topically applied solutes *Skin Pharm. and Physiol.* 2004; 17: 3-16.
58. Khramov AN, Stenken JA. Enhanced microdialysis recovery of some tricyclic antidepressants and structurally related drugs by cyclodextrin-mediated transport. *Analyst* 1999; 124: 1027-1033.
59. Flynn, G.L. *Modern pharmaceuticals*. Ed. Marcel Dekker (New York), 1990; p. 263-325.
60. Hadgraf J. *Advances in transdermal drug delivery*. Practitioner. 1996; 240 (1568): 656-658.
61. Potts RO, Guy RH. Predicting skin permeability. *Pharm Res.* 1992; 9: 663-669.
62. Hammond RA, Hannon R, Frean S. Endotoxin induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in equine alveolar macrophages. *Am J Vet Res.* 1999; 60: 426-431.
63. Langer R. Transdermal drug delivery: past progress, current status, and future prospects. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 56 (5): 557-558.

FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA Y CONTROL DE LOS CICLOS ESTRALES EN LA GATA DOMÉSTICA

F Giménez¹, MC Stornelli¹, CA Savignone²,
CM Tittarelli³, RL de la Sota¹, MA Stornelli¹

¹Instituto de Teriogenología, ²Cátedra de Fisiología, ³Cátedra de Histología y Embriología
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Resumen: La gata doméstica es poliéstrica estacional, con ovulación inducida por el coito. Sin embargo, la ovulación espontánea puede ocurrir en algunas hembras. El celo ocurre con un intervalo de 14 a 19 días en aquellas gatas expuestas a un fotoperíodo largo (14 horas luz diarias). El ciclo estral felino se divide en cuatro períodos: proestro, estro, interestro y anestro. Cada etapa presenta ciertas particularidades que diferencian una de otra. Existen diferentes métodos para prevenir tanto la ocurrencia temporal como permanente de los ciclos estrales en la gata doméstica. Si bien en general permiten un adecuado control de la reproducción, la mayoría de ellos presentan efectos colaterales indeseables. En este trabajo se describen las particularidades del ciclo estral felino y se analizan y discuten los diferentes métodos para el control de la reproducción utilizados en la gata doméstica.

Palabras clave: gata, ciclo estral, anticoncepción

REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY AND CONTRACEPTION IN QUEEN

Abstract: The queen is described as a seasonally, polyestrous, with ovulation induced by coitus. Spontaneous ovulation may, however, occur in some queens. Feline estrous cycles occur at 14 to 19 day intervals in queen exposed to a constant daylength (14 hours bright light per day). Stages of the estrous cycle of the queen include proestrus, estrus, interestrous, and anestrus. Each stage has some characteristics that differentiate one from the other. There are different methods to prevent estrus cycles in queen. They can suppress fertility in a permanent or a temporal way. Although they can prevent pregnancy the most have side effects. Reproductive features of the queen likewise prevent pregnancy are reviewed.

Key words: queen, estrous cycle, contraception

Fecha de recepción: 22/02/06

Fecha de aprobación: 04/07/06

Dirección para correspondencia: M.Alejandra Stornelli. Instituto de Teriogenología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Calle 60 y 118. B1900 La Plata. Argentina. 54-221-4236663/4, ext 457ax: +54-221-4257980
E-mail: astornel@fcv.unlp.edu.ar

Fisiología reproductiva

La gata doméstica al igual que otros mamíferos domésticos tales como el equino, cabra y oveja, comparte la particularidad de ser poliéstrica estacional, es decir que ciclará de manera repetida durante una estación reproductiva a menos que el ciclo sea interrumpido por preñez, pseudopreñez o enfermedad (1). Los ciclos estrales felinos ocurren con un intervalo de 14 a 19 días promedio en aquellas hembras que están expuestas a un promedio de 14 horas luz diaria (2). En nuestro hemisferio el período reproductivo de la gata comprende las estaciones de primavera y verano, sin embargo bajo un régimen lumínico artificial de 14 horas de luz diarias ciclan durante todo el año (3). Por el contrario, si las gatas son expuestas a un régimen lumínico diario corto, (8 h luz/diarias), la actividad ovárica cesa y consecuentemente la hembra entra en anestro (4).

La mayoría de las hembras felinas alcanzan la pubertad entre los 6 y 9 meses de edad (5, 6). Esto varía debido a la influencia de varios factores, entre ellos la época del año en que la hembra nace. Se ha informado que aquellas hembras que nacen en invierno comienzan su actividad sexual más tempranamente que aquellas que nacen en verano (7). Por otro lado, la madurez sexual presenta cierta heredabilidad; es así que razas de pelo corto como el Siames o Burmes son más precoces que las razas de pelo largo como la Persa (8). Otro factor a considerar es el peso, ya que las hembras necesitan un peso mínimo de 2,3 a 2,5 kg para llegar a la pubertad (9)

Ciclo estral

El ciclo estral felino se divide en cuatro períodos; proestro, estro, interestro y anestro (10). El proestro, es el período del ciclo estral cuya duración puede ser tan breve (24 h) que pasa inadvertido o durar 1 a 2 días (11). Es el momento de actividad folicular (síntesis y secreción de estrógenos), cambios en la citología vaginal y preparación para el apareamiento y preñez (1). El folículo ovárico desarrolla desde un diámetro aproximado de 0,5 mm a 1,5 mm durante este período (6). Los estrógenos, llegan a concentraciones superiores a 20 pg/ml, siendo los niveles plasmáticos de esta hormona en anestro o interestro inferiores a 15 pg/ml (1). El aumento de las concentraciones séricas de estrógeno se relaciona con el comportamiento afectuoso de la hembra, y las características conductuales (fricciones, pisoteo con los miembros posteriores, vocalizaciones y menor hostilidad hacia el macho) presentes en esta etapa del ciclo estral. En este período si bien la hembra atrae al macho, no permite la monta (11).

El estro es el momento en que la hembra acepta el servicio, y la síntesis y concentración sérica de estrógenos llega a los niveles más altos,

40 a 80 pg/ml (9). La duración promedio de este período es de 6 a 10 días (6). Debido a las altas concentraciones de estrógeno plasmático, la gata aumenta las vocalizaciones, presenta lordosis, mantiene la cola hacia un lado y acepta la cópula (11). Este aumento de estrógeno, no solo produce un cambio del comportamiento, sino que también actúa sobre el epitelio vaginal produciendo la cornificación del mismo (10). En consecuencia, la citología vaginal de la fase folicular (proestro y estro) presentará células superficiales nucleadas y anucleadas. Las células superficiales son grandes, de bordes irregulares, núcleo oval y picnótico o sin núcleo (6).

Una particularidad de las hembras felinas es que la ovulación es inducida por el coito (5). La estimulación vaginal durante la cópula produce un aumento de las señales neurales hacia la zona medio ventral del hipotálamo con la consecuente liberación de GnRH. Esta última estimula la liberación de LH (9). La probabilidad de que ocurra ovulación esta directamente relacionada con la amplitud de la onda de LH, la que a su vez está asociada al número e intervalo entre las cópulas. Se ha informado que muchas cópulas en un breve período de tiempo se correlacionan con mayor probabilidad de ovulación (12). La onda de LH óptima se observa cuando se produce un máximo de apareamientos durante un período de 2 a 4 horas. Un estímulo coital adicional más allá de este período de tiempo puede no incrementar de manera significativa la onda de LH. Los valores de esta hormona van desde 10 ng/ml antes del apareamiento a más de 100 ng/ml después de la estimulación máxima (9).

Se ha observado que 35 % de las hembras felinas pueden presentar ovulación espontánea (11). Esto ocurre en aquellas colonias de gatos en que las hembras están confinadas en el mismo ambiente que los machos, a pesar de que no haya contacto físico ni visual. Esta observación se puede atribuir al efecto de las feromonas tal como en otras especies (5).

En ausencia de apareamiento u ovulación espontánea comienza la etapa llamada interestro, la cual es definida como la etapa que le sigue a un estro y precede al estro siguiente. La duración de este período varía de 8 a 10 días promedio (10). Mediante citología vaginal puede observarse un predominio de células intermedias, células superficiales en menor proporción y ocasionalmente pueden visualizarse neutrófilos. Las células intermedias son más pequeñas que las células superficiales, con contornos celulares regulares y núcleo redondo u oval, el cual puede estar picnótico (6).

Si ocurre ovulación pero los ovocitos no son fertilizados, los folículos se luteinizan y se forman cuerpos lúteos que secretan progesterona. La fase luteal es más corta que la gestación,

y se denomina pseudogestación (5). En esta etapa, la concentración de progesterona sérica llega a niveles de más de 20 ng/ml (13, 14). La vida media de los cuerpos lúteos es de 25 a 35 días y al final de esta fase un período breve de interestro precede al siguiente estro, siempre y cuando las gatas estén en etapa reproductiva (5). En consecuencia la duración del período de pseudogestación es aproximadamente de 40 días (13, 14). En esta fase la citología vaginal presenta las mismas características que la citología de interestro.

Tanto en caninos como en felinos la síntesis de progesterona por parte del cuerpo lúteo es necesaria durante toda la gestación, de esta manera las concentraciones séricas de esta hormona se mantienen estables en valores de 15 a 30 ng/ml, hasta aproximadamente el día 60, momento en que la concentración de progesterona disminuye abruptamente, coincidiendo con el día del parto (5). A diferencia de los cuerpos lúteos de la pseudogestación, los cuerpos lúteos de la gestación pueden mantenerse más allá de 25 días gracias a factores luteotróficos específicos como los de la pituitaria (5).

El anestro es el período caracterizado por la ausencia de ciclos estrales. Esta fase ocurre cuando disminuyen las horas luz con el consiguiente aumento de melatonina y prolactina (15). Las concentraciones séricas de melatonina y prolactina son sincrónicas, se elevan durante los períodos de oscuridad y disminuyen durante los períodos de gran intensidad lumínica (16). Por lo tanto, el anestro felino se caracteriza por niveles elevados de prolactina y melatonina, y niveles basales de estrógeno y progesterona (5). En esta etapa, la citología vaginal presenta contenido mucoso, predominio de células parabasales y una escasa cantidad de células intermedias y leucocitos (17). Las células parabasales se caracterizan por ser redondas, con bordes celulares regulares y poseer una relación núcleo citoplasma disminuida (6).

Estacionalidad reproductiva

Como puede observarse al estudiar el ciclo estral felino, la estacionalidad reproductiva de la gata doméstica está íntimamente relacionada con el fotoperíodo y la concentración de melatonina sérica. Esta última, es una hormona derivada de la serotonina y es sintetizada y secretada principalmente por la glándula pineal. La liberación de melatonina sigue un ritmo circadiano; es liberada en períodos de oscuridad, momento en que se sintetiza (18). Por el contrario, durante períodos de luz al estar inhibida la síntesis no hay secreción de melatonina (18). En el caso de la gata, al ser una especie fotoperíodo positivo, la secuencia de eventos que sigue a un cambio de estación es la siguiente: en verano las noches son cortas

y la duración de la secreción de melatonina es igualmente corta y por lo tanto la concentración de melatonina sérica es baja ($0,53 \pm 0,1$ ng/ml). Como consecuencia de esto, se producen pulsos de GnRH. La liberación pulsátil de GnRH provoca una liberación pulsátil de la gonadotropinas hipofisarias especialmente de la hormona luteinizante, la que produce en la hembra el comienzo del período reproductivo. Por el contrario en invierno, las noches son largas y la duración de la secreción de melatonina durante la noche es igualmente larga y por lo tanto la concentración de melatonina sérica es alta ($8,94 \pm 2,6$ ng/ml). Como consecuencia del cambio en la duración de la liberación de melatonina durante la noche desde el verano al invierno, en esta última estación no ocurren pulsos de GnRH y el eje gonadal hipofisario está quiescente. De esta manera la melatonina regula el estado funcional de las gónadas y controla la capacidad reproductiva de un animal según la estación del año (19).

El completo conocimiento y comprensión de la fisiología reproductiva de la gata así como la función de las hormonas que participan en el ciclo reproductivo felino, son necesarios para realizar una adecuada prevención de los ciclos estrales. La observación de los signos clínicos conductuales y cambios en la imagen citológica vaginal presentes en las distintas fases del ciclo estral permiten caracterizar al mismo así como realizar una aproximación diagnóstica racional. Del mismo modo el conocimiento del mecanismo de acción y función de las hormonas hipofisarias y gonadales, nos permitirá una mejor comprensión de las variaciones hormonales del ciclo estral felino así como de las posibilidades de manejo del mismo.

Control de la reproducción

En la actualidad el control de la reproducción en pequeños animales se puede lograr en forma permanente mediante técnicas quirúrgicas [ovariectomía (OV), ovariectomía (OVH), ligadura tubaria] o bien en forma temporal mediante administración de drogas anticonceptivas (20). La remoción quirúrgica de las gónadas mediante OV u OVH evita la ocurrencia de ciclos estrales, apareamiento, gestaciones indeseadas y comportamiento reproductivo. Si la OV u OVH se realiza antes del primer celo, disminuye significativamente la aparición de tumores mamarios. Si se realiza luego de que han ocurrido uno o más ciclos estrales la incidencia de las afecciones mamarias no varía, sin embargo la implementación de OVH hará posible reducir la incidencia de afecciones uterinas. La OVH y la OV evitan la modificación del comportamiento durante el ciclo estral lo cual puede complicar la relación dueño-mascota (21). Los efectos colaterales indeseables de este método anticonceptivo son infrecuentes e incluyen las

complicaciones directamente relacionadas con la cirugía (reacciones inflamatorias, adherencias, abscesos), el síndrome del ovario remanente y la obesidad. Si los animales son gonadectomizados antes de la pubertad ocurre retardo del cierre de núcleos de crecimiento. Aunque la incontinenia urinaria hipoestrogénica ha sido descrita como una complicación frecuente de la esterilización, su incidencia es baja en felinos (21).

Otra técnica quirúrgica poco utilizada es la ligadura de trompas, pero no controla la aparición de signos externos ni previene enfermedades del tracto reproductivo (22).

Para el control temporal de la reproducción en la hembra felina se han utilizado progestágenos, andrógenos, análogos de la de GnRH y métodos inmunológicos que todavía se encuentran en desarrollo. No obstante, no existe en la actualidad ningún protocolo seguro y reversible para prevenir la ciclicidad sexual en esta especie (20)

Los progestágenos son las drogas usadas más frecuentemente para prevenir o interrumpir el estro en las hembras felinas. El acetato de megestrol es el progestágeno que posee menos efectos colaterales (1). La prevención del estro se logra con la administración de 2,5 mg/gata vía oral una vez por semana o 5 mg/gata vía oral cada 2 semanas por varios meses (23). Para la interrupción del estro está indicado administrar 2,5 mg/gata por dos semanas. Si se suspende la medicación la gata entra en estro nuevamente pocos días o varias semanas después (23).

Acetato de medroxiprogesterona es otro progestágeno utilizado para suprimir el estro. Es efectivo a una dosis de 25 a 100 mg intramuscular (IM) cada 6 a 12 semanas (23). El acetato de megestrol tiene vida media más corta que el acetato de medroxiprogesterona lo cual se relaciona con una menor producción de efectos colaterales indeseables de la primera droga (20). Se han informado numerosos efectos colaterales asociados al uso de estas drogas, entre estos pueden mencionarse: hiperplasia endometrial quística, fibroadenomatosis mamaria y neoplasia mamaria (20). Así mismo hiperglucemia, glucosuria, poli-dipsia, y poliuria pueden ocurrir dentro de las dos semanas de administrado el acetato de megestrol (20). La administración de progesterona se asocia con la estimulación en la secreción de la hormona del crecimiento con signos resultantes de acromegalia y resistencia insulínica en gatas (1). Algunas hembras felinas tratadas con acetato de megestrol han desarrollado diabetes mellitus, que suele ser transitoria y se resuelve cuando se interrumpe la administración del fármaco. Sin embargo el estado diabético es permanente en algunos gatos (1). Se ha demostrado que los gatos que han recibido tratamiento con dosis frecuentes de acetato de megestrol padecen supresión adrenocortical pronunciada sin signos clínicos de

insuficiencia de glucocorticoides (24). A pesar de ser los progestágenos efectivos para la prevención o interrupción del estro no se recomienda su uso debido a sus numerosos efectos colaterales indeseables (25).

La clormadinona, es un progestágeno que ha sido administrado vía oral, vía subcutánea, vía intramuscular y en forma de implante subcutáneo. Se ha informado que una dosis de 2 mg totales, vía oral, 1 vez a la semana ha sido suficiente para prevenir la ocurrencia del estro por 10 a 14 meses sin ningún efecto indeseable, a excepción de aumento de peso solo durante el primer año de tratamiento (26). Sin embargo se demostró que a largo plazo, la administración de clormadinona, se relaciona con la aparición de neoformaciones mamarias, hiperplasia endometrial quística y piómetra (26). A fin de reducir los efectos colaterales indeseables y lograr protocolos seguros para uso clínico se han evaluado diferentes protocolos en los cuales se trabajó disminuyendo la dosis efectiva, alargando el intervalo entre administraciones, o combinando ambas acciones (26).

Deslorelina es un análogo de la GnRH. Actúa por disminución del número de receptores de GnRH en la pituitaria causando supresión de la liberación de la hormona FSH y LH. En todos los casos, el tratamiento en anestro provoca la inducción de proestro debido a la estimulación ovárica producida por la liberación inicial de FSH y LH por el efecto agonista (27). La administración conjunta con progestágenos durante los primeros días previene la aparición de este efecto estimulante inicial (28). El uso de un implante subcutáneo de 6 mg de deslorelina, suprimió la actividad ovárica en hembras felinas. No se han detectado efectos colaterales en las hembras tras su administración; sin embargo la duración de la supresión de ciclos estrales mostró una alta variabilidad individual. Por tal motivo el implante subcutáneo de deslorelina no representaría un método seguro para la prevención de ciclos estrales en la clínica reproductiva diaria (29).

Mibolerona es un esteroide androgénico anabólico, cuyo uso en la gata no ha sido autorizado, pero evita los ciclos estrales en un gran porcentaje de éstas. Ejerce retroalimentación negativa sobre la glándula pituitaria disminuyendo la secreción de hormonas gonadotróficas. Debe administrarse a una dosis de 50 mg vía oral, 1 vez por día, 30 días antes de la ocurrencia del próximo proestro, de lo contrario no suprimirá el próximo estro (20). Entre los efectos colaterales de este andrógeno se ha informado que puede ocasionar agrandamiento del clítoris, y cambios en el comportamiento de la hembra. Se ha prohibido el uso de la mibolerona en gatos debido a su potencial hepatotoxicidad y tirotoxicosis (30).

Se han estudiado métodos inmunológicos

para prevenir gestaciones no deseadas utilizando vacunas para generar anticuerpos contra la zona pelúcida del ovocito (ZP). La ZP es una matriz extracelular de glicoproteínas secretados por los ovocitos durante la foliculogénesis, es importante en la diferenciación de las células foliculares y regula la adhesión y penetración de los espermatozoides (31). Estas glicoproteínas presentan reacción cruzada entre especies (31). Es esperable que tras la aplicación de las vacunas mencionadas anteriormente desarrollen altos títulos de anticuerpos en las hembras felinas, y que estos anticuerpos cubran la superficie de la ZP de los ovocitos ovulados previniendo la fertilización de los mismos por los espermatozoides (20). Spay Vac es una vacuna que incorporó antígenos porcinos de ZP, cuya particularidad es inducir infertilidad por largo tiempo tras una sola aplicación (32). Se han realizado pruebas de campo en ciervos y en focas con buenos resultados. En gatas lo resultados obtenidos no fueron alentadores; a pesar de la presencia prolongada de anticuerpos y alto título de los mismos en sangre, las gatas quedaron preñadas. Estudios inmunohistoquímicos indicaron que los anticuerpos producidos por las gatas tratadas con pZP reconocieron pZP, pero no la zona pelúcida felina fZP. Además estudios previos demostraron que pZP no tenían reacción cruzada con fZP. Se experimentó entonces con animales diferentes al porcino para formular una vacuna anticonceptiva para felinos, entre ellos hurones feZP, perros cZP, ratones mZP y felinos mismos fZP. Los resultados mostraron que estas vacunas, inclusive la formulada a partir de antígenos fZP, producían reacciones inmunogénicas en las hembras felinas, pero los anticuerpos ZP fracasaban en unirse a fZP, por lo que no impedían la fertilidad (32).

Conclusiones

El conocimiento de las diversas hormonas que participan en la reproducción así como las características peculiares del ciclo reproductivo felino son de suma utilidad en la práctica diaria para realizar un adecuado manejo del ciclo estral. Sin embargo, solo algunos investigadores se han abocado al estudio del ciclo estral felino así como de las hormonas que participan en el mismo. En la última década poco ha avanzado el conocimiento en la prevención de ciclos estrales mediante protocolos terapéuticos con escasos efectos colaterales.

Los métodos anticonceptivos hasta ahora utilizados en la práctica veterinaria producen efectos colaterales indeseables, entre ellos problemas reproductivos, patologías endocrinológicas y cambios de comportamiento. Si bien la OV u OVH son métodos cuyos efectos indeseables son de baja incidencia, tienen la desventaja de prevenir la ocurrencia de ciclos estrales de manera irrever-

sible. Sin embargo estudios realizados muestran que sería posible implementar protocolos, para el control de la reproducción en felinos, que posean escasos efectos colaterales indeseables. Algunos de estos protocolos incluirían métodos inmunológicos e implantes subcutáneos de deslorelina aunque se encuentran aún en investigación.

Bibliografía

1. Feldman CE, Nelson RW. Reproducción de gatos. In: Feldman CE, Nelson RW, editores. *Endocrinología y reproducción en perros y gatos*. Segunda edición. México: Mc Graw-Hill Interamericana; 2000. p.806-36.
2. Wildt DE, Guthrie SC, Seager SWJ. Ovarian and cyclicity of the laboratory maintained cat. *Horm Behav* 1978; 10:251-257.
3. Robledo MAM, Carneiro MP, Raratella-Evêncio L, Evêncio-Neto J. Avaliação do fotoperíodo na indução do estro em gatas domésticas. *Rev Bras Reprod Anim* 2003; 27(2): 274-75.
4. Leyva H, Madley T, Stabenfeldt GH. Effect of light manipulation on ovarian activity and melatonin and prolactin secretion in the domestic cat. *J Reprod Fertil Suppl* 1989; 39:125-133.
5. Verstegen JP. Physiology and Endocrinology of Reproduction in female cats. In: Simpson GM, England GCW, Harvey M, editores. *Manual of small animal reproduction and neonatology*. First edition. United Kindom: British Small Animal Veterinary Association ; 1998. p.11-16.
6. Esteve Prats A. Frottis vaginaux chez la chatte. In : Dumon C, Fontobonne A, editores. *Les indispensables de L'animal de compagnie*. First edition. Paris : P.M.C.A.C.; 1992. p.59-65.
7. Tsutsui T, Nakagawa K, Hirano T, Nagakubo K, Shinomiya M, Yamamoto K, Hori T. Breeding season in female cats acclimated under a natural photoperiod and interval until puberty. *J Vet Med Sci* 2004; 66:1129-1132.
8. Povey RC. Reproduction in the pedigree female cat. A survey of breeders. *Can Vet J* 1978; 19:207-213.
9. Verstegen J. Reproducción felina. In: Ettinger SJ, Feldman EC, editores. *Tratado de medicina interna veterinaria*. Quinta edición. Buenos Aires: Inter-Médica; 2002. p.1764-1780.
10. Jhonston SD, Kustritz MVR, Olson PNS. The feline estrous cycle. In: Jhonston SD, Kustritz MVR, Olson PNS, editores. *Canine and feline theriogenology*. First edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001. p.396-405.
11. Jhonson CA. Anormalidades del ciclo estral. In: Nelson RW, Coutto GC, editores. *Medicina interna de animales pequeños*. Segunda edición. Buenos Aires: Inter.-Médica; 2000.p.891-917.
12. Wildt DE, Seager SW, Chakraborty PK. Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat. *Endocrinology* 1980; 107:1212-1217.
13. Wildt DE, Chan SY, Seager SW, Chakraborty PK. Ovarian activity, circulating hormones, and sexual

- behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biol Reprod* 1981; 25:15-28.
14. Schmidt PM, Chakraborty PK, Wildt DE. Ovarian activity, circulating hormones and sexual behavior in the cat. II. Relationships during pregnancy, parturition, lactation and the postpartum estrus *Biol Reprod* 1983; 28:657-671.
15. Banks DR, Stabenfeldt GH. Prolactin in the cat: II Diurnal patterns and photoperiod effects. *Biol Reprod* 1983; 28:933-939.
16. Leyva H, Addiego L, Stabenfeldt G. The effect of different photoperiods on plasma concentrations of melatonin, prolactin, and cortisol in the domestic cat. *Endocrinology* 1984; 115:1729-1736.
17. Colby ED. The estrous cycle and pregnancy. In: Morrow DA, editor. *Current therapy in theriogenology*. First edition. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1980. p. 832-839..
18. Scheer FA, Czeisler CA. Melatonin, sleep, and circadian rhythms. *Sleep Med Rev* 2005; 9:5-9..
19. Vieytes MR. La glándula pineal. In: García Sacristán A, editor. *Fisiología veterinaria*. Primera edición. Nueva York: Interamericana McGraw-Hill; 1995. p.696-706.
20. Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS. Prevention and termination of feline pregnancy. In: Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS, editores. *Canine and feline theriogenology*. First edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001. p.447-452.
21. Verstegen, J. Contracepción y terminación de la gestación. En: Ettinger SJ, Feldman EC, editores. *Tratado de Medicina Interna Veterinaria*. Quinta edición. Buenos Aires: Inter-Médica; 2002. p.1716-23.
22. Wildt DE, Lawler DF. Laparoscopic sterilization of the bitch and queen by uterine horn occlusion. *Am J Vet Res* 1985; 46: 864-869.
23. Verstegen JP. Pharmacological control of Reproduction in the cat. In: Simpson GM, England GCW, Harvey M, editores. *Manual of small animal reproduction and neonatology*. First edition. United Kindom : British Small Animal Veterinary Association ; 1998. p.219-226.
24. Chastain C. Adrenocortical suppression in cats given megestrol acetate. *Am J Vet Res* 1981; 42:20-29.
25. Romantowsky J. Use of megestrol acetate in cats. *JAVMA* 1989; 194:700.
26. Tamada H, Kawate N, Inaba T, Sawada T. Long-term prevention of estrus in the bitch and queen using chlormadinone acetate. *Can Vet J* 2003; 44:416-417.
27. Munson L, Bauman JE, Asa CS, Jochle W, Trigg TE. Efficacy of the GnRH analogue deslorelin for suppression of oestrus cycles in cats. *J Reprod Fertil Suppl* 2001; 57:269-273.
28. Wright PJ, Verstegen JP, Onclin K, Jochle WJ, Armour AF, Martin GB, Trigg TE. The suppression by progestin of oestrus responses of the bitch to the GnRH analogue deslorelin. *J Rprod Fertil* 2001; 57:263-268.
29. Munson L, Bauman JE, Asa CS, Jochle W, Trigg TE. Efficacy of the GnRH analogue deslorelin for suppression of oestrus cycles in cats. *J Reprod Fertil Suppl* 2001; 57:269-273.
30. Shille VM, Sojka NJ. Feline reproduction. In: Ettinger SJ, Feldman EC, editores. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Forth edition. Philadelphia: WB Saunders Co; 1995. p.1690.
31. Dunbar BS, Schwoebel E. Fertility studies for the benefit of animals and human beings: Development of improved sterilization and contraceptive methods. *J Am Vet Med Assoc* 1988; 193:1165-1170.
32. Levy JK, Mansour M, Crawford PC, Pohajdak B, Brown RG. Survey of zona pellucida antigens for immunocontraception of cats. *Theriogenology*. 2005; 63:1334-1341.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

La revista ANALECTA VETERINARIA es una publicación semestral de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Está destinada a la difusión de trabajos científicos en el campo de las Ciencias Veterinarias, generados en esta Unidad Académica y en otras instituciones. Asimismo, reflejará las actividades académicas de postgrado, de extensión y de educación a distancia que se desarrollan en esta Casa de Estudio. El idioma oficial es el español aunque se aceptarán trabajos en inglés que seguirán el mismo esquema detallado más abajo.

ANALECTA VETERINARIA seguirá los "Requerimientos uniformes" para la presentación de manuscritos en revistas biomédicas según la quinta edición de 1997 (*International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirement for manuscript submitted to biomedical Journals*. N Engl J Med 1997; 336:309-15). Puede obtener el original en Inglés en: <http://www.icmje.org/index.html>. Una traducción de estos requerimientos pueden ser recuperada en INTERNET en la dirección electrónica:

<http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta.html>

ANALECTA VETERINARIA puede ser recuperada gratuitamente en INTERNET en formato pdf (Adobe Acrobat Reader®) que permite su impresión tal como aparece en la copia final incluyendo gráficos y tablas. La misma se encuentra en la dirección electrónica <http://www.fcv.unlp.edu.ar>. La revista consta de las siguientes secciones:

I.-Trabajos de investigación, II.-Artículos de revisión, III.-Comunicaciones breves IV-Información institucional y V. Cartas al editor.

Normas generales de redacción

Los manuscritos deberán ser enviados para su publicación al Comité editorial en idioma español o inglés. Deberán enviarse por triplicado en hoja tamaño A4 (210 x 297 mm), numeradas correlativamente y escritas a doble espacio, simple faz, con un margen de 4 cm a la izquierda y no menor de 2 cm en el derecho. Deberá enviarse además una copia en disquete (MS-Word 2000® o Word Perfect 8.0®); dos de las copias no deberán contener el nombre de los autores ni su filiación científica. Los autores deben retener una copia de todo el material enviado inclusive fotografías ya que no se aceptará responsabilidad por daño o pérdida de trabajos.

Las fotografías en blanco y negro podrán ser incluidas en número no mayor a 3 por artículo. Otras inclusiones de fotografías en blanco y negro o en color tendrán un cargo extra y estarán a cargo de los autores. Las versiones electrónica y en CD-ROM de la revista podrán contener fotografías color sin costo para los autores. La inclusión de fotografías color en el material impreso deberá ser expresamente solicitado al editor. El material enviado estará listo para su reproducción, podrán enviarse fotografías o gráficos en formato TIF, CRD, JPG, GIF o BMP. El costo de cada artículo será de \$ 50 hasta 7 hojas (publicadas) y \$ 10 por cada hoja adicional que deberá ser abonado por los autores

indefectiblemente antes de su publicación.

Las unidades de medida se expresarán siguiendo las normas del Sistema Internacional de Unidades. El material enviado será analizado para su publicación por el Comité Editorial, el que lo someterá a consideraciones del referato externo. El Comité Editorial informará al autor del trabajo de las correcciones y/o recomendaciones sugeridas por el evaluador y determinará en función de ello la aceptación o rechazo del mismo. Si hubiere correcciones, las mismas deberán ser efectuadas por los autores en un plazo máximo de 6 meses, caso contrario se considerará el trabajo como "rechazado". Se deja constancia que el hecho de recibir un trabajo no conlleva la obligación de su publicación por parte de ANALECTA VETERINARIA. Una vez aceptado el trabajo se enviará a los autores la "prueba de galera" para su corrección, la que deberá ser devuelta en un plazo no mayor de 15 días. La falta de respuesta luego del plazo estipulado se entenderá como una aceptación de la misma. El envío de un trabajo a ANALECTA VETERINARIA deberá realizarse con el consentimiento de todos los autores. En todos los casos se tomará como fecha de remisión la del timbre postal correspondiente.

La falta de cumplimiento de cualquiera de las normas implica la devolución del trabajo para su adecuación. La Facultad no se hace solidaria con las opiniones vertidas en los trabajos, siendo los autores los únicos responsables. Tampoco se hace responsable ni respalda la publicidad incluida en la revista.

Normas particulares de redacción:

1.Trabajos de investigación:

No deberán exceder de 30 páginas, incluyendo 25 citas bibliográficas. Deberán ser inéditos y estarán organizados de la siguiente manera.

a)Título: será breve, preciso y reflejará el contenido del trabajo. A renglón seguido se indicará el nombre y apellido (s) del autor, acompañados de sus grados académicos más importantes, separando los autores por una coma. A renglón seguido se señalará el nombre de la institución, cátedra o laboratorio a la que pertenece, así como su dirección postal, número de fax, y dirección electrónica si la posee. Cuando haya más de un autor que pertenezca a diferentes instituciones, cátedras o laboratorios, las mismas serán identificadas con un número arábigo superíndice, después del apellido. Agregar un título resumido de un máximo de 40 caracteres (considerar espacios y símbolos como caracteres).

b)Resumen: será redactado en castellano y en inglés (abstract) incluyendo además en este último caso el título en idioma inglés. El resumen deberá sintetizar los objetivos principales del trabajo, la metodología empleada, los resultados más sobresalientes y las conclusiones que se hayan obtenido. No superará tanto en español como en inglés las 200 palabras.

c)Palabras clave: al finalizar el resumen y el "abstract" en renglón aparte, deberán consignarse palabras clave, cinco como máximo, colocándolas bajo el título Palabras clave o "Key Words" según corresponda.

d)Introducción: se señalarán los antecedentes sobre el tema, citando la bibliografía más relevante y especificando clara-

mente los objetivos y el fundamento del trabajo.

e)Materiales y Métodos: toda técnica nueva deberá detallarse para facilitar su comprensión. Se evitará pormenorizar sobre métodos ya experimentados, citándose los materiales utilizados en la realización del trabajo. En los casos en que el diseño experimental requiera una evaluación estadística, se indicará el método empleado.

f)Resultados: se presentarán en forma clara, ordenada y breve.

g)Discusión: incluirá la evaluación y la comparación de los resultados obtenidos con los de otros autores, indicando las referencias bibliográficas correspondientes. Las conclusiones deberán sustentarse en los resultados hallados, evitando todo concepto vago o condicional.

h)Agradecimientos: colaboraciones, ayuda técnica, apoyo financiero, etc. deberán especificarse en agradecimientos. Estas personas deberán conceder su permiso para ser nombradas.

i)Bibliografía: deberá escribirse en hoja aparte ordenada según aparece en el texto y numerada correlativamente con números arábigos, contendrá todas las citas mencionadas en el texto teniendo en cuenta el siguiente formato:

Autores: Apellido, seguido por las iniciales del/los autor/res separados del siguiente autor por coma. Título: completo del trabajo en el idioma en que fue publicado. Nombre de la revista o publicación donde aparece el artículo abreviada de acuerdo al "US National Library of Medicine (NLM)" que usa el *Index Medicus* (<http://www.nlm.nih.gov>). En forma seguida el año de publicación; en forma continuada el número de volumen de la revista, seguido de coma y el número de la revista (si lo posee), dos puntos, seguido del número de páginas de inicio y terminación del trabajo. Ej.

1.Rodríguez-Vivas RI, Domínguez-Alpizar JL. Grupos entomológicos de importancia veterinaria en Yucatán, México. *Rev Biomed* 1998; 9 (1):26-37

En el texto del trabajo hacer referencia mediante números arábigos entre paréntesis.

Si se tratase de trabajos publicados en libros:

Apellido y nombres en forma similar al indicado para revistas periódicas. A continuación el nombre del libro, edición, editorial, ciudad, país entre paréntesis, seguidas del año de publicación y páginas consultadas. Ej.

1.Plonat H. Elementos de Análisis Clínico Veterinario, Ed. Acribia. Zaragoza (España), 1984; p.45-75

Las tablas se presentarán en hojas separadas y con títulos completos ubicados sobre el margen superior y numerados con números arábigos, deberá incluirse además el título en inglés. Los gráficos se presentarán también en hojas separadas pero con títulos explicativos ubicados al pie de los mismos y numerados consecutivamente con números romanos debiéndose incluir además el título en inglés. Las tablas, gráficos o fotos se adjuntarán al final del manuscrito debiéndose indicar en el texto la posición correspondiente "insertar" tabla N° o gráfico N° o foto N°. Las fotografías deberán remitirse con la numeración en el reverso escrito con lápiz (o pegar una etiqueta de papel) de acuerdo a su secuencia en el texto, así como también indicarse el título y el autor del trabajo y cuál es la parte superior de la misma. El tamaño deberá ser de 10 por 15 cm, pudiendo reducirse en la publicación por lo que se sugiere la buena calidad del detalle que se quiera resaltar. Cada foto deberá ser acompañada de una breve reseña explicativa de la misma en español y en inglés.

II. Artículos de revisión

Versarán sobre temas relevantes incluyendo una revisión bibliográfica adecuada y sus autores deberán tener idoneidad en los mismos. Estos artículos incluirán las siguientes secciones: título, título en inglés, resumen, "abstract", texto, agradecimientos y bibliografía. La extensión de estos trabajos no excederán las cincuenta páginas y sesenta citas bibliográficas.

El autor no deberá solamente realizar una recopilación bibliográfica exhaustiva, sino que además deberá hacer una discusión crítica sobre el tema considerado, destacando la trascendencia actual y futura y los puntos sobre los que existan diferencias de opinión.

III. Comunicaciones breves

Esta sección estará destinada a la comunicación de hallazgos preliminares en trabajos de investigación en marcha y a la descripción de nuevas técnicas (de laboratorio, quirúrgicas, de producción), hallazgos clínicos exóticos o poco frecuentes, etc. Su organización deberá seguir el lineamiento general indicado en el Ítem I. No deberán exceder las dos páginas incluyendo no más de 10 citas bibliográficas.

IV. Información institucional

Esta sección será destinada a difundir todas aquellas actividades o informaciones de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata que tengan una relación directa con los objetivos dispuestos para la presente publicación.

V. Cartas al editor

En esta sección se incluirán actualizaciones breves y comentarios sobre artículos ya publicados. Las cartas (hasta 1000 palabras de texto) deberán ser en formato carta y no se dividirán en secciones. Las cartas comenzarán con una introducción breve sobre la relación del tema. Incluir desarrollo de métodos; referencias, en no más de cinco; y figuras o ilustraciones, en no más de dos.

Correspondencia

Toda correspondencia dirigida a esta revista deberá realizarse a la siguiente dirección:

Sr. Director ANALECTA VETERINARIA
CC 296 (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA
TEL/FAX: 0221-4257980
Desde el exterior: +54-221-4257980
E-mail: analecta@fcv.unlp.edu.ar
<http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/analecta.html>