

ISSN 1514-2590

Analecta Veterinaria

Publicación de la Facultad de Ciencias Veterinarias

Volumen 21 n° 1 2001



Universidad Nacional de La Plata

La Plata, Buenos Aires, Argentina



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias

Autoridades

Decano

Méd.Vet. Eduardo Rafael Pons

Vicedecano

Dr. Edgardo Nosetto

Secretario Académico

Dr. Marcelo Peccoraro

Secretario de Postgrado

Dra. Pilar Peral García

Secretario de Extensión Universitaria

Dra. Alicia Antonini

Secretario de Ciencia y Técnica

Dr. Fabiana Landoni

ANALECTA VETERINARIA

Director

Dr. Nestor Oscar Stanchi

Editor Responsable

Dr. Eduardo Marotta

Secretario de Redacción

Méd. Vet. Daniel O. Arias

Comité Editorial

Dra. Liliana Lagrecca

Dr. Eduardo Gimeno

Bact. Carlos Gómez

Dr. Florestán Maliandi (h)

Dr. Pablo E. Martino

Méd.Vet. Enrique Pennimpe

Dra. Pilar Peral García

Dr. Carlos Perfumo

Responsable Versión Electrónica

Méd.Vet. Santiago Corva

Supervisión de Estilo

Méd.Vet. Julio Bernal

Prof. Nora B. Vázquez

ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol. 21 n° 1, 2001

Publicación de la

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Plata

Consultores:

R. Bowden (Argentina). F. Capano (Uruguay), A. Conigliaro (Argentina), L. Estol (Argentina), E. Montero Gei (Costa Rica), A. Parma (Argentina), R. A. Fernández (Argentina), J. Lasta (Argentina), L. Rodríguez Roque (Costa Rica), A. Fernández Alosó (Brasil), H. Tersolo (Argentina), J. Zorzópolos (Argentina), E. Gimeno (Argentina), C. Schenk (Argentina), E. Coppos (Argentina), L.M. Friche Passos (Brasil), J.M. Gutiérrez (Costa Rica), R. Cacchione (Argentina), F. Cortés Benavides (España), M. Carballo (España), R.M. Dauder (España), P. Ostroskywegman (España), J. Surralles Calonge (España), N. Auza (Argentina), M. Barrandeguy (Argentina), M. Carballo (Argentina), J.A. Coppo (Argentina), C. Corbellini (Argentina), F. Costa (Argentina), C. Eddi (Argentina), A. Fosatti (Argentina), E. Gentilini (Argentina), S. Gómez Cabrera (Argentina), C. Gómez Dumm (Argentina), J. González Tomé (Argentina), A. Guglielmone (Argentina), I. von Landzewitsch (Argentina), N. Leardini (Argentina), L. León Vizcaino (España), H. Molinuevo (Argentina), E. Moras (Argentina), S.J. de Oliveira (Brasil). J. Pereira (Argentina), J. Pistani (Argentina), B. Ruksan (Argentina), B. Rutter (Argentina), E. Smitsaart (Argentina), C. Schenk (Argentina), R. de Torres (Argentina), J. Troiano (Argentina), C. Carfangini (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, de extensión y de Educación a Distancia que se desarrollan en esta Casa de Estudio. ANALECTA VETERINARIA está indizada en el Índice Latinoamericano de Revistas Científicas LATINDEX (www.latindex.unam.mx), por el Ulrich's International Periodicals Directory (www.ulrichsweb.com) y por Zoological Records (www.biosis.org.uk/products_services/zrss.html).

ISSN 0365-5148 Versión Impresa; ISSN 1514-2590 Versión Electrónica; ISSN en trámite 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 los autores pertenecen.

Queda prohibida la reproducción total o parcial por cualquier metodología actual o a crearse del material impreso en esta revista sin el consentimiento expreso del Editor. Autorizada la reproducción con fines académicos-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 mediante el protocolo de traslado de archivo (File Transfer Protocol) (FTP anónimo). Los números de la revista a partir del Volumen 18 están disponibles en formato de archivo: pdf (Portable Document File Adobe Acrobat Reader®) siendo idéntica a la versión impresa de la revista y puede 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.

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 Veterinaria (VE)* 1998; 18,1/2: 7-13 (7 pantallas). Recuperable de <http://www.medvet.unlp.edu.ar>

Dirección electrónica:

Puede recuperar la revista accediendo a la página en la **Web**
<http://www.medvet.unlp.edu.ar>

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

Si tiene dificultades para recuperar la revista electrónicamente envíe un mail a:
sgcorva@fcv.medvet.unlp.edu.ar

Impresión

Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata
CC296 (B1900AVW) La Plata,
Buenos Aires, Argentina

Diseño

Dr. Nestor Oscar Stanchi

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

All articles published in ANALECTA VETERINARIA
are submitted to External
Scientific Reviewers



Impreso en papel libre de ácido
Printed in acid-free paper

Impreso en Argentina
Printed in Argentina

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

Artículos de Investigación

Research articles

APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE POLIMORFISMO DE DNA EN LA RESOLUCIÓN DE CASOS DE ABIGEATO, IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL Y DETERMINACIÓN DE PATERNIDAD.

The use of molecular markers for individual identification, paternity test and daily rob cases
Giovambattista G, Ripoli GM, Lirón JP, Kienast ME, Villegas Castagnaso EE, Dulout FN, Peral García P. 5-11

FILOGENIA DE LA POBLACIÓN DE NEURONAS PRODUCTORAS DE HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH) DE LOS VERTEBRADOS

Phylogenetic study of the population of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurons of the vertebrates
Soto A, Zuccolilli G. 12-21

Artículos de Revisión

Review articles

MANEJO ANESTÉSICO DEL PACIENTE EN GESTACIÓN Y PARTO CANINO

Canine Gestation and Parturition Patient Management Anesthetic
Stornelli MC, Stornelli MA. 22-30

ENROFLOXACINA: UNA FLUORQUINOLONA DE USO EXCLUSIVO EN VETERINARIA PARTE I: QUÍMICA, MECANISMO DE ACCIÓN, ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y RESISTENCIA BACTERIANA

Enrofloxacin: A Fluorquinolone of Exclusive Use in Veterinary. Part I: Chemical characteristics, Mechanism of Action, Antimicrobial Activity and Bacterial Resistance
Otero JL, Mestorino N, Errecalde JO. 31-41

ENROFLOXACINA. UNA FLUORQUINOLONA DE USO EXCLUSIVO EN VETERINARIA. PARTE II: FARMACOCINÉTICA Y TOXICIDAD

Enrofloxacin: A Fluorquinolone of Exclusive Use in Veterinary. Part II: Pharmacokinetic and Toxicity.
Otero J, Mestorino N, Errecalde JO 42-49

Comunicaciones breves

Short communications

PERITONITIS BILIAR POR COLELITIASIS CON PERFORACIÓN DE LA VESÍCULA BILIAR EN UN PERRO. PRESENTACIÓN DE UN CASO

Cholelithiasis Gallbladder Perforation, and Bile Peritonitis in a Dog. A case report
Arias D, Klima L, Rodriguez R, Cruz A, Bignon G, Tortora M, Villanueva M, Stanchi N 50-53

EFFECTO DE LAS LLUVIAS SOBRE LA COMPOSICIÓN MINERAL DE GRAMÍNEAS Y LOTUS GLABER MILL DEL PARTIDO DE MAGDALENA

Rainfall Effect on Grass and Lotus Glaber mill. Mineral Composition from Magdalena District
Tittarelli CM, Giuliadori MJ, Mattioli GA, Ramírez CE 54-57

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN FRESCO, REFRIGERADO Y CONGELADO. APLICACIÓN Y DESARROLLO EN CANINOS

Artificial Insemination with Fresh, Chilled and Frozen Semen. Application and Development in Canine. Artificial Insemination in Dogs
Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, De La Sota L. 58-66

APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE POLIMORFISMO DE DNA EN LA RESOLUCIÓN DE CASOS DE ABIGEATO, IDENTIFICACIÓN INDIVIDUAL Y DETERMINACIÓN DE PATERNIDAD.

G. Giovambattista, M.V. Ripoli, J.P. Lirón, M.E. Kienast, E.E Villegas
Castagnaso, F.N. Dulout, P. Peral García

Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA)
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Resumen: La tipificación de los grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos a partir de muestras de sangre y suero sigue siendo el estándar internacional para la certificación de paternidad. En la actualidad, las mencionadas técnicas pueden ser suplementadas con marcadores moleculares de herencia mendeliana codominante, que permiten por primera vez contar con pruebas de inclusión. El objetivo del presente trabajo consistió en resolver casos de identificación individual, paternidad y abigeato, a partir de muestras no convencionales (músculo, cuero, pelos, semen, sangre, riñón y corazón) aplicando marcadores moleculares. El DNA genómico se extrajo mediante una modificación del método descrito por Wagner y col., (1994). Los loci del BoLA y los microsatélites equinos y bovinos se analizaron mediante las técnicas de PCR-RFLP y PCR-geles de secuenciación, respectivamente. En el 95 % de las muestras analizadas se extrajo DNA de calidad periciable, resolviéndose el 86 % de los casos. Los valores obtenidos para el índice «L» variaron desde 1 en 21.762 hasta 1 en 329.025.477 en los casos donde no se pudo realizar la exclusión, lo cual significa que existe una probabilidad entre 21762 y 329025477 de que los genotipos coincidan por azar. En el presente trabajo se demuestra que el análisis de polimorfismos del DNA es una herramienta de utilidad para resolver casos de identificación individual, paternidades y abigeato a partir de muestras no convencionales.

Palabras claves: BoLA, microsatélites, identificación individual, verificación de paternidad, bovinos, equinos.

THE USE OF MOLECULAR MARKERS FOR INDIVIDUAL IDENTIFICATION, PATERNITY TEST AND DAILY ROB CASES

Abstract: Up to date, the international standard for individual identification and paternity test of domestic animals are performing through blood groups and biochemistry polymorphisms of blood samples. However these techniques may be improved by the use of molecular markers. The main characteristics of them are codominant Mendelian heredity and highly polymorphisms. The aim of the present work is to apply molecular markers to resolve individual identification, paternity test and daily rob cases using no conventional samples. These samples included muscular tissue, skin, hair, semen, blood, kidney and heart. Genomic DNA were extracted using the modified method described by Wagner et al., (1994). BoLA and equine and bovine microsatellites loci were typing by PCR-RFLP and PCR-sequencing gel methods. Positive amplification could be obtained in the 95 % of the genomic DNA extracted from the analyzed samples. In addition, the 86 % studied cases could be resolved. In that cases where is not possible of made an exclusion, the "L" index is between 1 in 21762 - 1 in 329025477. It means that is one chance between 21762 - 329025477 that the genotypes are the same by random. In the present paper it is prove that the use of molecular markers is a useful tool to solve cases of individual identity, determination of paternity and daily rob using not common samples.

Key words: BoLA, microsatellites, individual identification, paternity test, bovine, equine.

Fecha de recepción: 05/05/00

Fecha de aprobación: 08/08/01

Dirección para correspondencia: G. Giobambattista. CC 296 (B1900 AVW) La Plata, ARGENTINA.

Tel/Fax N°: 54 221 4211799.

E-mail: ggiovam@fcv.medvet.unlp.edu.ar.

INTRODUCCIÓN

Con anterioridad al desarrollo de las técnicas moleculares, la identificación de un individuo sólo se podía realizar mediante el empleo de tatuajes, caravanas o mediante descripciones fenotípicas. De la misma manera, la determinación de la paternidad debía resolverse de acuerdo al parecido fenotípico entre los supuestos padres y la cría.

A comienzo del siglo XX, Landsteiner (1) abre el camino de la identificación mediante marcadores genéticos, al evidenciar la existencia de polimorfismos en los grupos sanguíneos humanos, ya que no todas las personas poseen el mismo tipo de glóbulos rojos. Así, por primera vez, los individuos se podían agrupar sobre la base de un criterio objetivo y se acuñó el término "marcador genético".

Luego de varias décadas, este criterio se consideró válido para la identificación de animales domésticos (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), incorporándose nuevos tipos de marcadores genéticos, como los polimorfismos proteicos correspondientes al sistema de histocompatibilidad (puesto de manifiesto por reacciones inmunológicas) (9, 10, 11, 12) y los polimorfismos bioquímicos (identificados mediante técnicas electroforéticas) (8, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20).

Estos hitos constituyeron un gran avance para la identificación de animales domésticos, ya que se contaba por primera vez con una batería de marcadores genéticos polimórficos, que cumplía con las características fundamentales para ser utilizada en las pruebas de identificación individual y de verificación de parentesco.

En la década de los ochenta, surgen las técnicas de análisis del DNA. Las mismas permitieron analizar el polimorfismo presente tanto en las secuencias codificantes, como en las no codificantes (por ejemplo minisatélites y microsatélites). En 1985, Jeffreys y col. (21), desarrollaron la metodología denominada "DNA fingerprinting" o huella digital, la que se basa en el análisis de una clase de secuencias repetidas denominadas minisatélites (22, 23, 24, 25, 26, 27).

En 1987, Mullis y Faloona (28) producen un hecho revolucionario al idear la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta metodología consiste en la amplificación *in vitro* de un fragmento de DNA específico utilizando una polimerasa termoestable (*Taq* Polimerasa), permitiendo en forma sencilla el análisis de los polimorfis-

mos presentes en el DNA. Además, presenta las siguientes ventajas en relación a la técnica de fingerprinting: a) no es exigente en cuanto a la calidad y cantidad del DNA utilizado y b) es sencilla, rápida y de alta repetibilidad, pudiéndose analizar simultáneamente un elevado número de muestras.

La PCR ha sido aplicada al estudio de loci altamente polimórficos tales como:

- Los genes de clase I y II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) son los más polimórficos del genoma. Inicialmente, estos loci se tipificaron a través de reacciones inmunológicas. En 1992, van Eijk y colaboradores y van der Poel y colaboradores (29, 30) desarrollaron metodologías basadas en la técnica PCR-RFLP para caracterizar el polimorfismo presente en los loci BoLA-DRB3 y BoLA-DYA, respectivamente.

- Los microsatélites (Short Tandem Repeat, STR) son secuencias constituidas por repeticiones de di, tri o tetranucleótidos (31). En la actualidad, se han informado más de 1200 STR en bovinos (32) y más de 249 microsatélites en equinos (33).

El desarrollo de las metodologías de análisis de DNA, y especialmente la utilización de la técnica PCR para la tipificación de microsatélites, está modificando radicalmente el campo de la identificación individual en humanos y animales domésticos. Es por esta razón y dado el gran número de STR informados, que la Sociedad Internacional de Genética Animal (ISAG) y la Food and Agriculture Organization (FAO) han seleccionado y estandarizado diferentes microsatélites en las distintas especies de animales domésticas (bovinos, equinos, porcinos, caninos, ovinos, caprinos) con el fin de ser empleados para estudios de identificación y para trabajos sobre diversidad genética de razas domésticas (ej: 34, 35). Dichos marcadores han sido empleados en los test de comparación internacional (1996, 1998 y 1999) donde intervienen laboratorios de todo el mundo abocados a realizar la tipificación.

Hasta el momento la tipificación de los grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos a partir de muestras de sangre y suero, sigue siendo el estándar internacional para la certificación de paternidad. Sin embargo, se encuentra disponible una batería de marcadores moleculares altamente polimórficos, con herencia mendeliana simple y alelos de tipo codominantes. La utilización de estos marcadores permite resolver los casos de paternidad discutida con una probabilidad cercana a la unidad. Por lo tanto se puede

contar, por primera vez, con pruebas de inclusión.

La inseminación en vacas se realiza generalmente con pastillas de semen de toros que no se encuentran en el mismo establecimiento. Es por esta razón que no se pueden obtener las muestras de sangre necesarias para realizar la determinación de paternidad mediante los métodos tradicionales de tipificación. Sin embargo, es posible obtener DNA a partir de pastillas de semen y de esta manera resolver la paternidad por técnicas moleculares.

Por otra parte, la sustracción de ganado mayor es un hecho frecuente en la República Argentina. Los animales sustraídos son faenados, dejando restos de los mismos en el lugar del hecho que se pueden emplear como material periciable. A su vez, cuando los sospechosos de cuatrismo son detenidos con la posible carne robada, ésta también se tipificará del mismo modo que las muestras anteriores. Los casos de abigeato se resuelven analizando las muestras obtenidas en ambos sitios y realizando el estudio comparativo mediante las tipificaciones del DNA.

El objetivo del presente trabajo consistió en la aplicación de marcadores moleculares para resolver casos de identificación individual, paternidad y abigeato a partir de muestras no convencionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material analizado: se utilizaron un total de 45 muestras, 29 de tejido muscular, 6 de cuero, 4 de semen, 4 de sangre, 1 de riñón y 1 de corazón. Las muestras de cuero contenían también pelos. Los casos de abigeato fueron remitidas por el Poder Judicial de la Provincia de Buenos Aires.

En las denuncias de abigeato, los restos biológicos (evidencias del robo) se recogieron en el lugar del hecho. Como consecuencia de haber estado al intemperie sufrieron distinto grado de deterioro, ya que inmediatamente después de la muerte comienzan los procesos de autólisis. Esta primera etapa de descomposición de los tejidos es seguida por la acción de microorganismos, hongos y, en un estado más avanzado, por la intervención de insectos y vertebrados. Los factores ambientales (por ejemplo, la humedad y el oxígeno) y biológicos reducen la calidad y cantidad del DNA obtenido durante la extracción (37).

Por lo antes mencionado, se presentaron inconvenientes en la tipificación genética de las

muestras que evidenciaron un estado avanzado de descomposición. Por esta razón, se utilizó el método descrito por Wagner y col., (36) para extraer DNA genómico a partir de carne en descomposición. Por el contrario, la calidad del DNA extraído y la eficiencia de la amplificación mejoraba cuando las muestras habían sido fijadas en alcohol 70 % por el personal policial, ya que los procesos de degradación del DNA pueden interrumpirse por agentes químicos naturales o artificiales.

Extracción del DNA genómico: El DNA genómico se obtuvo a partir de las muestras antes mencionadas mediante el método modificado descrito por Wagner y col., (36). La lisis del material biológico se realizó en un buffer de extracción con el agregado de proteinasa K, luego de la cual se purificaron a través de la técnica de "salting-out" (precipitación diferencial con acetato de sodio amonio). Posteriormente, se realizó la precipitación del DNA con isopropanol. Finalmente, el DNA obtenido fue resuspendido en agua bidestilada.

Marcadores genéticos utilizados: Todos los marcadores se tipificaron mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En bovinos se amplificaron dos loci del BoLA (BoLA-DRB3 y BoLA-DYA) y seis microsatélites (MGTG7, TGLA53, TGLA126, BM2113, SPS115, MS513). En equinos las amplificaciones se realizaron empleando nueve microsatélites (AHT4, AHT5, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, VHL20).

La identificación de las variantes de los genes BoLA-DRB3 y BoLA-DYA se realizó mediante las técnicas de PCR-RFLP y PCR-ACRS descritas por van Eijk y col., (29) y van der Poel y col., (30), respectivamente.

El polimorfismo presente en los microsatélites se tipificó, en base a su peso molecular, mediante la utilización de geles de secuenciación desnaturalizantes y su posterior tinción con nitrato de plata.

Análisis Estadístico: La primera etapa consistió en realizar la exclusión de los animales. En las disputas de paternidad, se descartó al padre alegado de una cría cuando el macho en cuestión no evidenciaba el alelo paterno en alguno de los loci. En el caso que el alelo paterno no pudo ser determinado, la exclusión se realizó cuando el macho y la cría no compartían ningún alelo. En los casos forenses, se realizó la exclusión cuando no existía correspondencia entre los genotipos observados para las muestras encontradas en el lugar

del hecho y las secuestradas a los sospechosos.

En la etapa siguiente se estimó el índice de paternidad (L), que permite calcular la probabilidad que el padre alegado sea el padre biológico, conociendo los genotipos madre-cría-padre. El índice de paternidad para un locus es igual a:

$$(1) \quad L = \frac{1}{2P}$$

siendo P, la frecuencia génica del alelo paterno en la población. Dado que son probabilidades independientes la probabilidad total del índice de paternidad será igual a la multiplicación del aporte de cada locus.

En casos forenses el parámetro L se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$(2) \quad L = \frac{1}{2P_1}$$

siendo P₁ la frecuencia poblacional del genotipo presente en las evidencias.

De la misma manera que en el caso anterior, cuando se analizan varios loci el valor de P es igual a:

$$\tilde{P} = \prod_i \tilde{P}_i$$

La probabilidad de exclusión y el valor del Índice de Paternidad dependen del número de alelos, de sus frecuencias génicas y del número de loci utilizados.

RESULTADOS

En el presente trabajo, se extrajo DNA genómico de calidad periciable a partir de diferentes tipos de muestras biológicas, tales como tejido muscular, cuero, pelos, semen, sangre, riñón y corazón. En el 95 % de las muestras recibidas se obtuvieron amplificaciones positivas tanto para los microsatélites como para los loci del BoLA.

En este estudio se planteó la utilización de marcadores moleculares para resolver tres tipos de situaciones:

I. Identificación de individuos a partir de muestras de semen. Este estudio consistió en identificar, entre tres muestras de semen, cuáles correspondían al mismo reproductor. El análisis de los marcadores genéticos utilizados permitió determinar que las muestras 1 y 3 pertenecían al mismo toro, mientras que la pastilla de semen 2 correspondía a otro individuo (Figura 1).

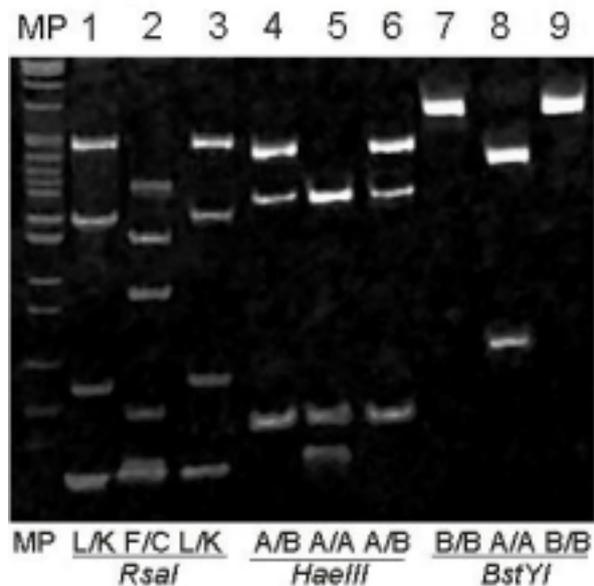


Figura 1. Los productos de amplificación correspondientes al locus BoLA-DRB3 fueron digeridos con las enzimas RsaI, HaeIII y BstYI. Los fragmentos digeridos fueron separados en geles acrilamida/bisacrilamida 6% (19:1) 1x TBE. MP: marcador de peso molecular (PBR322 digerido con MspI); calles 1 - 3: muestras 1, 2 y 3 digeridas con RsaI; calles 4 - 6: muestras 1, 2 y 3 digeridas con HaeIII; calles 7 - 9: muestras 1, 2 y 3 digeridas con BstYI.

Figure 1. BoLA-DRB3 PCR products were digested with RsaI, HaeIII and BstYI restriction enzymes. Restriction fragments were resolved by 6% (19:1) 1x TBE polyacrylamide gel electrophoresis. MP: Molecular Weight Marker (MspI digest of pBR322); lanes 1 - 3: samples 1, 2 and 3 digested with RsaI; lanes 4 - 6: samples 1, 2 and 3 digested with HaeIII; lanes 7 - 9: samples 1, 2 and 3 digested with BstYI.

II. Determinación de paternidad de crías de inseminación artificial.

Es un hecho cada vez más común que se inseminen animales con pastillas de semen. En muchos de estos casos el toro no está disponible o se encuentra en el extranjero. Es por esta razón que no se puede obtener las muestras de sangre necesarias para realizar la prueba de paternidad a partir de los métodos tradicionales: grupos sanguíneos y polimorfismos bioquímicos. Sin embargo, es posible resolver estos casos comparando el patrón de DNA correspondiente a la pastilla de semen del progenitor alegado con los de la cría y la madre.

En la determinación de paternidad que se muestra en la figura 3, la comparación de los genotipos de la madre y la cría permitió determinar el alelo paterno (obligado) para cada locus. Como

dichas variantes se encontraban presentes en los genotipos del padre alegado, este individuo no pudo ser excluido de la paternidad. En base a los resultados obtenidos, se estimó que existía una probabilidad de inclusión de $1,7 \times 10^{-6}$, siendo 1 en 585.277 la posibilidad que el padre sospechado sea el padre biológico.

III Resolución de casos de abigeato. El robo de ganado mayor es un hecho frecuente en la República Argentina. Usualmente, los ladrones faenan los animales en el lugar del hecho y dejan restos de los mismos. Cuando los sospechosos de cuatreroismo son detenidos con la posible carne robada, el material biológico secuestrado en los dos sitios puede ser comparado mediante técnicas de DNA y de esta manera puede resolverse este tipo de casos.

A pesar del deterioro biológico de las muestras, ya mencionado en materiales y métodos, se pudo resolver el 86% de los casos analizados. Como se observa en la figura 2, los genotipos de las evidencias del abigeato obtenidos para un determinado locus coincidieron con los observados

en las muestras de carne secuestradas a los sospechados de hurto. En los casos de abigeato donde no se pudo realizar la exclusión, los valores obtenidos para el índice "L" (estimados según fórmula 2) variaron desde 1 en 21.762 hasta 1 en 329.025.477. Lo cual significa que existe una chance entre 21.762 y 329.025.477 de que los genotipos coincidan por azar.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demuestra que el análisis de polimorfismos del DNA es una herramienta de utilidad para resolver identificación individual, determinación de paternidades y casos de abigeato. Actualmente en la Argentina, las pruebas de identificación individual y las verificaciones de paternidad oficialmente aceptadas se realizan mediante el análisis de polimorfismos bioquímicos y grupos sanguíneos. Los métodos serológicos y de electroforesis de proteínas tienen algunas desventajas insalvables para los casos tratados en el presente trabajo. Dado que el polimorfismo presente en estos marcadores se detecta mediante colorantes, reacciones enzimáticas o inmunológicas, las muestras tienen que ser frescas,

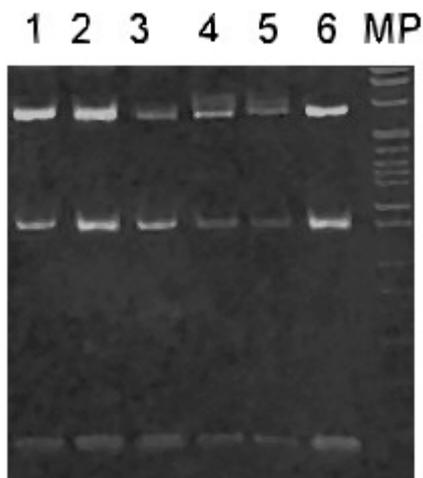


Figura 2. Los productos de amplificación correspondientes al locus BoLA-DRB3 fueron digeridos con la enzima *Rsa*I. Los fragmentos digeridos fueron separados en geles acrilamida/bisacrilamida 6 % (19:1) 1x TBE. Calle 1: animal faenado; calles 2 - 6: muestras biológicas secuestradas al sospechoso. MP: marcador de peso molecular (PBR322 digerido con *Msp*I).

Figure 2. BoLA-DRB3 PCR products were digested with *Rsa*I restriction enzyme. Restriction fragments were resolved by 6% (19:1) 1x TBE polyacrylamide gel electrophoresis. Lane 1: dead animal (reference sample); lanes 2 - 6: evidences collected from the suspected butcher; MP: Molecular Weight Marker (*Msp*I digest of pBR322).

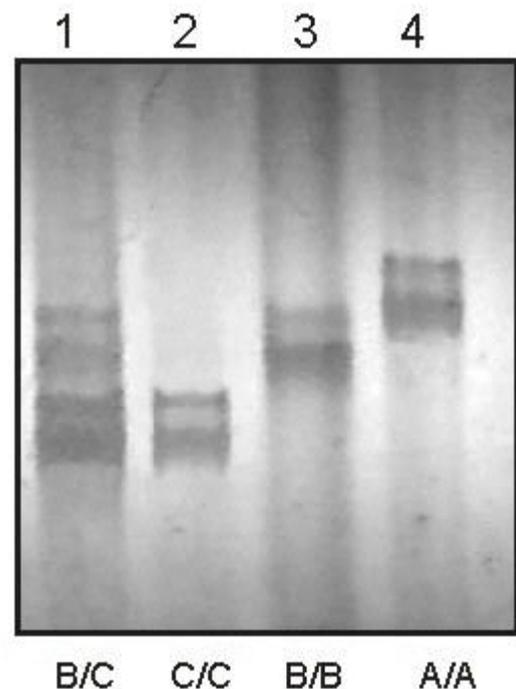


Figura 3. Los productos de amplificación correspondientes al microsatélite D23S5 fueron separados en geles desnaturalizantes de acrilamida/bisacrilamida 5 % (19:1) 1x TBE. Calle 1: vaca; calle: 2: ternero; calles 3 y 4: toros sospechados de la paternidad del ternero.

Figure 3. D23S5 microsatellite PCR products were resolved by 5% (19:1) 1x TBE polyacrylamide denaturing sequencing gel. Lane 1: dam; lane 2: offspring; lanes 3 and 4: putative sires.

ya que las proteínas se deterioran con gran facilidad.

Además, los valores de inclusión obtenidos por marcadores de DNA altamente polimórficos como los microsatélites permiten obtener índices de paternidad del 99,99 %, valor superior a los obtenidos por los métodos tradicionales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Landsteiner K. Ueber heterogentisches Antigen und Hapten. *Biochem Zeitsch.* 1900, 119:294-306.
2. Dujarric de la Rivere R, Kossowiyeh N. Sur les groupes sanguins des chevaux. *CR Seanc Soc Biol.* 1927, 97:373.
3. Ferguson LC. Heritable antigen in the erythrocytes of cattle. *J Immunol.* 1941, 40:213.
4. Stormont C, Irwin R. On the differentiation of fraternal and identical twins in cattle. *Jour An Sc* 1948, 7:516. Abstract.
5. Stormont C, Susuki Y. Genetics systems of blood groups in horses. *Genetics.* 1961, 50:915-929.
6. Stone WH, Irwin M. The J substance of cattle. I. Developmental and immunogenetic studies. *J Immunol.* 1954, 73:397.
7. Podliachouk L. Les antigènes des groupes sanguins des équidés et leurs transmission héréditaire. Thèse Doc Es-Sci, Paris. 1957.
8. Braend M, Rendel J, Gahne B, Adalsteinsson S. Genetic studies on blood groups, transferrins and hemoglobins in Iceland cattle. *Hereditas.* 1962, 48:264.
9. Amorena B, Stone WH. Serologically defined (SD) locus in cattle. *Science.* 1978, 201:159-160.
10. Spooner RL, Leveziel H, Grosclaude F, Oliver RA, Vaiman MJ. Evidence for a possible major histocompatibility complex (BoLA) in cattle. *J Immunogenetics.* 1978, 5: 325-346.
11. Lazary S, Antczak D F, Bailey E, Bell TK, Bernoco D, Byrns G, Mc Clure JJ. Joint report of the First International Workshop on Lymphocyte Alloantigens of the Horses. *Animal Genetics.* 1987, 19:447-456.
12. Alexander L J, Stewart AF, Mackinaly AG, Kapelinskaya KW, Tkach TM, Gorodetsky SI. Isolation and characterization of the bovine k-casein gene. *Eur J Biochem.* 1988, 178:395-401.
13. Smithies O, Hickman CG. Inherited variations in the serum proteins of cattle. *Genetics.* 1959, 43:374.
14. Braend M, Stormont C. Studies on an haemoglobin and transferrin types of horses. *Nord Vet Med.* 1964, 16:31-37.
15. Braend M, Efremov G. Polymorphism of cattle serum albumin. *Nord Vet Med.* 1965, 17:585.
16. Franks D. Horses Blood Groups and Hemolytic diseases of the new born foal. *Ann N Y Acad Sci.* 1962, 97(1):237-250.
17. Podliachouk L, Hessel Holt M. Les groupes sanguins des équidés les sérums de référence. *The Immunogenetic Letter.* 1962, 2:69-71.
18. Samberg K. Blood typing horses: currents status and application to identification problems. *First Word Congress on Genetics Applied to Livestock Production.* 1974, 253-264.
19. Bowling AT, Clark RS. Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horse in the Unites States. *Anim Blood Grps Biochem Genet.* 1985, 16:93-108.
20. Giovambattista G, Peral García P, Kienast ME, Ripoli MV, Dulout FN. Nuevas tendencias en la identificación de animales domésticos. *Agro Sur.* 1997, 25 (1): 106-113.
21. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual specific fingerprints of human DNA. *Nature.* 1985, 316:76-79.
22. Georges MAS, Lequarre M, Castelli R, Hanset G, Vassart G. DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes. *Cytogent. Cell Genet.* 1988, 47:127-131.
23. Georges M, Lathrop M, Hilbert P, Marcotte A, Schwers A, Swillens S, Vassart G, Hanset M. On the use of DNA fingerprints for linkage studies in cattle. *Genomics.* 1990, 6:461-474.
24. Kirby LT. *DNA Fingerprinting.* Stockton press, New York, 375 pp. 1990.
25. Haberfeld A, Cahaner A, Yoffe O, Plotsky Y, Hillel J. DNA fingerprints of farm animals generated by microsatellite and minisatellite DNA probes. *Animal Genetics.* 1991, 22(3):299-306.
26. Dolf G, Glowatzki ML, Gaillard C. DNA fingerprinting in cattle using the probe pV47. *Animal Genetics.* 1992, 23(1):63-70.
27. Mannen H, Tsuji S, Mukai F, Goto N, Ohtagaki S. Genetic similarity using DNA fingerprinting in cattle to determine relationship coefficient. *J of Heredity.* 1993, 84:166-169.
28. Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzimol.* 1987, 155:335-350.
29. Van Eijk MJT, Stewart-Haynes JA, Lewin HA. Extensive polymorphism of BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics* 1992, 23: 483-496.
30. Van der Poel JJ, Groenen MA, Dukhof RJM, Ruyter D, Giphart MJ. The nucleotide sequence of the bovine MHC class II alpha gene: DRA, DQA and DYA. *Immunogenetics.* 1990, 31: 29-36.
31. Ellegreen H. Genome analysis with microsatellite markers. Department of animal breeding y genetics, Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 1993.

32. Kappes SM, Keele JW, Stone RT, McGraw RA, Sonstegard TS, Smith TPL, Lopez-Corrales NL, Beattie CW. A second generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research*. 1997, 7 : 235 - 249.
33. Shieu YL, Bickel LA, Caetano AR, Millon LV, Clark RS, Eggleston ML, Michelmore R, Bailey E, Guérin G, Godard S, Mickelson JR, Valberg SJ, Murray JD, Bowling AT. A sinteny map of the horse genome comprised of 240 microsatellite and RAPD markers. *Animal Genetics*. 1999, 30:1-9.
34. Bates S, Holm T, Van Haeringen H, Lange K, Ziegle J, Heyen D, Da Y, Lewin H. Exclusion probabilities of 22 bovine microsatellites markers in fluorescent multiplexes for automated parentage verification. *Proceeding of the XXV International Society for Animal Genetics*. 1996, 69.
35. Bozzini M, Fantin D, Ziegle J, Van Haeringen H, Jacobs W, Ketchum M, Spencer M y Bates S. Automated equine paternity testing. *Proceeding of the XXV International Society for Animal Genetics*. 1996, 51.
36. Wagner V, Schild TA, Geldermann H. Application of polymorphic DNA sequences to differentiate the origen of decomposed bovine meat. *J Forensic Sci.* 1994, 64: 89-95.
37. Herrmann B, Hummel S. *Ancient DNA*. Springer-Verlag, New York Inc., 263 pp. 1994.

FILOGENIA DE LA POBLACIÓN DE NEURONAS PRODUCTORAS DE HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH) DE LOS VERTEBRADOS

A.T. Soto¹, G. Zuccolilli²

¹Cátedra de Reproducción Animal. Instituto de Teriogenología. ²Cátedra de Anatomía Comparada. Instituto de Anatomía. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Resumen: La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) tiene la función de regular la síntesis y liberación de las hormonas gonadotróficas hipofisiarias, que gobiernan las funciones gonadales de los vertebrados. Si bien la hormona es un decapeptido, hasta el momento, se han aislado y secuenciado nueve formas estructurales diferentes de GnRH en vertebrados. La mayoría de las especies expresan dos o más variantes moleculares de GnRH, siendo "chicken II GnRH" (cII GnRH), una variante presente casi universalmente. El origen y la ruta migratoria de las neuronas GnRH, ha sido descrita en distintos animales y a pesar de la distancia filogenética, aparece muy similar desde los peces hasta los mamíferos. La localización encefálica de esta población neuronal muestra similitudes y diferencias entre los distintos vertebrados y también en los distintos órdenes de mamíferos estudiados. Estas variaciones anatómicas coinciden con mecanismos fisiológicos diferentes y pueden aplicarse para aclarar los cambios evolutivos que influyen en el desarrollo de nuevas estrategias reproductivas.

Palabras Clave: neuronas, GnRH, embrión, migración, encéfalo, vertebrados.

PHYLOGENETIC STUDY OF THE POPULATION OF GONADOTROPHIN-RELEASING HORMONE (GNRH) NEURONS OF THE VERTEBRATES

Abstract: Gonadotrophin releasing hormone (GnRH) is an hypothalamic decapeptide that regulates the reproductive system of vertebrate by stimulation of synthesis and release of pituitary gonadotrophin hormones. Nine molecular variants of this hormone have been isolated and identified from brain extracts of different vertebrate species. Most of them expressed two or more forms of GnRH, and the molecular variant named "chicken II GnRH" (cII GnRH) have been isolated in almost of the species studied. The origin and migration of GnRH neurons have been described strikingly similar in different animals classes, from fishes to mammals. The distribution pattern of GnRH cell bodies has been examined in several species. Although in general the emplacement of GnRH neurons appear similar, most cell bodies being located in the hypothalamus, a considerable interspecies-variation has been reported for the proportion of GnRH neurons in various hypothalamic regions. These anatomical variations were observed in coincidence with modification of the physiological patterns and could be applied to explain the development of dissimilar reproductive behavior by animal species.

Key words: GnRH, embryo, migration, brain, vertebrates.

Fecha de recepción: 08/06/00

Fecha de aprobación: 16/07/01

Dirección para correspondencia: A.Soto, CC 296 (B1900AVW) Cátedra de Reproducción Animal. Instituto de Teriogenología La Plata, ARGENTINA.

E-mail: asoto@fcv.medvet.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es un decapeptido que gobierna la función reproductiva en la mayoría de los vertebrados. Esta hormona, sintetizada por neuronas secretoras ubicadas en el hipotálamo, es liberada en los vasos de la eminencia media para regular la producción y liberación de las hormonas gonadotróficas hipofisarias, folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), responsables de desencadenar los procesos de esteroidogénesis y gametogénesis gonadal. La neurofisiología reproductiva de diversas clases animales muestra una organización similar en lampreas (1), peces (2), anfibios (3), reptiles (4), aves (5, 6) y mamíferos (7), existiendo homologías anatómicas y funcionales, aun cuando cada clase, orden y especie posee estrategias reproductivas derivadas de las variaciones adaptativas al medio donde desarrollan su vida.

Variantes estructurales de GnRH:

La primer forma estructural de GnRH ha sido aislada a partir del hipotálamo de porcinos y ovinos (8, 9), sin embargo, en las últimas tres décadas, la estructura molecular de GnRH ha sido secuenciada en representantes de las siete clases de vertebrados (10). Hasta el presente, han sido demostradas nueve variantes moleculares de GnRH en vertebrados y dos en invertebrados (10, 11, 12, 13). La estructura de la GnRH se encuentra conformada por una cadena de diez aminoácidos y muestra cinco de ellos constantes en las diferentes formas conocidas. El grupo amino terminal (aminoácido 1 y 2), el carboxilo terminal (aminoácido 9 y 10) y el cuarto aminoácido han sido descritos idénticos para las diferentes formas aisladas (10, 11, 12).

En el hipotálamo del pollo han sido encontradas dos variantes de GnRH: chicken I (cGnRH-I) (5, 14, 15) y chicken II (cGnRH-II) (6). En peces teleosteos, a partir de extractos de tejidos cerebrales han sido secuenciadas tres formas moleculares de la hormona, una en el salmón del Pacífico, *Oncorhynchus keta*, (sGnRH) (16), otra en el bagre tailandés, *Clarias macrocephalus* (cfGnRH) (17) y una tercera en *Spaurus aurata* (sbGnRH) (18).

En mamíferos, la estructura de una sola variante de GnRH (mGnRH) ha sido aislada y secuenciada a partir de extractos encefálicos de porcinos, *Sus scrofa* (9), ovinos, *Ovis aries* (8), ratas, *Rattus norvegicus* (19), ratones, *Mus musculus* (20) y humanos, *Homo sapiens* (19, 21).

Las restantes variantes encontradas en ver-

tebrados han sido informadas en extractos cerebrales del tiburón *Squalus acanthias* (sbGnRH) (22) y de la lamprea, *Petromyzon marinus* (hGnRH) (23, 24). Sin embargo, existen evidencias de la presencia de otras variantes de GnRH, en otras especies de vertebrados investigados (25, 26, 27, 28).

Distribución taxonómica de variantes de GnRH en vertebrados:

En la mayoría de los peces se ha demostrado la presencia de dos variantes de GnRH, y sólo en algunas especies de peces ha sido detectada la expresión de tres variantes. La forma molecular cIIIGnRH ha sido reportada como una constante en todas las especies de peces estudiadas (16, 17, 18, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34).

La mayor parte de los anfibios estudiados expresan tres formas de GnRH: cIIIGnRH, mGnRH y una tercer variante con características similares a sGnRH (10, 23, 35, 36). Sin embargo, en reptiles y aves han sido solamente identificadas cIGnRH y cIIIGnRH (5, 6, 14, 15, 31, 37, 38).

En mamíferos marsupiales e insectívoros (25, 26, 39, 40) también se han identificado dos variantes moleculares de GnRH: mGnRH y cIIIGnRH. Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre los demás grupos de mamíferos euterios. A pesar de las evidencias surgidas en estudios preliminares, que indicaban la presencia de dos o más péptidos con actividad liberadora de gonadotropinas en el hipotálamo de ratas y cerdos, estudios realizados combinando cromatografía líquida de alta presión, técnicas inmunológicas y actividad biológica sólo detectaron la presencia de una única variante (mGnRH) en ratas, ovinos y humanos (12, 25). El grupo de roedores histricomorfos mostró características especiales ya que se constató, usando métodos cromatográficos e inmunológicos, la presencia de tres variantes de GnRH. Las formas descritas en el carpincho (*Hydrochaeris hydrochaeris*) correspondieron a sGnRH, cIIIGnRH y mGnRH. (41)

Origen y migración de las neuronas GnRH:

En peces, reptiles, aves, y mamíferos (42, 43, 44, 45, 46, 47, 48), se encuentra documentado que las células precursoras de las neuronas GnRH son detectadas originalmente en la región nasal antes de aparecer en el cerebro. La población de células GnRH, toma origen en la placoda olfatoria y migra durante el desarrollo a lo largo del nervio terminal o nervio olfatorio, hasta alcanzar su localización definitiva en el hipotálamo. Las investi-

gaciones son coincidentes en el sentido que las neuronas GnRH se originan en la placa olfatoria y en el epitelio embrionario de las coanas posteriores, y realizan una migración asociada al nervio terminal (43, 44, 46, 47, 49, 50, 51, 52, 53, 54).

En estudios inmunohistoquímicos realizados en peces (*Oncorhynchus keta*, *Colisa lalia*, *Oreochromis niloticus*), las neuronas GnRH se detectaron en la parte basal de la placoda olfatoria en forma aislada o formando pequeños acúmulos celulares. Después de la eclosión, las células se observaron secuencialmente en el nervio olfatorio y parte rostral del cerebro. En estado juvenil las neuronas GnRH migran siguiendo el nervio terminal, incrementan su número y tamaño, y sus axones se extienden hasta el telencéfalo ventromedial y el hipotálamo (49, 55, 56).

En reptiles (*Anolis carolinensis*), no se observaron neuronas o fibras GnRH en el cerebro anterior. En el cerebro medio, sin embargo, se detectaron cuerpos neuronales a lo largo del borde medial del fascículo longitudinal las que proyectan sus axones hacia los núcleos de los nervios craneales III y IV. En el cerebro posterior, fibras GnRH se detectaron en el área del núcleo vestibular y funículo dorsal (57).

En aves (*Gallus gallus domesticus* y *Melaegris gallopavo*) las neuronas GnRH se evidenciaron sobre el epitelio olfatorio al tercer día del desarrollo embrionario, y comienzan su migración entre los días 3 y 4 (54, 58). La aparición en el telencéfalo se produce a partir de los días 4 y 5, siguiendo una ruta migratoria similar a los otros vertebrados (54, 58). A partir del quinto día del desarrollo del pollo, se detectaron neuronas GnRH en el diencéfalo formando una población de origen extraolfatorio (58). Durante el sexto y séptimo día, cordones de neuronas GnRH se extienden sobre el nervio olfatorio a lo largo del septo nasal para atravesar la porción ventromedial del cerebro anterior. A la edad de 8 días, se pone en evidencia una marcada disminución en el número de células GnRH en el epitelio olfatorio y concomitantemente se incrementa en el área del cerebro anterior. Finalmente, en el día 11 del desarrollo la mayoría de las neuronas GnRH se encontraron en su localización adulta (54, 58).

En dos órdenes de mamíferos, roedores, *Mus musculus* (46, 48, 64), *Rattus norvegicus* (43, 59, 60, 61), *Cavia porcellus* (62, 63), y primates (*Macaca mulatta*) (44, 47, 51), se encuentran estudios que describen el origen y la ruta migratoria del sistema neuronal GnRH.

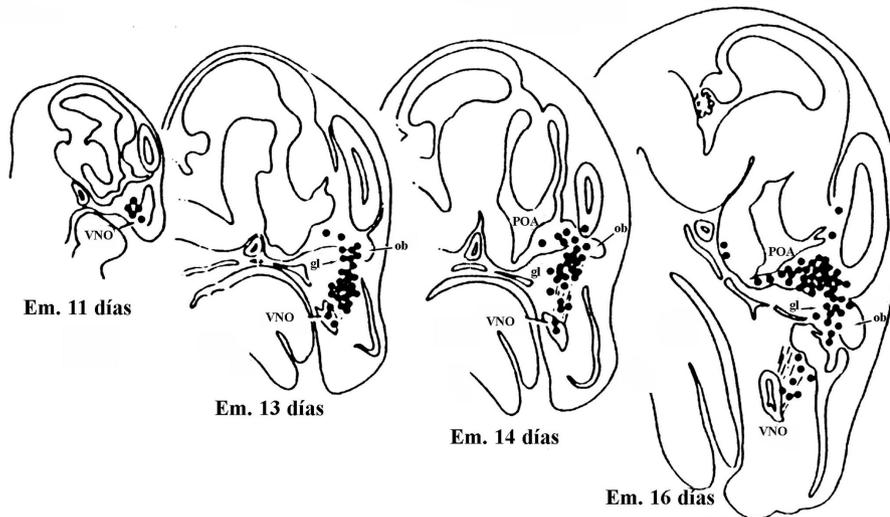


Figura 1: El esquema muestra la ruta migratoria de las neuronas GnRH desde la placa olfatoria en un embrión de ratón de 11 días hasta su localización definitiva en el hipotálamo rostral en un embrión de 16 días. En los estadios intermedios (13 y 14 días) se detalla el recorrido de los cuerpos neuronales (círculos negros) siguiendo los nervios. gl: ganglio terminal; ob: bulbo olfatorio; POA: área preóptica; VNO: órgano vomeronasal. (Adaptado de Shwanzel-Fukuda, M. 1997).

Figure 1. The migratory route GnRH immunoreactive neurons from the medial olfactory placode to the forebrain is shown in drawings in the saggital plane of the whole heads of embryonic mice on days 11,13, 14 and 16. The neuronal bodies are shown with black dots. Abbreviations: gl: ganglion terminale; ob: olfactory bulb; POA: preoptic area; VNO: vomeronasal organ. (From Shwanzel-Fukuda, M. 1997).

En ratones (*Mus musculus*), las neuronas GnRH se encontraron en el día 10-11 de la gestación en la placa olfatoria medial dentro del primordio del órgano vomeronasal (46, 48, 64). En la rata (*Rattus norvegicus*), durante los días 13,5-14,5 se encontraron células migrando desde del órgano vomeronasal y ascendiendo por el nervio terminal, para alcanzar la superficie media de la vesícula prosencefálica (43, 61). Durante el proceso migratorio las células GnRH se observaron en el septum y llegan a su posición definitiva en el área preóptica, en los días 16,5-17,5 (43, 59, 60).

En el cobayo (*Cavia porcellus*), las neuronas GnRH originalmente se visualizaron en la mucosa nasal, entremezcladas con fibras del nervio olfatorio (62, 63) para ser detectadas posteriormente en el recorrido del nervio terminal el día 28 de gestación (63).

En primates (*Macaca mulatta*), se describieron dos poblaciones celulares reactivas a GnRH, ambas tomando origen en la placoda olfatoria, pero constatándose su presencia en diferente momento de la gestación. Estas poblaciones, son diferentes morfológicamente y su distribución encefálica difiere, siendo las neuronas de aparición tardía las que enriquecen la región mediobasal del hipotálamo, mientras que el grupo temprano coloniza el septum, área preóptica, estría terminal, amígdala y claustrum (51).

En embriones humanos de 42 días, las células GnRH se observaron en el epitelio del primordio olfatorio medial, asociadas a los nervios terminal y vomeronasal (47). En fetos de 12-19 semanas, neuronas GnRH se visualizaron formando fascículos nerviosos surgiendo del órgano vomeronasal.

En la migración de las neuronas GnRH durante la etapa embrionaria y fetal se encuentran involucrados factores físicos y químicos que intervienen en la adhesión celular (45). Cuando se produce una interrupción de la migración normal de las neuronas GnRH, por falta o ausencia de los factores de adhesión celular, aparecen graves consecuencias, estudiadas y detalladas en el humano como Síndrome de Kallmann. Este síndrome, también conocido como Displasia olfatorigenital de Morsier, es un desorden genético caracterizado por un defectuoso desarrollo del sistema olfatorio, ausencia de uno o ambos bulbos olfatorios, anosmia, hipogonadismo y ausencia de libido. (44, 45, 53). Los individuos con este síndrome, muestran una ausencia completa de inmunorreactividad a GnRH en el cerebro. Sin embargo, se visualizan fibras reactivas a GnRH en el nervio terminal de la región nasal y en la superficie dorsal de la placa cribiforme. Estos hechos sugieren que el sistema olfatorio, el órgano vomeronasal y los nervios terminales, así como las neuronas GnRH, tienen un desarrollo normal hasta un determinado momento de la gestación (45).

Distribución de la población neuronal GnRH en el encéfalo mamífero:

La morfología y ubicación de las neuronas GnRH en el encéfalo han sido extensamente investigadas, utilizando técnicas inmunohistoquímicas, en diferentes órdenes de mamíferos: roedores tales como cobayo (*Cavia porcellus*) (65), rata (*Rattus norvegicus*) (66) y coipo (*Myocastor coypus*) (67); rumiantes como oveja (*Ovis aries*) (68) y cabra (*Capra hircus*) (69, 70); carnívoros como el hurón (*Galictis cuja*) (71) y primates como babuinos (*Papio ursinus*) (72) y el hombre (*Homo sapiens*) (71). La localización y distribución es similar en

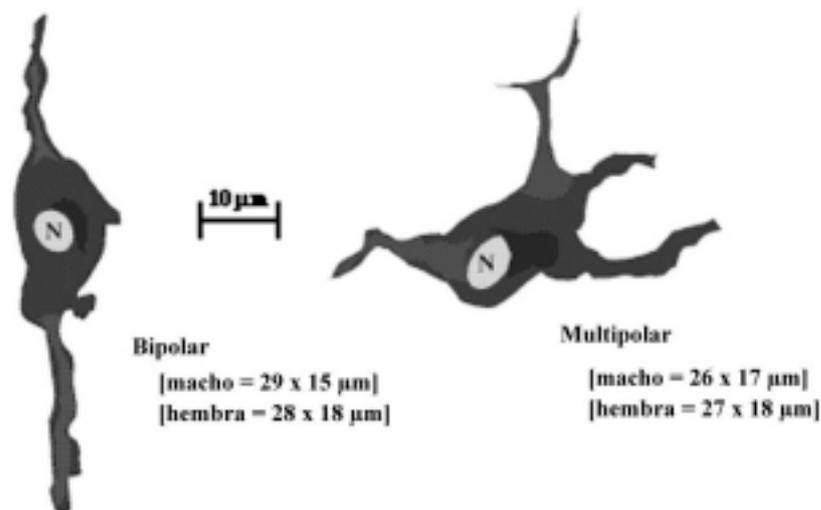


Figura 2. Subtipos morfológicos de neuronas GnRH caracterizados por inmunohistoquímica.
Figure 2. Morphological subtypes of GnRH neurons made evident by immunohistochemistry.

todas las especies citadas, encontrándose la población GnRH en el hipotálamo, aunque existe una considerable variación interespecie en la proporción de neuronas alojadas en las diferentes áreas y núcleos del hipotálamo (73, 74).

En los roedores se localiza el mayor porcentaje de neuronas GnRH en la parte rostral del hipotálamo ocupando principalmente el área preóptica, núcleo medial preóptico, núcleo supraóptico y núcleo supraquiasmático, sin embargo, no se ha comunicado la presencia de cuerpos neuronales en el hipotálamo medio basal.

En los rumiantes los primeros resultados han sido obtenidos utilizando hembras ovinas (75), pero investigaciones posteriores, comparan ambos sexos en caprinos (69, 76) y han demostrado mayor número de neuronas en el macho. La localización del sistema GnRH parece ser similar en los ovinos (*Ovis aries*), sin variaciones entre los

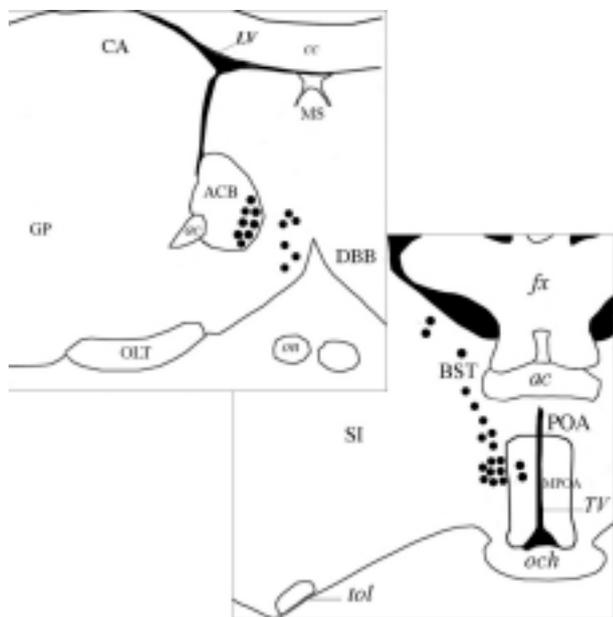


Figura 3: El esquema muestra dos secciones coronales del hipotálamo rostral de un coipo macho adulto. Las neuronas GnRH (círculos negros) se ubican principalmente en el área preóptica (POA) y núcleo de la estría terminal (BST). ac: comisura rostral; fx: fórnix; och: quiasma óptico; tol: tracto olfatorio lateral; GP: globus pallidus; MPOA: núcleo medial preóptico; SI: sustancia innominada; TV: tercer ventrículo.

Figure 3. Schematic coronal sections of the rostral hypothalamus of the adult male coipo showing the GnRH neurons (black dots). The clusters of immunoreactive neurons are mainly located in area preoptic (POA) and bed nucleus of stria terminalis (BST). ac: rostral commissure; fx: fornix; och: optic chiasm; tol: lateral olfactory tract; GP: globus pallidus; MPOA: medial preoptic nucleus; SI: substantia innominata; TV: third ventricle.

sexos (68, 75, 77). El mayor porcentaje de cuerpos neuronales se ubican en el hipotálamo rostral ocupando los núcleos de la estría terminal, supraóptico, medial preóptico y área preóptica. Sin embargo, el 6 % de las neuronas se encontraron en el hipotálamo mediobasal, localizadas en el núcleo arcuato y área hipotalámica anterior. De acuerdo con nuestros estudios en bovinos (*Bos taurus*) (78) no parecen existir diferencias entre los rumiantes poliéstricos estacionales y anuales.

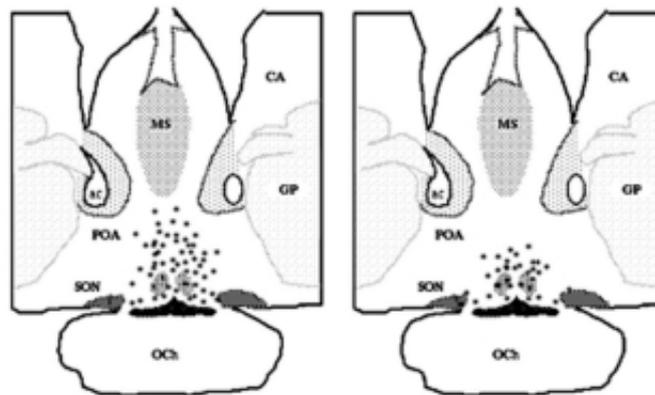


Figura 4. El esquema muestra una sección coronal del hipotálamo rostral en un caprino macho y hembra. Las neuronas GnRH (asteriscos) se ubican en el área preóptica (POA) y núcleo de la estría terminal (BST). ac: comisura rostral; fx: fórnix; och: quiasma óptico; tol: tracto olfatorio lateral; CA: núcleo caudado; GP: globus pallidus; MPOA: núcleo medial preóptico; MS: área septal medial; SI: sustancia innominada; SON: núcleo supraóptico; TV: tercer ventrículo.

Figure 4. Schematic coronal sections of the rostral hypothalamus of the male and female goats showing the GnRH neurons (asterisks). The clusters of immunoreactive neurons are mainly located in area preoptic (POA) and bed nucleus of stria terminalis (BST). ac: rostral commissure; fx: fornix; och: optic chiasm; tol: lateral olfactory tract; CA: caudate nucleus; GP: globus pallidus; MPOA: medial preoptic nucleus; SI: substantia innominata; SON: supraoptic nucleus; TV: third ventricle.

Los datos disponibles para especies de otros órdenes, como hurones (*Galictis cuja*) (71), monos (*Papio ursinus*) (72) y hombre (*Homo sapiens*) (71), han establecido una localización distinta para las mismas neuronas, que se encuentran en el hipotálamo mediobasal especialmente en el núcleo arcuato.

La extensión rostral del sistema GnRH, encontrada en casi todas las especies, representada por axones y escasos cuerpos celulares esparcidos desde el área septal hasta el hipotálamo rostral, podría representar sólo un remanente embriológico de la migración de estos elementos desde la porción olfatoria del embrión (79). Sin

embargo, la proyección caudal del sistema GnRH, representado por las neuronas del núcleo arcuato y los axones que alcanzan el complejo mamilar, podría tener implicancias en la regulación de conductas relacionadas con la reproducción, de acuerdo a las hipótesis postuladas para roedores (60)

se encuentra involucrada en este sector del encéfalo, pues hemos indicado que cIIGnRH es una variante constante y por otro lado, sigue vigente la hipótesis que en los vertebrados, algunas estructuras inmunorreactivas a GnRH podrían tener un origen extraolfactorio.

CONCLUSIONES

El origen de las neuronas GnRH y los signos que presenta la interrupción de su migración en los vertebrados, evidencian la interrelación existente entre el sistema olfatorio y reproductivo. Si bien las experiencias son coincidentes en el origen olfatorio del sistema de neuronas GnRH, queremos enfatizar la íntima conexión que tiene este sistema con la vía olfatoria secundaria, derivada del órgano vomeronasal, donde la GnRH podría actuar como neuromodulador de otras conductas asociadas a la reproductiva. Sin embargo, es necesario establecer qué variante molecular de GnRH

Es conocido que el sistema nervioso central, en su evolución filogenética, incorpora nuevas estructuras sobre las ya existentes, y las áreas nuevas poseen jerárquicamente una función rectora sobre las más primitivas. Sin embargo, en esta revisión no se han encontrado evidencias de que el sistema GnRH se comporte de esta forma. A pesar de demostrarse varias formas moleculares de GnRH, las distintas especies expresan una variante determinada característica de la clase animal a la que pertenecen. Sólo especies postuladas como evolutivamente antiguas son una excepción a este patrón, tal es el caso del carpincho. Por lo

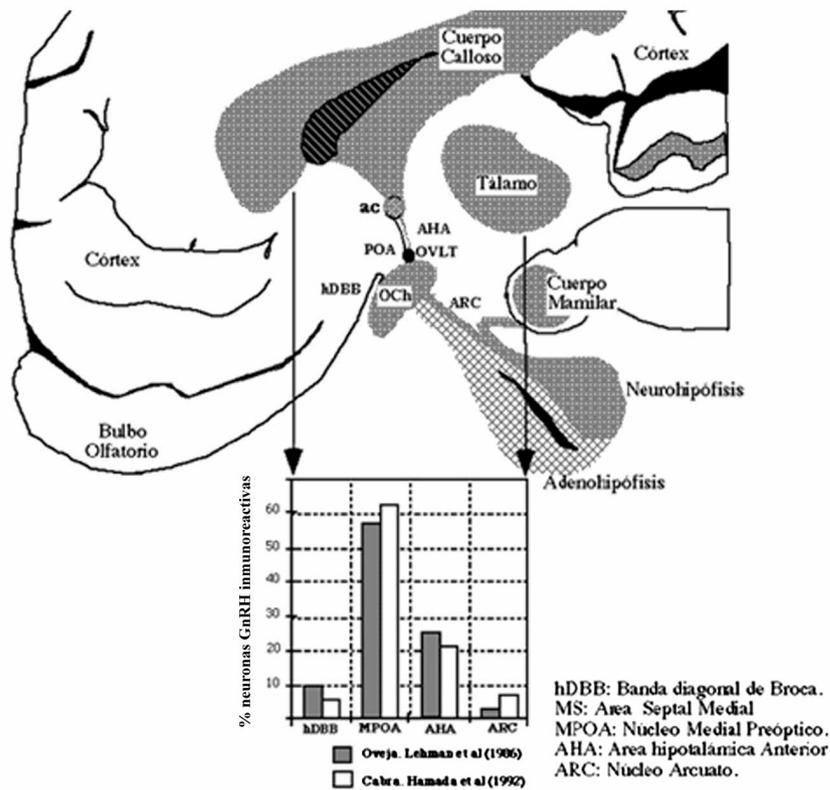


Figura 5. Esquema comparativo de la distribución de las neuronas GnRH, caracterizadas por inmunohistoquímica, en una sección sagital del hipotálamo de hembras rumiantes. En ovinos y caprinos el mayor porcentaje de neuronas GnRH ha sido descrito en el hipotálamo rostral. El MPOA y AHA representan las áreas de mayor concentración, mientras que el ARC en el hipotálamo medio basal, contiene sólo el 6% de las neuronas.

Figure 5. Comparative graphic about GnRH neurons distribution in female domestic ruminants, along the hypothalamus, using immunohistochemistry to identify the population cell. In sheep and goat the majority of GnRH immunoreactive neurons were observed in the rostral hypothalamus. The MPOA and AHA were identified as the main areas containing GnRH cell bodies, and in the mediobasal hypothalamus only a low percentage of scattered neurons was described

tanto, estos estudios se transforman en una línea de investigación que podría cambiar la concepción del proceso evolutivo de algunos circuitos encefálicos.

La mayoría de las clases de vertebrados expresan dos o más formas moleculares de GnRH, siendo cIIIGnRH una variante de presencia constante, aunque de variable concentración en las diferentes clases de vertebrados. Este hecho abre el interrogante sobre si esta última variante cumple una función específica y diferente a la GnRH correspondiente a cada clase. Los trabajos de Montaner, A.D. (1998) nos detallan que no se detecta cIIIGnRH en el hipotálamo del carpincho, único sitio donde se informan cuerpos neuronales en los roedores. Sin embargo, esta variante molecular es abundante en la región olfatoria donde no se han informado neuronas GnRH-ir. Queda sólo la posibilidad de que esta variante esté contenida en fibras de la región olfatoria y proceda de los mismos cuerpos neuronales hipotalámicos, presentando como posible la hipótesis de que cIIIGnRH, es un precursor de las otras formas moleculares o bien coexiste en las mismas neuronas.

En los mamíferos, el grado de desarrollo de los distintos sistemas sensoriales, trae aparejado un cambio en la localización hipotalámica de las neuronas GnRH, y en forma conexas a las diferentes variantes moleculares, concentraciones, y combinaciones respectivas, podrían ser los causales de las diversas conductas y estrategias reproductivas existentes en los diferentes órdenes y especies de mamíferos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sower SA. Effects of lamprey gonadotropin-releasing hormone and analogs on steroidogenesis and spermiation in male sea lampreys. *Fish Physiol. Biochem.* 1989; 7:101-107.
2. Peter RE. Direct neuronal regulation of the teleost adenohypophysis. *J. Exp. Zool.* 1990; Suppl. 4:84-89.
3. Conlon JM, Collin F, Chiang YC, Sower SA, Vaudry H. Two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone from the brain of the frog, *Rana ridibunda*: purification, characterization, and distribution. *Endocrinology* 1993; 132:2117-2120.
4. Licht P, Porter D, Millar RP. Specificity of amphibian and reptilian pituitaries for various forms of gonadotropin-releasing hormones *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1987; 66:248-255.
5. Miyamoto K, Hasegawa Y, Igarashi M, Chino N, Sakakibara S, Kangawa K, Matsuo H. Evidence that chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing

hormone is (Gln⁸)-LH-RH. *Life Sci.* 1983; 32:1341-1347.

6. Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H. Identification of the second gonadotropin releasing hormone in chicken hypothalamus: Evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1984; 81:3874-3878.
7. King JC, Millar RP. Gonadotropin releasing-hormones. En: *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications.* Academic Press. 1991; Vol 4 Part.B 4-31.
8. Burgus R, Butcher M, Amoss M, Ling N, Monahan M, Rivier J, Fellows R, Blackwell R, Vale W, Guillemin R. Primary structure of ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF). *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1972; 69:278-282.
9. Matsuo H, Baba Y, Nair RMG, Arimura A, Schally V. Structure of the porcine LH and FSH-releasing. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1971; 43:1334-1339.
10. Sherwood NM, Von Schalburg K, Lescheid DW. Origin and evolution of GnRH in vertebrates and invertebrates. En: *GnRH Neurons. Gene to Behavior.* Parhar I.S. and Sakuma, Y. (eds). 1997; pp: 3-26.
11. King JC, Millar RP. Comparative aspects of luteinizing hormone-releasing hormone structure and function in vertebrate phylogeny. *Endocrinology* 1980; 106:707-717.
12. King JC, Hassan MF, Mehl AEI, Millar RP. Gonadotropin-Releasing Hormone molecular forms in mammalian hypothalamus. *Endocrinology* 1988; 122(6):2742-2752.
13. King JC, Sower SA, Anthony EIP. Lamprey gonadotropin releasing hormone neurons in the brain of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *Cell. Tissue Res.* 1988; 253:1-8.
14. King JC, Millar RP. Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. I. Structural determination partially purified material. *J. Biol. Chem.* 1982; 257:10722-10728.
15. King JC, Millar RP. Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. II. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 1982; 257:10729-10732.
16. Sherwood NM, Eiden L, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 1983; 80:2794-2798.
17. Ngamvongchon S, Lovejoy DA, Fischer WH, Craig AG, Nahorniak CS, Peter RE, Rivier JE, Sherwood NM. Primary structures of two forms of gonadotropin-releasing hormone, one distinct and one conserved, from catfish brain. *Moll. Cell. Neurosci.* 1992; 3:17-22.
18. Powell JEF, Zohar Y, Elizur A, Park M, Fischer WH, Craig AG, Rivier JE, Lovejoy DA, Sherwood NM. Three

- forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 1994; 91:12081-12085.
19. Adelman J P, Mason AJ, Hayflick JS, Seeburg PH. Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat. Proc Natl Acad Sci (USA). 1986; 83:179-183.
 20. Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, Young III WS, Phillips HS, Nikolis K, Seeburg PH. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the *hpg* mouse. Science 1986; 234:1366-1371.
 21. Seeburg P, Adelman JP. Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. Nature 1984; 311:666-668.
 22. Lovejoy DA, Fischer WH, Ngamvongchon S, Craig AG, Nahorniak CS, Peter RE, Rivier JE, Sherwood NM. Distinct sequence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in dogfish brain provides insight into GnRH evolution. Proc Natl Acad Sci (USA). 1992; 89:6373-6377.
 23. Sherwood NM, Sower SA, Marshak DR, Fraser BA, Brownstein MJ. Primary structure of gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. J. Biol. Chem. 1986; 261:4812-4819.
 24. Sower SA, Chiang YC, Lovas S, Conlon JM. Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. Endocrinology 1993; 132: 1125-1131.
 25. King JC, Millar RP. Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. Cell Mol Neurobiol. 1995; 15:5-23.
 26. King JC, Hinds LA, Mehl AEI, Saunders NR, Millar RP. Chicken GnRH II occurs together with mammalian GnRH in a South American species of marsupial (*Monodelphis domestica*). Peptide 1990; 11:521-525.
 27. Sherwood NM, Parker DB, Mc.Rory JE, Lescheid PW. Molecular evolution of growth hormone-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone. In Fish Physiology. Vol. XIII (ed. By N. M. Sherwood and C. L. Hew). Academic Press, Inc., San Diego, California. 1994; pp.3-66.
 28. Somoza GM, Stefano AV, D'Eramo JL, Canosa LE, Fridman O. Immunoreactive GnRH suggesting a third form of GnRH in addition to cIIGnRH and sGnRH in the brain and pituitary gland of *Prochilodus lineatus* (Characiformes). Gen Comp Endocrinol. 1994; 94:44-52.
 29. Lovejoy DA, King JA, Sherwood NM, Peter RE. Identification of gonadotropin-releasing hormone and associated binding substances in the blood serum of a holocephalan (*Hydrolagus colliei*). Peptides 1993; 14: 1237-1243.
 30. King JC, Millar RP. Multiple molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in teleost fish brain. Peptides 1985; 6:689-694.
 31. Powell JEF, Ciarcia G, Lance V, Millar RP, King JA. Identification of diverse molecular forms of GnRH in reptile brains. Peptides 1986; 7:1101-1108.
 32. Sherwood NM. The GnRH family of peptides. Trends Neurosci. 1987; 10:129-132.
 33. Sherwood NM, Harvey B, Brownstein MJ, Eiden LE. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) in stripe mullet (*Mugil cephalus*), milkfish (*Chanos chanos*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*): comparison with salmon GnRH. Gen Comp Endocrinol. 1984; 55:174-181.
 34. Yu KL, Sherwood NM, Peter RE. Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (*Carassius auratus*) Peptides 1988; 9:625-630.
 35. King JC, Millar RP. Identification of His5, Trp7, Tyr8-GnRH (Chicken GnRH II) in amphibian brain. Peptides 1986; 7:827-834.
 36. King JC, Steneveld AA, Curlewis JD, Rissman EF, Millar RP. Identification of chicken GnRH II in brains of metatherian and early-evolved eutherian species of mammals. Regulatory Peptides 1994; 54:467-477.
 37. Powell JEF, King JA, Millar RP. Trp7, Leu8 LHRH in reptilian brain. Peptides 1985; 6:223-228.
 38. Powell JEF, Jach H, Millar RP, King JA. Identification of Gln8 GnRH and His5, Trp7, Tyr8-GnRH in the hypothalamus and extrahypothalamic brain of the ostrich (*Struthio camelus*). Peptides 1987; 8:185-190.
 39. Dellovade TL, King JA, Millar RP, Rissman EF. Presence and differential distribution of distinct forms of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone in the musk shrew brain. Neuroendocrinology 1993; 58:166-177.
 40. King JC, Mehl AEI, Tyndale-Biscoe CH, Hinds LA, Millar RP. A second form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), with chicken GnRH II like properties, occurs together with mammalian GnRH in marsupial brains. Endocrinology 1989; 125:2244-2252.
 41. Montanerz AD, Somoza G M, King JA, Bianchini JJ, Bolis CG, Affanni JM. Chromatographic and immunological identification of GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) variants. Occurrence of mammalian and salmon-like GnRH in the forebrain of an eutherian mammal: *Hydrochaeris hydrochaeris* (Mammalia, Rodentia). Regulatory Peptides 1998; 73:197-204.
 42. Boehm N, Roos J, Gasser B. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells in the nasal septum of human fetuses. Brain Res Dev. 1994; 82:1-2,175-80.
 43. Daikoku-Ishido H, Okamura Y, Yanaihara N, Daikoku S. Development of the hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone containing neuron system in the rat: in vivo and in transplantation. Dev Biol. 1990; 140(2):374-387.
 44. Parhar I, Pfaff DW, Scwanzel-Fukuda M. Genes and behavior as studied through gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons: comparative and functional aspects. Cell Mol Neurobiol. 1995; 15(1):107-116.

45. Schwanzel-Fukuda M. The origin and migration of LHRH neurons in mammals: a comparison between species including humans. En: GnRH Neurons. Gene to Behavior. Parhar I. S and Sakuma, Y. (eds.). 1997; pp 221-242.
46. Schwanzel-Fukuda M, Abraham S, Crossin KL, Edelman GM, Pfaff DW. Immunocytochemical demonstration of neural cell adhesion molecule (NCAM) along the migration route of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in mice. J Comp Neurol. 1994; 321:1-18.
47. Schwanzel-Fukuda M, Crossin KL, Pfaff DW, Bouloux PMG, Hardelin JP, Petit C. Migration of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neurons in early human embryos. J Comp Neurol. 1996; 366:547-557.
48. Zheng LM, Pfaff DW, Schwanzel-Fukuda M. Electron microscopic identification of luteinizing hormone-releasing hormone-immunoreactive neurons in the medial olfactory placode and basal forebrain of embryonic mice. Neuroscience 1992; 46(2):407-418.
49. Chiba A, Oka S, Honma Y. Ontogenetic development of gonadotropin-releasing hormone-like immunoreactive neurons in the brain of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. Neuroscience letters. 1994; 178:51-54.
50. Chiba A, Oka S, Honma Y. Ontogenetic changes in neuropeptide Y-like-immunoreactivity in the terminal nerve of the chum salmon and cloudy dogfish, with special reference to colocalization with gonadotropin-releasing hormone-immunoreactivity. Neuroscience letters 1996; 213:49-52.
51. Quanbeck C, Sherwood NM, Millar RP, Terasawa E. Two populations of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the forebrain of the rhesus macaque during embryonic development. J Comp Neurol. 1997; 380 (3):293-309.
52. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. The migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons from the medial olfactory placode into the medial basal forebrain. Experientia. 1990; 46 (9):956-962.
53. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Migration of LHRH-immunoreactive neurons from the olfactory placode rationalizes olfacto-hormonal relationships. J Steroid Biochem Mol Biol. 1991; 39 (4B):565-572.
54. Yamamoto, N.; Uchiyama, H.; Ohki-Hamazaki, H.; Tanaka, H.; Ito, H. Migration of GnRH-immunoreactive neurons from the olfactory placode to the brain: a study using avian embryonic chimeras. D. Brain Research 1996; 95:234-244.
55. Maejima K, Oka Y, Park MK, Kawashima S. Immunohistochemical double-labeling study of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-immunoreactive cells and oxytocin-immunoreactive cells in the preoptic area of the dwarf gourami, *Colisa lalia*. Neurosci Res. 1994; 20(2):189-193.
56. Yamamoto N, Parhar IS, Sakuma Y, Ito H. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) innervation of the pituitary in a cichlid fish, *Oreochromis niloticus*: a brain lesion study. Kaibogaku Zasshi 1998; 73(1):55-57.
57. Rosen G, Sherwood N, King JA. Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (GnRHir) is associated with vestibular structures in the green anole (*Anolis carolinensis*) Brain Behav Evol. 1997; 50:3, 129-38.
58. Arai Y, Murakami S, Seki T, Miyakawa M, Kamiya M. Origin and migration of GnRH neurons in the chick embryo: an experimental study. En: GnRH Neurons. Gene to Behavior. Parhar I. S, Sakuma, Y.(eds) 1997; pp: 181-195.
59. Schwanzel-Fukuda M, Morrell JI, Pfaff DW. Ontogenesis of neurons producing luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the nervus trigeminalis of the rat. J Comp Neurol. 1985; 238:3, 348-64.
60. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. Nature 1989; 338 (6211):161-164.
61. Yoshida K, Tobet SA, Crandall JE, Jimenez TP, Schwarting GA. The migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the developing rat is associated with a transient, caudal projection of the vomeronasal nerve. J Neurosci. 1995; 15:7769-77.
62. Schwanzel-Fukuda M, Silverman AJ. The nervus terminalis of the guinea pig: a new luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neuronal system. J Comp Neurol. 1980; 191(2):213-225.
63. Schwanzel-Fukuda M, Robinson JA, Silverman AJ. The fetal development of the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neuronal systems of the guinea pig brain. Brain Res Bull. 1981; 7(3):293-315.
64. Schwanzel-Fukuda M, Reinhard GR, Abraham S, Crossin KL, Edelman GM, Pfaff DW. Antibody to neuronal cell adhesion molecule can disrupt the migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons into the mouse brain. J Comp Neurol. 1994; 342(2):174-185.
65. Barry J, Dubois MP, Poulain P. LRF producing cell of the mammalian hypothalamus. Z Zellforsch Mikrosk Anat. 1973; 146:351-366.
66. Kawano, M.; Daikoku, S. Immunohistochemical demonstration of LHRH neurons and their pathways in the rat hypothalamus. Neuroendocrinology 1981; 32:179-186.
67. Silva L, Sanchez H, Acosta W, Portiansky E, Zuccolilli G. GnRH neurons population in the diencephalon of the coypu (*Myocastor coypus*). Revista Chilena de Anatomía. 1999; Aceptado para su publicación.
68. Caldani M, Batailler M, Thiery JC, Dubois MP. LHRH immunoreactive structures in the sheep brain. Histochemistry 1988; 89:129-139.
69. Hamada T. Immunohistochemical study on gonadotropin-releasing hormone neurons in the Shiba goat brain. J Reprod Dev. 1992; 38:133-142.

70. Zuccolilli G, Hamada T, Ichikawa M, Mori M. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron in the forebrain of male Shiba goat. *J Reprod and Dev.* 1994; 40:19-25.
71. King JC, Anthony EIP. LHRH Neurons and Their Projections in Humans and other Mammals: Species comparisons. *Peptides* 1984; 5 suppl. 1: 195-207.
72. Marshall PE, Goldsmith PC. Neurosecretory and neuroendocrine GnRH pathways in the hypothalamus and forebrain in baboon. *Brain Res.* 1980; 193:353-372.
73. Muske LE. Evolution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems. *Brain Behav. Evol.* 1993; 42:215-230.
74. Nozaki M, Tsukahara T, Kobayashi H. Neuronal system producing LHRH in vertebrates". In *Endocrine correlates of reproduction*. Ochiai and al. (eds) Japan Scientific Societies Press. Springer, Tokyo. 1984; 3-27.
75. Polkowska, J. Immunohistochemistry of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) and gonadotrophic hormones in the sheep after deafferentation of the hypothalamus. *Cell. Tissue Res.* 1981; 220:637-649.
76. Zuccolilli G, Hamada T, Ichikawa M, Mori M. Sexual dimorphism of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron in the goat hypothalamus. *J Reprod Dev.* 1994; 40:27-32.
77. Dees, W.L. Immunohistochemical localization of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in the brain and infundibulum of the sheep. *Cell Tissue Res.* 1981; 215:181-191.
78. Soto A, Zuccolilli G. GnRH neurones population in the diencephalon of the bovine (*Bos taurus*). *Inédito*.
79. Ronnekleiv OK, Resko JA. Ontogeny of gonadotropin-releasing hormone-containing neurons in early fetal development of Rhesus Macaques. *Endocrinology* 1990; 126 (1):498-511.

MANEJO ANESTÉSICO DEL PACIENTE CANINO EN LA GESTACIÓN Y EL PARTO

M.C. Stornelli, M.A. Stornelli

Cátedra de Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

RESUMEN: *En la elección del protocolo anestésico de la hembra preñada, deben considerarse las modificaciones fisiológicas que se producen para permitir la adaptación de la perra al estado gestacional. Situaciones tales como estrés e hipotensión materna producirán efectos nocivos sobre los fetos. Es también necesario tener en cuenta la transferencia transplacentaria de fármacos y los efectos que pueden causar sobre los nonatos. Se debe realizar una adecuada analgesia a la madre, sin producir excesiva profundidad anestésica. La elección de drogas con escasa transferencia transplacentaria y mínima acción deletérea sobre los fetos permitirán el rápido regreso de la madre y los recién nacidos a su ambiente habitual. El análisis minucioso del estado clínico de la madre y los fetos; junto con el estudio de las ventajas y desventajas en la elección de una técnica anestésica general o epidural y una adecuada selección de drogas, posibilitarán altos índices de supervivencia materna y fetal.*

PALABRAS CLAVES: canino, cesárea, anestesia

Canine gestation and parturition patient management anesthetic

ABSTRACT: *In the pregnancy bitch anesthetic protocol choice, must take into account physiologic changes to permit female adaptation. Stress and maternal hypotension will be dangerous for fetus. Placental drug transference may be toxic for unborn. Good analgesia with minimal anesthetic profundity must made. Drug election with minimal placental transference and fetus toxicity permit quickly return of dam and puppy to those environment. Careful bitch and puppy examination and optimal anesthesia technique choice increase maternal and fetal survival.*

KEY WORDS: bitch, cesarean, anesthesia.

Fecha de recepción: 27/09/00

Fecha de aprobación: 12/07/01

Dirección para correspondencia: A.Stornelli, Cátedra de Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata, Argentina.
E-mail: astornel@fcv.medvet.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La hembra preñada sufre una serie de modificaciones fisiológicas que permiten adaptar las funciones orgánicas al estado gestacional. En muchas ocasiones la gestación no termina en un parto eutócico y debe resolverse mediante un procedimiento quirúrgico. Si bien la cesárea puede ser una cirugía programada, muchas veces es un procedimiento de emergencia en el cual la madre y el feto no se encuentran en condiciones físicas óptimas (1).

El protocolo anestésico debe proveer: amplia analgesia, adecuada relajación muscular, sedación o narcosis, mínima depresión de la madre y del feto, y un rápido retorno de la madre y del recién nacido a su ambiente habitual (2, 3). Por lo tanto la elección de un protocolo anestésico debe basarse en la comprensión de:

A) Las modificaciones fisiológicas relacionadas con la gestación y el parto.

B) La farmacocinética y farmacodinamia de las drogas en la hembra gestante.

C) Los efectos de las drogas sobre el feto en forma directa (al atravesar la placenta) o indirecta (al afectar la función cardiorrespiratoria de la madre) (4).

D) La ventajas y desventajas de la técnica anestésica elegida (4).

Si bien, no siempre se logra implementar un protocolo anestésico ideal, conocer las necesidades anestésicas del paciente y elegir un protocolo adecuado a las mismas, posibilita una mayor probabilidad de éxito para la supervivencia de la madre y los cachorros.

Modificaciones fisiológicas relacionadas con la gestación y el parto

Sistema respiratorio:

La hembra en gestación y parto, como consecuencia de los cambios fisiológicos ocurridos en el sistema respiratorio, es extremadamente sensible a la hipoxia al ser sometida a un procedimiento anestésico, siendo la inducción el período más crítico.

La concentración de progesterona en sangre determina un incremento de la sensibilidad del centro respiratorio a la presión arterial de dióxido de carbono (Pa CO_2), por esto aumenta el volumen minuto de la ventilación y disminuye la Pa CO_2 . Sin embargo la alcalosis respiratoria que se produce no altera el pH arterial debido a la com-

pensación renal. El aumento de la ventilación durante el parto se relaciona con el dolor, la ansiedad y el miedo (5). También con relación a este factor hormonal aumenta de conductancia de la vía aérea y disminuye la resistencia pulmonar, como resultado de la relajación del músculo liso bronquial (6).

El consumo de oxígeno aumenta un 20%, debido al desarrollo de la placenta, feto, músculos uterinos y tejidos mamarios (6). Conjuntamente, el desplazamiento hacia craneal del diafragma y los órganos abdominales por el útero grávido disminuye la capacidad residual funcional (CFR) y el volumen pulmonar total (7).

Como consecuencia de estos cambios es necesario administrar oxígeno para desnitrógeno el pulmón, (4 a 6 litros por minuto si se usa máscara). La inducción anestésica debe ser rápida y suave. La intubación inmediata permitirá asistir la respiración y asegurar una adecuada oxigenación.

Debido al aumento de la ventilación y disminución de la CFR, en la hembra preñada se logra más rápido el equilibrio entre la presión parcial del anestésico inspirado y alveolar. Esto aumenta la velocidad de inducción con agentes inhalados y disminuye la concentración alveolar mínima (CAM) de los mismos. El riesgo de sobreañestesia de la hembra puede ocurrir con más facilidad en este estado fisiológico (8).

Sistema cardiovascular

Las modificaciones fisiológicas que ocurren en el sistema cardiovascular permiten lograr un adecuado aporte sanguíneo tanto en la madre como en el feto. Estas modificaciones se logran mediante el aumento del gasto cardíaco debido a la disminución de la resistencia vascular periférica por acción estrogénica (9, 10). El aumento del volumen sanguíneo (en un 40 %) provee un adecuado flujo sanguíneo a los fetos. La madre presenta anemia relativa por aumento del volumen plasmático en mayor grado que el volumen de células rojas, esto produce disminución del hematocrito y la concentración de hemoglobina, pero el aporte de oxígeno no se encuentra comprometido (5).

La aparición de los reflejos cardiovasculares compensatorios como respuesta a pérdidas sanguíneas e hipovolemia se encuentra retardada. (5). La hipotensión producida por la depresión anestésica, la pérdida de fluidos intra operatoria, o el aumento de la resistencia vascular por hiperventilación, dolor, miedo, excitación o shock, dis-

minuirán el flujo sanguíneo uterino y afectarán adversamente al feto. En la mujer la hipotensión también puede ocurrir debido a compresión aortocava por el feto, por lo cual la posición dorso-ventral debe evitarse, por el contrario en las perras esta postura no causa más hipotensión que la posición lateral (11, 9). A causa de la disminución de la reserva cardíaca en la preñez y parto, puede ocurrir descompensación en pacientes con enfermedad cardíaca compensada

Todas estas modificaciones justifican realizar un agresivo soporte cardiovascular como parte integral del protocolo anestésico. La hipotensión será tratada inmediatamente por la administración de fluidos. En los casos refractarios se utilizará efedrina o dopamina, siendo de elección la primera. Sin embargo estas drogas pueden disminuir el flujo sanguíneo uterino por lo que su uso se reserva solo para aquellos casos en los que peligra la vida de la madre.

En la premedicación es beneficiosa la utilización de analgésicos y la aplicación de tranquilizantes a aquellos pacientes extremadamente ansiosos o agresivos, ya que disminuyen la respuesta al stress y evitan la liberación de catecolaminas y cortisol que causarán vasoconstricción uterina y aumento de la resistencia vascular.

El uso de agentes ecbólicos durante y después del parto afectará adversamente la función cardiovascular si no son utilizados adecuadamente. La oxitocina en grandes dosis o dosis repetidas induce vasodilatación periférica e hipotensión lo cual puede ser nocivo para la madre y el feto por la disminución de la perfusión tisular (12).

Alteraciones del flujo sanguíneo uterino

El flujo sanguíneo uterino es directamente proporcional a la presión de perfusión e inversamente proporcional a la resistencia vascular. La resistencia vascular uterina está aumentada indirectamente por las contracciones uterinas y la hipertoniá (respuesta oxitócica). La anestesia puede disminuir el flujo sanguíneo uterino y la viabilidad fetal al producir hipotensión inducida por hipovolemia, depresión cardiovascular y bloqueo simpático (7).

Sistema gastrointestinal

Los cambios que ocurren en este sistema, durante la preñez, aumentan los riesgos de regurgitación y falsa vía. Los mismos se relacionan con las modificaciones anatómicas y fisiológicas

que sufren los órganos digestivos (7).

El desplazamiento hacia craneal del estómago por el útero grávido, produce disminución de la motilidad gástrica; conjuntamente el nivel de progesterona sérica conduce a un retardo en el vaciado gástrico. El tono del esfínter gastro-esofágico se encuentra disminuido mientras que la presión intra gástrica aumenta. Por otro lado, se produce aumento de la concentración de ácido clorhídrico y enzimas en las secreciones gástricas, junto con disminución del tono muscular (13).

Como resultado de la función gástrica alterada, el riesgo de falsa vía es mayor en la hembra preñada. La incidencia de vómito también puede estar aumentada por la hipotensión y la hipoxia. (14, 15, 16). Es así que pueden administrarse en la premedicación fármacos para contrarrestar el aumento de la acidez y la disminución del tono muscular gástrico (metoclopramida y cimetidina) (18).

Fisiología placentaria

La circulación placentaria relaciona a la madre con el feto, por lo tanto el mismo está expuesto a todos los fármacos que recibe la madre. La placenta mantiene la homeostasis fetal al actuar como pulmón, intestino, hígado y riñón favoreciendo así el desarrollo y crecimiento del feto. Posee también un importante rol endócrino que se relaciona con los cambios fisiológicos observados en la hembra preñada y que van a modificar la farmacocinética y farmacodinamia de las drogas administradas (19). Las drogas anestésicas, analgésicas y perianestésicas pueden deprimir al neonato disminuyendo la posibilidad de adaptación del mismo a la vida extrauterina (20). Las drogas con alto índice de liposolubilidad, bajo grado de ionización, escasa unión a proteínas plasmáticas y bajo peso molecular pasarán fácilmente la barrera placentaria. Los fármacos insolubles en lípidos atraviesan pobremente la placenta, independientemente de su grado de ionización (4).

Efecto de las drogas utilizadas en los protocolos anestésicos y su interrelación con los cambios fisiológicos en la hembra gestante

Debido a la necesidad de evitar depresión materna y fetal, y maximizar el vigor y viabilidad del feto es necesario realizar una adecuada elección de las drogas que utilizaremos en el protocolo anestésico basándose en la fisiología de la hembra preñada, de la placenta y del feto (20). Puede lograrse mínima o ninguna acción deletérea so-

bre el recién nacido mediante el uso racional de los fármacos administrados a la hembra preñada en pre-parto inmediato y parto.

Drogas que disminuyen la excitabilidad:

Los tranquilizantes son drogas que producen sedación y/o tranquilización (fenotiazinas, benzodiacepinas, agonistas α_2). Estos atraviesan rápidamente la placenta con la consiguiente depresión neonatal (13), pudiéndose encontrar en sangre fetal dos minutos después de la administración endovenosa (15).

Fenotiacinas:

Estas drogas además de ser antagonistas dopaminérgicos, poseen acción bloqueante a adrenérgica y son depresores del sistema nervioso central. En relación con sus efectos colaterales inducen vasodilatación, hipotensión, depresión respiratoria y disminución de la habilidad para regular la temperatura corporal. La hipotensión puede agravarse por la pérdida de sangre y fluidos durante la cesárea (7). Sus efectos se prolongarán varias horas, luego del acto quirúrgico, ya que la duración de su acción es de 6-8 h.

Estas drogas tienen muy pocas indicaciones en la rutina anestésica de la parturienta, su uso se reservará, a dosis bajas, para aquellas hembras extremadamente miedosas o excitadas, solo para calmar al paciente sin producir depresión generalizada (13). La fenotiacina más comúnmente utilizada en pequeños animales es la acepromacina

Benzodiacepinas: (BDZ):

Estas drogas inducen sedación y relajación muscular, con mínimos efectos cardiorrespiratorios. Las más utilizadas en anestesia de pequeños animales son el diazepam y el midazolam.

El diazepam es un fármaco liposoluble, que atraviesa fácilmente la placenta y puede producir en el neonato, letargia, hipotono e hipotermia. Transcurridos 5 minutos de la administración endovenosa (ev) de 5-10 mg de diazepam se encontrarán iguales concentraciones en la madre y el feto (20). Si bien no es aconsejable el uso de diazepam en la paciente obstétrica; se ha sugerido que los efectos indeseables pueden ser minimizados usando dosis de 0,14 mg /kg ev (13). Por el contrario, el pasaje placentario del midazolam es mucho menor debido a su menor liposolubilidad, posibilitando su uso en la hembra preñada sin producir marcados efectos adversos en los ca-

chorros (20, 18).

En aquellos casos en los que se decida el uso de una BDZ en la premedicación debemos considerar la posibilidad de que se produzca el efecto paradójico o efecto rebote (21). En estos casos, así como en los casos de depresión neonatal, los efectos del diazepam y midazolam pueden ser revertidos utilizando flumazenil a dosis de 0,1 mg/kg (22).

Agonistas α_2 :

Los agonistas α_2 (xilacina, medetomidina) son potentes sedantes - hipnóticos con importantes propiedades analgésicas. Sin embargo atraviesan fácilmente la placenta produciendo marcada depresión cardiorrespiratoria tanto en la madre como en el feto. Disminuyen el flujo sanguíneo uterino y placentario con la consiguiente depresión fetal (7). Los agonistas α_2 se asocian con alta mortalidad neonatal luego de la cesárea. Dosis de 1 ug/kg ev de medetomidina inducen disminución en el gasto cardíaco de un 60-70 % y aumento en la resistencia vascular sistémica de un 200 % (23). Es debido a estas características, que este grupo de drogas está contraindicado en la hembra preñada (7).

Drogas analgésicas:

Opioides:

Se utilizan frecuentemente en la premedicación para realizar analgesia preventiva, ya sea solos o combinados con tranquilizantes. Son analgésicos muy potentes y reducen en gran medida los requerimientos de otras drogas anestésicas.

Los opioides atraviesan rápidamente la placenta, produciendo en los neonatos depresión respiratoria y del sistema nervioso central, que puede prolongarse por más de 24 h. En la madre los opioides inducen depresión respiratoria y bradicardia, esta última puede ser tratada con glicopirrolato (su uso es más apropiado que el de la atropina ya que no atraviesa la placenta), la hipoxemia se evita con la administración de oxígeno y en caso necesario realizando respiración asistida (5, 7).

Estas drogas pueden comportarse como:

Agonistas puros: (fentanilo, meperidina, oximorfona), producen depresión respiratoria muy marcada; dosis dependiente; pero sus efectos pueden ser revertidos, con drogas antagonistas como la naloxona. Es conveniente administrar el antagonista directamente al neonato, para evitar privar a la madre de la analgesia. Debemos considerar que la naloxona posee una corta duración de

acción y puede aparecer renarcotización, en este caso se aplicarán dosis adicionales del antagonista. Por esta razón, tanto la hembra como los neonatos deben ser monitorizados adecuadamente (13).

Agonistas-antagonistas: (butorfanol, buprenorfina, nalbufina): estas drogas producen depresión respiratoria pero en menor grado que los agonistas puros, ya que poseen efecto techo, por encima de una dosis determinada, no aumentarán sus efectos analgésicos pero tampoco la depresión respiratoria (7).

Antagonistas: (naloxona) debido a que esta droga es un antagonista puro, sin efectos opioides, es una de las drogas más efectivas (20).

Actualmente se utilizan en el manejo anestésico de la hembra preñada morfínosímiles por vía epidural y subaracnoidea. De esta manera se disminuyen los requerimientos de anestésicos locales, se maneja el dolor pos operatorio y disminuyen los efectos depresores sobre el neonato (13).

Las dosis requeridas por estas vías son menores que las usadas vía intramuscular o endovenosa y, si bien puede haber transferencia placentaria, esta es de poca importancia (20).

Anestésicos fijos:

Estas drogas se utilizan para inducir hipnosis o narcosis suficiente como para lograr la intubación o bien como parte de un protocolo anestésico balanceado, acompañados por un agente analgésico (13).

Tiopental sódico:

Es un barbitúrico de acción ultracorta, el cual sufre una disminución de la biotransformación hepática durante la preñez. Debido a su alta liposolubilidad, atraviesa rápidamente la placenta, alcanzando un equilibrio inmediato entre la sangre materna y fetal. En el humano puede ser detectado en la sangre venosa umbilical a los 30 segundos de administrado a la madre (20).

Una vez administrado, el tiopental sufre una importante redistribución y es por esta razón que las concentraciones en sangre materna caen rápidamente, con lo que se limita la transferencia placentaria. De lo anterior podemos deducir que cuanto más lejos ocurre el nacimiento de la administración de tiopental, habrá menos probabilidades de que aparezcan efectos deletéreos en el recién nacido. En la mujer se considera que el

tiempo de inducción - nacimiento apropiado es de 20 min (20). En los perros, la duración de los efectos de la anestesia con barbitúricos sin utilizar dosis repetidas es muy variable, y esto hace difícil establecer el tiempo ideal para extraer los cachorros (24). En humanos, cuando se utiliza el tiopental sódico a dosis bajas, 4 mg/kg, la depresión fetal es mínima (13). En el perro las dosis efectivas para lograr la inducción son mayores (8 mg/kg), por lo tanto se producirá leve depresión neonatal (12).

El uso de barbitúricos para inducir anestesia disminuye la habilidad de la hembra para cuidar adecuadamente a los cachorros, ya que el período de recuperación suele ser largo, especialmente en hembras obesas (25).

Ketamina:

Esta droga, altamente liposoluble, posee un índice de solubilidad 5-10 veces mayor que el del tiopental, por lo que atravesará la placenta rápidamente pudiendo producir en el neonato depresión e hipertono muscular. La aparición y el grado de depresión se relacionan, con la dosis y con el tiempo transcurrido (20). En la mujer, dosis por debajo de 1 mg/kg producen depresión neonatal mínima. En el perro, al igual de lo que ocurre con el tiopental, las dosis efectivas para lograr inducción son superiores (13).

Propofol:

Es un alquilfenol, no barbitúrico, de muy bajo peso molecular, muy liposoluble y altamente no ionizado, por lo tanto atraviesa rápidamente la placenta (20). Luego de la administración de propofol, la recuperación es muy rápida debido a su velocidad de metabolización, que se produce primariamente en hígado, aunque también ocurre metabolismo extrahepático (13). Estas características hacen que el propofol sea una droga adecuada para la inducción en cesárea (25). La administración de dosis repetidas, y su uso por infusión continua, deben evitarse ya que en estos casos se observa disminución de la capacidad de adaptación y depresión en los neonatos (25). En el perro, la dosis para inducción es de 4-6 mg/kg. Si bien el propofol atraviesa rápidamente la placenta, sufre un rápido clearance desde la circulación neonatal (13).

Los efectos farmacológicos son similares a los del tiopental aunque algo más pronunciados, por lo tanto habrá disminución de la resistencia vascular y presión arterial; disminución de la con-

tractibilidad miocárdica y precarga, con la consiguiente disminución del flujo sanguíneo uterino. En la inducción es muy probable que aparezcan apneas, lo que puede causar hipoxia y acidosis fetal (25). El grado de hipotensión está influenciado por la tasa de administración y la dosis total utilizada (23).

Las ventajas del propofol sobre el tiopental incluyen rápido comienzo y terminación de acción, sin que aparezcan depresión o sedación residuales. Este fármaco no se acumula en el cuerpo, entonces, no habrá saturación (13, 26).

Anestésicos inhalatorios:

Atraviesan rápidamente la placenta, ya que son compuestos liposolubles no ionizados y de bajo peso molecular. El grado de depresión fetal y neonatal es proporcional a la profundidad anestésica inducida a la madre, y por lo tanto a la concentración del anestésico en sangre materna y al tiempo de exposición fetal. Si el plano anestésico de la madre es muy profundo, se producirá hipotensión materna con la consiguiente disminución del flujo sanguíneo uterino y acidosis fetal (27, 20).

Es más adecuado el uso de agentes con bajo índice de solubilidad sangre/gas tales como halotano, isoflurane, enflurane, desflurane, que los altamente solubles como el metoxiflurane, ya que con los primeros, la inducción y recuperación de la madre y los neonatos será más rápida (28, 13). El isoflurane posee mayor margen de seguridad cardiovascular y, junto con el halotano, causan importante relajación uterina, lo cual aumenta la hemorragia. El óxido nitroso puede ser utilizado para potenciar la acción de los anestésicos inhalatorios, y por lo tanto disminuir el requerimiento de los mismos. Si es usado al 60 %, la depresión fetal será mínima (12).

En la preñez se produce la reducción de la CAM para los anestésicos inhalados entre un 25-40 %. Se cree que una de las causas de esta disminución podrían ser los efectos sedativos de las tasas de progesterona que hay en este estado fisiológico (20).

Anestésicos locales:

Estos agentes son utilizados frecuentemente para realizar anestesia regional. Tanto ellos como sus metabolitos, atraviesan rápidamente la placenta, pudiendo deprimir al feto. Concentraciones de 3 µg/ml de lidocaína o mepivacaína, en la sangre del neonato, causarán depresión. Los niveles de estas drogas en plasma materno son muy

bajos luego de la administración epidural o subaracnoidea, rara vez se encontrarán concentraciones peligrosas en el neonato. Sin embargo puede ocurrir una importante transferencia placentaria, cuando se administran en forma continua en el espacio epidural, o cuando se utilizan volúmenes excesivos de droga para infiltración local (20, 13). Esta transferencia placentaria será de menor importancia para la bupivacaína que para la lidocaína, debido a que la primera posee mayor unión proteica y mayor grado de ionización a pH fisiológico (30).

Por último, debemos considerar que estos agentes pueden afectar indirectamente al feto ya que el bloqueo simpático que producen, resultará en hipotensión materna, con la consiguiente disminución de la perfusión útero-placentaria. Esto puede controlarse realizando una correcta administración de fluidos ev (31).

Anticolinérgicos:

La atropina atraviesa la placenta pero, a dosis clínicas, es muy poco probable que tenga efectos adversos sobre el feto; mientras que el glicopirrolato, por ser un amonio cuaternario, no atraviesa la barrera placentaria.

Oxitócicos:

La oxitocina atraviesa la placenta y, cuando se utilizan altas dosis, produce hipotensión materna e hipertono uterino lo que causa asfixia fetal (20).

Técnicas anestésicas

Durante la gestación, los pulmones fetales están colapsados y la sangre rica en oxígeno llega a los fetos a través de los vasos placentarios (26). Al producirse el nacimiento, se altera el intercambio gaseoso placentario y entonces el feto se vuelve hipercápnico e hipóxico; al mismo tiempo que aumenta la sensibilidad de los quimiorreceptores que regulan la respiración (26, 20).

Estos acontecimientos inducen el comienzo de la respiración en los recién nacidos; sin embargo, en la cesárea las condiciones se alteran, y los cachorros necesitan recibir estímulos para comenzar a respirar. Esta situación se verá agravada por el pasaje transplacentario de drogas y sus efectos sobre los neonatos; los que además necesitarán más tiempo para metabolizar y excretar los fármacos debido a la inmadurez de sus enzimas hepáticas (4, 32, 21).

Se encuentran disponibles varios protoco-

los anestésicos para cesárea, ya sea con anestesia regional o general (5).

Anestesia general:

Cuando la anestesia general es adecuadamente administrada, la función cardiopulmonar de la madre es bien mantenida. Esta técnica provee óptimas condiciones operacionales para el cirujano, con un animal totalmente inmóvil y relajado. Mediante la intubación traqueal se logra el control de la vía aérea materna y se previene la falsa vía en caso de vómito o regurgitación, asegurando además una adecuada administración de oxígeno a la madre y en consecuencia, también a los fetos. Adicionalmente muchos veterinarios están más familiarizados con esta técnica y poseen mayor habilidad para inducir una anestesia general segura que para realizar una adecuada técnica de anestesia regional (21,2 7,33).

Dentro de las desventajas podemos considerar: la inducción de mayor depresión neonatal que la anestesia regional; si el plano anestésico es muy superficial, se produce en la madre liberación de catecolaminas, esto induce hipertensión y disminución de la perfusión útero-placentaria, produciendo en la madre y el feto estrés y deterioro de la función cardiopulmonar (18, 31). Si la tráquea no está adecuadamente intubada, habrá mayores probabilidades de falsa vía que en el caso de anestesia regional (27).

Si decidimos realizar una anestesia general, la hembra debe ser capaz de cuidar a sus cachorros lo más rápidamente posible luego de la cesárea; entonces debemos seleccionar drogas que permitan cumplir con este requisito (5). Pre-medicación: si consideramos necesario el uso de un anticolinérgico, el de elección es el glicopirrolato, que prácticamente no atraviesa la placenta. En cuanto al uso de drogas tranquilizantes, reservamos su uso para aquellas hembras muy miedosas o excitadas y siempre a dosis bajas. Realizaremos analgesia preventiva usando un opioide agonista, si disponemos del antagonista para revertir su acción, de lo contrario es más apropiado considerar el uso de un agonista-antagonista ya que estas drogas poseen efecto techo.

Inducción: si la hembra lo tolera, se debería realizar 5-7 min de preoxigenación con máscara, 4-6 l/min para disminuir las posibilidades de hipoxia (18, 24). La inducción puede realizarse con máscara o con anestésicos inyectables. El primer caso será utilizado en una hembra dócil, que no se hiperexcite. Usaremos anestésicos tales como el sevoflurano que poseen un bajo coeficiente de

solubilidad sangre-gas (0,6 y 0,4 respectivamente) y por lo tanto lograrán una rápida inducción (20). Una buena alternativa para inducir anestesia general con agentes inyectables en perros es el propofol. Este se metaboliza rápidamente en el hígado y sus efectos desaparecen en pocos minutos. Si no se dispone de esta droga, el tiopental o la combinación de ketamina-diazepam, a bajas dosis, proveen un buen margen de seguridad. Para el mantenimiento, se recomienda la utilización de anestésicos inhalados de baja solubilidad ya que se eliminarán rápidamente.

Anestesia regional:

En el perro se utiliza generalmente anestesia epidural, a nivel del espacio lumbo-sacro. La anestesia espinal o subaracnoidea no se aplica corrientemente ya que la médula espinal termina a nivel de la sexta vértebra lumbar.

Entre las ventajas podemos citar: simplicidad de la técnica, mínima exposición de los fetos a las drogas, mínimo riesgo de falsa vía, óptima relajación muscular y analgesia. Entre las desventajas se encuentran: la aparición de hipotensión secundaria al bloqueo simpático y manipulación visceral; los movimientos de miembros y cabeza de la hembra en estado de conciencia y la necesidad de entrenamiento previo del veterinario para realizar el procedimiento (5, 31).

Para corregir la hipotensión se utiliza Ringer lactato o una mezcla de iguales volúmenes de solución salina y dextrosa al 5% con una tasa de infusión de 20 ml/kg durante 15-20 min. Si la hipotensión persiste puede administrarse epinefrina (0,15 mg/kg ev). Al igual que en la anestesia general, está indicado el uso de un anticolinérgico para prevenir la bradicardia (13).

En la hembra preñada disminuyen los requerimientos de anestésicos locales por vía epidural, debido a la distensión de las venas epidurales por el aumento del flujo sanguíneo colateral. La distensión venosa y disminución de los espacios epidural y cerebroespinal, facilitan la transferencia de la droga dentro del fluido cerebroespinal. Se debe tener especial cuidado cuando se realiza la maniobra ya que es más factible entrar inadvertidamente dentro de las venas epidurales (5).

CONCLUSIONES

Durante la gestación y el parto las perras sufren cambios fisiológicos que modifican y condicionan los requerimientos anestésicos. Es así que un protocolo anestésico seleccionado en rela-

ción con el momento fisiológico y el estado general de la hembra permitirá aumentar la sobrevivencia neonatal y la probabilidad de recuperación de la madre.

El uso de drogas parenterales que se metabolizan y se eliminan en forma rápida, así como la elección de anestésicos inhalados de bajo índice de solubilidad, disminuirán el tiempo de exposición fetal a los fármacos reduciendo los efectos colaterales de estos y mejorando la viabilidad prenatal.

En medicina veterinaria canina el uso de un protocolo de anestesia general mejora las condiciones de trabajo quirúrgico, asegura la correcta administración de oxígeno y previene la falsa vía materna. Sin embargo, el feto se encuentra expuesto a las drogas utilizadas lo cual afecta sus funciones vitales en cierto grado. El uso de anestesia regional, si bien disminuye la exposición fetal a drogas anestésicas, causa hipotensión materna lo que disminuye la perfusión útero placentaria causando hipoxia fetal. El adecuado análisis riesgo/beneficio de cada tipo anestésico en relación con el paciente permitirá obtener un alto grado de éxito en el manejo de la hembra preñada y una gran probabilidad de sobrevivencia neonatal

BIBLIOGRAFÍA

- Gilroy BA, DeYoung DJ. Cesarean section. Anesthetic management and surgical technique. *Vet. Clin North Am Small Anim Pract.* 1986; 16 (3): 483-94.
- Paddleford RR. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1992; 22 (2): 481-484.
- Benson GJ, Thurmon JC. Anesthesia for cesarean section in the dog and cat. *Mod Vet Pract* 1984; 65 (1): 29-32.
- Goodman GA, Goodman LS. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Ed Médica Panamericana sexta edición. México 1982.
- Moon PF, Pascoe PJ. Pediatric and obstetrical anesthesia. *Proceedings of the annual conference Society for Theriogenology.* 1999; p.157-167.
- Weinberger S E. Pregnancy and the lung. *Am Rev Dis.* 1980; 221:559.
- Hellyer PW. Anesthesia for cesarean. In: Slater C. E (ed); *Textbook of small animal surgery.* 2nd. Ed Saunders Company. 1993; (2):2300-2304.
- Palahniuk RJ, Shnider SM, Eger EI, Lopez-Manzanara P. Pregnancy decreases the requirements of inhaled anesthetics. *Anesthesiology.* 1974; 41: 82-83.
- Kerr MG. Cardiovascular dynamics in pregnancy and labor. *Br Med Bull* 1968; 24:19.
- Veland K, Jansen JM.. Maternal cardiovascular dynamics. Posture and uterine contractions. *Am J Obstet Gynecol.* 1969; 103: 1-7.
- Abitbol MM. Inferior vena cava compression in the pregnant dog. *Am J Obstet Gynecol.* 1978; 130:194-198.
- Lipton B, Hershey SC, Baez S. Compatibility of oxytocics with anesthetic agents. *JAVMA* 1962; 179: 410-416.
- Cesarean section patients. In Lumb & Jones' *Veterinary anesthesia.* 3rd. Williams & Wilkins company 1996; 818-828.
- Benson GJ, Thurmon JC. In: Burk TC (ed) *Small animal reproduction and infertility: A clinical approach to diagnosis and treatment.* Ed Lea & Febiges, Philadelphia, 1986; 353-357.
- Goodger WJ, Levy W. Anesthetic management of the cesarean section. *Veterinary Clinics of North America.* 1973; 3: 85-99.
- Kerr MG, Scott DB. Inferior vena cava occlusion in late pregnancy. *Clinical anesthesia.* 1973; 10: 2.
- Probst CW, Webb A. I: Postural influence on systemic blood pressure, gas exchange and acid/base status in the term- pregnant bitch during general anesthesia. *Am J Vet Res.* 1983; 44 (10): 1963-1965.
- Paddleford RR. *Manual of animal anesthesia.* New York: Churchill Ed. Livingstone Inc .1988; p: 253-308.
- Bonica JOH. Fisiología y farmacología de la placenta, el feto y el recién nacido. *Rev Arg Anest* 1983; 41, (3); 195-206.
- Paladino MG. Bases farmacológicas de la anestesia. Ediciones Sur. 1994.
- Forsberg CL, Eneroth A. Parturition in *Manual of small animal reproduction and neonatology.* Ed. England. G and Harvey. M. Editorial British small animal veterinary association. United Kingdom. 1998; 136-139.
- Tranquilli WJ, Lemke K, Williams LL. Flumazenil efficacy in reversing diazepam or midazolam overdose in dog. *J Vet Anesth* 1992; 19: 65-68.
- Caman WR, Ostheimer GW. Physiological adaptations during pregnancy. *International Anesthesiology clinics,* 1990; 28: 2-10.
- Short, C. E. *Principles and practice of veterinary anesthesia.* Baltimore: The Williams & Wilkins Co. (1987) 58-69.
- Siafka I, Valalouca A, Gatzou B, Petropoulos G, Salamalekis E. A comparative study of propofol and thiopental as induction agents for elective cesarean section. *Clin Exp Obst Gyn.* 1992; 19:93-96.
- Funkquist Pia ME, Nyman C, Lofgren AMJ, Fahjlbriink EM. Use of propofol-isoflurane as an anesthetic regimen for cesarean section in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical association.* 1997; 211 (3): 313- 317.
- Datta S, Alper MH. Anesthesia for cesarean sec-

tion. *Anesthesiology*. 1980; 53:142-160.

28. Pedersen JE, Fernandes A, Christensen M. Halotane 2 % for caesarean section. *Europ J Anaesthesiol*. 1992; 9: 319-324.

29. Moon PF, Hollins N, Ludders JW, Gled RD, Pascoe PJ. Perioperative management and mortality rates of dogs undergoing cesarean section in the United States and Canada. *JAVMA* 1998; 231 (3): 365-369.

30. Muir WW, Hubbel JAF. Anaesthesia for cesarean section. In: Muir WW, Hubbel JAE, eds. *Handbook of veterinary anesthesia*. St Louis: CV Mosby C.O. 1989; 118-126.

31. Racliffe FM, Evans JM. Neonatal well-being after elective delivery with general, spinal and epidural anaesthesia. *Europ J Anaesthesiol*. 1993; 10: 175-181.

32. Dodman NH. Anaesthesia for cesarean section. In: Burke, T. J, ed. *Small animal reproduction and infertility*. Philadelphia: Lea & Febiger. 1979, p. 353-371.

33. Duncan PG, Pope WDB. The safety of anaesthesia and surgery during pregnancy. *Anesth*. 1986; 64:790-794.

ENROFLOXACINA: UNA FLUORQUINOLONA DE USO EXCLUSIVO EN VETERINARIA PARTE I: QUÍMICA, MECANISMO DE ACCIÓN, ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y RESISTENCIA BACTERIANA

J.L. Otero¹, N. Mestorino², J.O. Errecalde²

¹Departamento de Salud Pública Veterinaria.

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Litoral

²Cátedra de Farmacología. Farmacotecnia y Terapéutica.

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Resumen: La enrofloxacin es un fluorquinolona desarrollada exclusivamente para ser usada en medicina veterinaria. Se caracteriza por una muy buena actividad antimicrobiana, incluso contra microorganismos poco susceptibles o resistentes a los antimicrobianos de uso corriente en animales. Tiene un excelente comportamiento farmacocinético, absorción casi completa y una distribución tisular que garantiza concentraciones inhibitorias mínimas frente a los microorganismos causantes de la mayoría de las enfermedades en los animales. Su índice terapéutico es alto, y puede administrarse sin mayores problemas en terapias combinadas con otros medicamentos. Este artículo hace una revisión y actualización del mecanismo de acción y la actividad antimicrobiana de las fluorquinolonas en general, y de la enrofloxacin en particular, y de la resistencia desarrollada por las bacterias hacia estos compuestos.

Palabras claves: enrofloxacin, fluorquinolonas, antimicrobianos, resistencia bacteriana

ENROFLOXACIN: A FLUORQUINOLONE OF EXCLUSIVE USE IN VETERINARY. PART I: CHEMICAL CHARACTERISTICS, MECHANISM OF ACTION, ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND BACTERIAL RESISTANCE

Abstract: Enrofloxacin is a fluorquinolone exclusively developed for being used in veterinary medicine. It is characterized by a very good antimicrobial activity, even against microorganism less susceptible or resistant to commonly used antimicrobials. It has an excellent pharmacokinetic behavior, almost complete absorption and a tissue distribution that guarantees the minimum inhibitory concentration in front of the microorganisms that cause most of the animal illnesses. The therapeutic index is high, and the drug can be administered without serious problems when combined with other medicines. This article shows a revision and actualization of the mechanism of action and antimicrobial activity of fluoroquinolones, particularly enrofloxacin, and the mechanism of bacterial resistance developed to these compounds.

Key words: enrofloxacin, fluoroquinolone, antimicrobials, bacterial resistance

Fecha de recepción: 10/08/00

Fecha de aprobación: 10/12/00

Dirección para correspondencia: J.L.Otero Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Litoral. R.P. Kredel 2805 (3080) Esperanza, Santa Fe.

E-mail: jotero@fcv.unl.edu.ar

Introducción

Las fluorquinolonas son un grupo de agentes antibacterianos sintéticos usados en medicina tanto humana como veterinaria para el tratamiento de una variedad de enfermedades infecciosas. Aunque se han sintetizado muchas de ellas, las más conocidas entre las desarrolladas y usadas en medicina veterinaria incluyen la amifloxacin, ciprofloxacina, danofloxacina, enrofloxacina, marbofloxacina, norfloxacina y sarafloxacina (1). Otras, como la premafloxacina (2), feroxacin (3) y difloxacina (4) están siendo evaluadas, o ya han sido adoptadas para el uso terapéutico.

La enrofloxacina es una fluorquinolona desarrollada en los años '80 para su uso exclusivo en medicina veterinaria (5).

Estructura química

La enrofloxacina es una fluorquinolona derivada del ácido nalidíxico (6), y como todos los compuestos genéricamente llamados quinolonas tiene un núcleo químico básico denominado "dihidroquinolina" o anillo 4-quinolónico (7, 8) (Fig. 1).

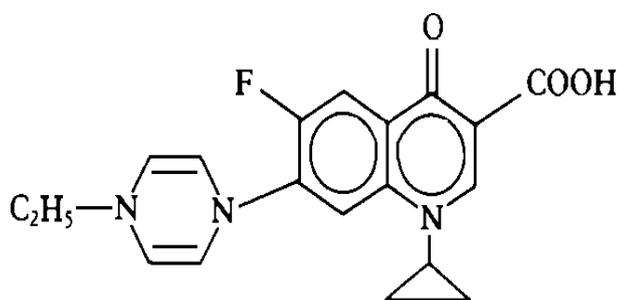


Figura 1. Estructura química de la enrofloxacina (9).

Figure 1. Chemical structure of enrofloxacin (9).

La sustitución con fluor en la posición 6 (dando origen así a las fluorquinolonas) fue el cambio que representó un salto cualitativo en el desarrollo de estos compuestos. Con ello se mejoró la unión a su enzima diana, la DNAgirasa bacteriana, y se aumentó la penetración celular hasta 70 veces con respecto a las quinolonas que no tienen fluor en esa posición (10). Además, con esta sustitución se aumentó la eficacia contra patógenos Gram negativos y se amplió el espectro de actividad al actuar contra patógenos Gram positivos (1).

En la posición 7 tiene un anillo 4-metilopiperazin-1-il, cuyo volumen espacial le confiere mayor potencia con respecto a aquellas quinolonas que tienen moléculas lineales en esa posición. Por otra parte, la presencia de un grupo etilo en la posición 4 de este anillo parece aumentar la absorción digestiva y la disponibilidad (11) así como lograr que la enrofloxacina alcance el doble de la concentración plasmática de la ciprofloxacina, la cual tiene una estructura similar pero no posee el mencionado radical (10). La enrofloxacina tiene un bajo peso molecular, lo cual favorece su penetración tisular. En su punto isoelectrónico tiene la menor solubilidad y la mayor lipofiliencia (12).

Mecanismo de acción

El principal mecanismo de acción de las quinolonas es la inhibición de la DNAgirasa, una enzima bacteriana involucrada en la mayoría de los procesos biológicos que comprometen al DNA, tales como la transcripción, recombinación, replicación y reparación del mismo (7,13,14). La DNAgirasa es una Topoisomerasa tipo II, y es la única de su tipo capaz de introducir un superenrollamiento helicoidal negativo dentro de la molécula de DNA, desempeñando un rol crítico en el mantenimiento de la densidad genómica superhelicoidal (15). Las quinolonas inhiben, además, a la Topoisomerasa IV, otra topoisomerasa tipo II esencial en la segregación cromosómica de las células procariontas (15,16). Recientes investigaciones han sugerido que en los organismos Gram positivos es esta enzima la principal diana para algunas quinolonas (17,18,19). En algunas especies de bacterias, tales como *E. coli*, la diana principal es la DNA-girasa mientras que en otras, como *S. aureus*, lo es la Topoisomerasa IV. Considerando que estas enzimas tienen funciones algo distintas, es probable que las bacterias difieran en sus respuestas a las quinolonas de acuerdo a cuál sea la diana principal (18).

Todas las quinolonas tienen el mismo mecanismo básico de acción -llamado mecanismo A- que requiere RNA y síntesis de proteínas, así como división celular, para ejercer acción bactericida. Algunas nuevas quinolonas exhiben otro mecanismo, llamado B, son capaces de matar bacterias que no se están dividiendo, y en ausencia de síntesis de RNA o proteínas. Y unas pocas quinolonas mantienen actividad bactericida en ausencia de multiplicación celular, pero requieren síntesis activa de proteínas y RNA. Este es el llamado mecanismo C. El tipo de mecanismo de acción

puede depender del microorganismo en cuestión. La ciprofloxacina, por ejemplo, muestra los mecanismos A y B contra *E. coli*, pero solamente el A frente a *S. aureus* (17).

Debe hacerse notar que las topoisomerasas se encuentran también en organismos eucariotas, desde en levaduras hasta en seres humanos. La topoisomerasa tipo II eucariota difiere estructuralmente de la bacteriana y, si bien hace cortes al DNA, no produce superenrollamiento negativo (13,20). Aún así, se ha demostrado que esta topoisomerasa eucariota tiene una secuencia parcial de aminoácidos homóloga a la enzima bacteriana, que podría representar un sitio de acción para las quinolonas (20). Se pensaba que las quinolonas eran incapaces de inducir daño genético en células de mamíferos, debido a una afinidad de muy inferior por la topoisomerasa tipo II de los mamíferos. Sin embargo, estudios recientes han producido evidencias de una posible genotoxicidad de las quinolonas sobre sistemas eucariotas (21,22).

Actividad antimicrobiana:

Al actuar específicamente sobre el DNA, las fluorquinolonas son rápidamente bactericidas, activas a muy bajas concentraciones, y muestran efecto post antibiótico (8, 23).

Una de las características de estas drogas es que la relación entre la concentración *in vitro* del antimicrobiano y la muerte bacteriana describe una curva de tipo bifásico, con disminución del efecto bactericida a muy altas concentraciones. Esto probablemente se deba a una inhibición de la síntesis de RNA a muy altas concentraciones de la droga, síntesis necesaria para que haya efecto bactericida (23, 24). Algunos autores sostienen que este efecto hace que las fluorquinolonas sean considerablemente menos eficaces a concentraciones mucho mayores que su concentración inhibitoria mínima (CIM) (1). Sin embargo, en la práctica debería alcanzarse una concentración plasmática inusual antes de que el efecto sea clínicamente aparente (23).

Las fluorquinolonas actúan como antibióticos concentración - dependientes para las bacterias Gram negativas. Sin embargo, contra bacterias Gram positivas el efecto es tiempo - dependiente, o una combinación de ambos efectos (25).

Se ha observado que las fluorquinolonas ejercen efecto post antibiótico (EPA) sobre varias

cepas bacterianas, incluyendo, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (1). La ciprofloxacina y la norfloxacina inducen EPA de 1,8 a 2,4 horas sobre *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, y la marbofloxacina ha demostrado EPA de 2 a 3 horas contra *S. intermedius*. Enrofloxacin tiene un efecto post antibiótico de 1 a 4 horas de duración (según dosis y microorganismo) contra *S. intermedius*, *P. multocida*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* y *S. aureus* (23,26,27). Aún a concentraciones por debajo de la CIM las fluorquinolonas inhiben la división celular, reducen la tasa de crecimiento bacteriano, inducen cambios en la ultraestructura de la superficie bacteriana que previenen la colonización de tejidos específicos, interfieren en la expresión de factores de virulencia, y aumentan la susceptibilidad de algunos microorganismos a la fagocitosis. Además, durante la fase pos antibiótica podrían deprimirse algunos de los mecanismos de resistencia bacteriana (27).

En ocasiones la eficacia de las fluorquinolonas es afectada por el pH del medio. Se ha comprobado menor actividad contra bacterias Gram negativas en medio ácido que en medio básico (23). Si embargo, la eficacia frente a bacterias Gram positivas, no parece ser afectada por el pH del medio (1). Algunos de los compuestos exhiben una actividad considerablemente menor (de hasta 100 veces) en presencia de orina (14), aunque otros, como la marbofloxacina, han mantenido su actividad bactericida en orina por hasta cinco días luego de una sola aplicación (23). Wetzstein (27) demostró que en pH ligeramente ácido (característico de tejidos inflamados, abscesos o fagocitos) se reduce la tasa de muerte de algunas bacterias en presencia de enrofloxacin. En contraste, a pH 8 la actividad bactericida de la enrofloxacin casi no varía.

Las fluorquinolonas en general tienen poca actividad contra los anaerobios y son menos eficaces contra anaerobios facultativos desarrollados en condiciones anaeróbicas. El mecanismo de resistencia intrínseca de este tipo de bacterias es poco conocido (23). Sin embargo, la eficacia de algunos compuestos como la ciprofloxacina no es afectada por las condiciones anaeróbicas y el pH ácido característicos del medio purulento de un absceso (23,27). La presencia de cationes divalentes en el medio disminuye la susceptibilidad microbiana a las fluorquinolonas (1). En la tabla I se resumen las características microbiológicas de estas drogas:

Tabla I: características microbiológicas de las fluorquinolonas

Table I: Microbiological characteristics of the fluoroquinolone.

- ⇒ Rápida actividad bactericida a concentraciones relativamente bajas.
- ⇒ Estrecha relación entre la CIM y la concentración bactericida mínima con menor efecto de inóculo para la mayoría de los organismos.
- ⇒ Prolongado efecto post antibiótico sobre Estafilococos, Enterobacterias y Pseudomonas.
- ⇒ No seleccionan mutantes resistentes mediados por plasmidios.
- ⇒ Frecuencia de resistencia mutacional baja (<10⁻⁹).
- ⇒ No alteran la flora de estreptococos y anaerobios intestinales.
- ⇒ Inhiben a las bacterias resistentes a los aminoglucósidos y betalactámicos

(Neer, 1988; Brown, 1996)

Las fluorquinolonas tienen un amplio espectro antimicrobiano. Tienen una excelente actividad contra *Enterobacteriaceae*, bacterias Gram negativas fastidiosas y *Pseudomonas aeruginosa*; buena a moderada actividad contra *Staphylococcus* spp., *Mycobacterium* spp., *Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp.; y poca o ninguna actividad contra estreptococos (particularmente del grupo D), enterococos y bacterias anaerobias (1,23). Las fluorquinolonas son activas contra una variedad de patógenos veterinarios Gram negativos y algunos Gram positivos, y han demostrado significativa actividad contra patógenos intracelulares pertenecientes a los géneros *Bruce-lla*, *Listeria* y *Chlamydia* (29).

La enrofloxacin tiene buena actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo algunos anaerobios patógenos, y es eficaz contra *Mycoplasma* spp. Es bactericida y mycoplasmicida a bajas concentraciones, y eficaz contra organismos que son resistentes a los β-lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, antagonistas del ácido fólico y macrólidos (30). Cuando se comparó su efecto *in vitro* con el de otros antimicrobianos tales como la gentamicina, ampicilina, cloramfenicol, tetraciclinas, trimetoprima/sulfametoxazol, penicilina G y oxacilina, se encontró que la enrofloxacin era claramente superior en el rango de los Gram negativos. Los valores de CIM para cocos Gram positivos estaban dentro del rango de eficacia de la penicilina G, ampicilina, oxacilina y gentamicina, aunque la enrofloxacin fue superior en eficacia contra estafilococos meticilino-resistentes. Comparada con otros derivados quinolónicos de uso en medicina veterinaria (flumequine por ejemplo) la enrofloxacin se dis-

tingue por un valor de CIM considerablemente menor (factor 20-50) y la ventaja adicional de su eficacia contra *Mycoplasma* spp., *Pseudomonas* spp., y *Streptococcus* spp. (31). Más del 50 % de los aislamientos de *P. aeruginosa* realizados a partir de perros, gatos, caballos, cerdos y vacunos demostraron susceptibilidad a la enrofloxacin (23). Además, el hecho de que la enrofloxacin sea mycoplasmicida le da ventajas frente a otros agentes con buena actividad micoplasmática (32).

La enrofloxacin, como se verá más adelante, se metaboliza en parte a ciprofloxacina (33, 34, 35), y ese metabolismo es beneficioso desde el punto de vista microbiológico, ya que muchas bacterias Gram negativas tienen valores de CIM menores para la ciprofloxacina (34), y es probable que el efecto antimicrobiano sea aditivo entre la droga madre y el metabolito (5).

En la tabla II se muestran rangos de CIM para microorganismos sensibles. El punto de corte para sensibilidad-resistencia a la enrofloxacin fue establecido en 2 µg/ml (31).

Tabla II: Concentraciones Inhibitorias mínimas (CIM_{90 en} µg/ml) para algunos microorganismos

Table II: Minimum inhibitory concentrations (MIC_{90 en} µg/ml) for some microorganism.

≥ 2.0	<i>Bordetella bronchiseptica</i> (7), <i>Campylobacter coli</i> (9)
≥ 1.0	<i>P. aeruginosa</i> (1), <i>Streptococcus</i> spp. (1), <i>Enterococcus</i> spp (1), <i>A. pyogenes</i> (2), <i>R. equi</i> (2), <i>S. equi</i> (2), <i>S. suis</i> (2), <i>S. zooepidemicus</i> (2), <i>M. hyorhinis</i> (8), <i>C. jejuni</i> (9)
≥ 0.4	<i>Pseudomonas</i> spp. (1); <i>Staphylococcus</i> spp. (1), <i>M. synoviae</i> (8), <i>M. iowae</i> (8)
≥ 0.2	<i>Proteus</i> spp. (1); <i>E. coli</i> . (1), <i>Staphylococcus hyicus</i> (3), <i>S. aureus</i> (5), <i>Chlamydia psittaci</i> (6), <i>M. hyopneumoniae</i> (4), <i>M. hyosynoviae</i> (8), <i>M. bovis</i> (8), <i>M. agalactiae</i> (8)
≥ 0.1	<i>S. intermedius</i> (1); <i>S. aureus</i> (1); <i>E. coli</i> (4), <i>C. pseudotuberculosis</i> (2), <i>Salmonella</i> spp (4), <i>M. gallisepticum</i> (8)
≥ 0.05	<i>Klebsiella</i> spp. (1), <i>K. pneumoniae</i> (1); <i>E. coli</i> (1); <i>P. mirabilis</i> (1); <i>S. intermedius</i> (1); <i>E. rhusiopathiae</i> (2), <i>M. hyopneumoniae</i> (8)
≥ 0.02	<i>P. multocida</i> (1), <i>P. haemolytica</i> (2), <i>S. dublin</i> (2), <i>S. typhimurium</i> (2), <i>A. pleuropneumoniae</i> (4)
≥ 0.01	<i>A. pleuropneumoniae</i> (2), <i>A. suis</i> (2), <i>H. somnus</i> (2), <i>P. multocida</i> (2,4)

(1)Cester et al., 1996; (2)Küng et al., 1993; (3)Wegener et al., 1994; (4)Scheer et al., 1996; (5)Salmon et al., 1998; (6)Butaye et al., 1997; (7)Speakman et al., 1997; (8)Hannan et al., 1997; (9)Aarestrup et al., 1997.

Eficacia en cada especie

Bovinos:

Se demostró en terneros la eficacia de la enrofloxacin en diarreas y sepsis producidas por *E. coli*, en infecciones experimentales del tracto respiratorio con *Pasteurella haemolytica* y *Mycoplasma bovis*, y en infecciones latentes o manifiestas producidas por *Salmonella* spp. (30).

En bovinos adultos, Lekeux & Art (36) informaron la alta eficacia de bajas dosis de enrofloxacin en el tratamiento de la fiebre de embarque, atribuible a la actividad del compuesto frente a *Pasteurella* spp. y *Mycoplasma* spp. Asimismo, se obtuvieron buenos resultados en el tratamiento de mastitis bovinas causadas por *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (37) y *Mycoplasma bovis* (38, 39). Algunos autores (10) citan eficacia terapéutica en mastitis causadas por *Streptococcus* spp., mientras que otros (37) sostienen que el efecto antibacteriano no es suficiente.

Ovinos:

Cuando se trató con enrofloxacin a ovejas con mastitis agudas causadas por *Staphylococcus aureus*, se obtuvo una rápida restauración del órgano y la reanudación de la producción normal de leche. Sin embargo, no ocurrió lo mismo en ovejas afectadas de agalactia contagiosa (*Mycoplasma agalactiae* var. *Agalactiae*) ni en aquellas con mastitis gangrenosa (*Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*), en las cuales hubo recuperación del estado general pero las lesiones en las ubres permanecieron sin cambios e interfirieron con la producción de leche (40).

Se obtuvo una rápida recuperación clínica en corderos afectados de enteritis por *E. coli* (40).

Equinos:

Los ensayos de susceptibilidad *in vitro* luego del tratamiento con enrofloxacin sobre 121 cepas bacterianas aisladas de equinos indicaron que el 100% de las bacterias Gram negativas (*E. coli*, *Taylorella equigenitalis*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Actinobacillus equuli*) y *Staphylococcus* spp. coagulasa positivos son susceptibles a la enrofloxacin a CIM < 0.5 µg/ml. Sin embargo, la susceptibilidad de *P. aeruginosa* es variable. Para *S. equi*, *S. zooepidemicus*, y *Rhodococcus equi*, la CIM90 es de 1 µg/ml (41). Varias cepas de *Salmonella* aisladas de equinos (*S. typhimurium*, *S. thompson*, *S. heidelberg*, *S. hadar*, *S. enteritidis*, *S. infantis* y *S. derby*) son sensibles a enrofloxacin (42).

Porcinos:

La mayoría de los aislados de *Streptococcus suis* (43) son sensibles a la enrofloxacin, y la droga tiene buena actividad frente de *Mycoplasma hyosynoviae* (44), *A. pleuropneumoniae*, *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *S. equi* subsp. *equi* y *S. equi* subsp. *zooepidemicus* aislados de cerdos (45).

Las concentraciones plasmáticas alcanzadas luego de su administración oral, tanto en bolo como con el alimento, son superiores a las CIM90 para *P. multocida*, *M. hyopneumoniae*, *A. pleuropneumoniae*, *E. coli* y *Salmonella* spp. (46, 47).

La enrofloxacin es eficaz en el tratamiento del síndrome Mastitis Metritis Agalactia (48) y en infecciones producidas por *Mycoplasma hyopneumoniae* (30), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (49), *C. coli*, *C. jejuni* (10) y *E. coli* enterotoxigénica (50).

Caninos:

Los ensayos experimentales y clínicos han mostrado resultados positivos en infecciones de la piel y de los tractos respiratorios, digestivos y génitourinarios en perros, así como en otitis externas e infecciones de heridas (8,51). En tejidos y fluidos prostáticos la enrofloxacin alcanza concentraciones mayores que las CIM de casi todos los microorganismos causantes de infecciones del tracto urinario (12). También es eficaz en el tratamiento de piodermitis causadas por *Staphylococcus intermedius*, constituyéndose en una buena alternativa frente a cepas meticilino resistentes (52, 53, 54).

Las altas concentraciones de antimicrobiano alcanzadas en macrófagos alveolares y en el fluido del epitelio de revestimiento pulmonar, permiten asegurar el éxito de una terapéutica en infecciones de las vías respiratorias altas de los perros (55). Sin embargo las concentraciones alcanzadas en los tejidos -a las dosis recomendadas por el fabricante- no son totalmente eficaces cuando las infecciones son causadas por *Pseudomonas aeruginosa* (56,57).

La enrofloxacin es eficaz en infecciones causadas por *Rickettsia rickettsii* (58) y *Staphylococcus* spp. β-hemolíticos (59), y demuestra sinergia con la estreptomycin frente a cepas referencia de *Brucella canis* RM 6/66 (60).

Felinos:

Los hallazgos clínicos sugieren que la enrofloxacin es eficaz en el tratamiento de infeccio-

nes causadas por micobacterias oportunistas *Mycobacterium fortuitum* y *M. smegmatis* en gatos (61). Los datos de susceptibilidad *in vitro* indican que la enrofloxacin debería ser eficaz contra *Bartonella* spp. en esta especie. Sin embargo, estudios *in vivo* muestran que es necesaria una terapia de varias semanas, y que la bacteriemia no desaparece en todos los animales (62).

Aves:

La enrofloxacin es eficaz en tratamientos preventivos y terapéuticos de pollos con infecciones experimentales causadas por *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. gallinarum*, *S. arizonae*, *S. pullo- rum*, *H. paragallinarum*, *P. multocida*, *E. rhusiopathiae* (63), *Mycoplasma gallisepticum* (64); también lo es en infecciones naturales por *E. coli* (65), *M. gallisepticum* (66,67), y asociaciones entre *E. coli* y *Mycoplasma* spp. (68).

La enrofloxacin es eficaz *in vitro* frente a *E. coli*, *Salmonella* spp. (69) y *Chlamydia psittaci* (70), microorganismos causantes de infecciones en pavos. En estas aves es eficaz para prevenir la transmisión vertical de *Mycoplasma iowae* (71) y *Mycoplasma gallisepticum* (72), de modo que el tratamiento con enrofloxacin en períodos estratégicos podría ser útil en el control de micoplasmosis, limitando tanto la transmisión vertical como horizontal (71).

El tratamiento con enrofloxacin en el agua de bebida podría ser efectivo contra *Pasteurella anatipestifer*, un importante agente infeccioso de los patos (73).

La enrofloxacin es eficaz en la profilaxis y en tratamientos de aves con psitacosis (74).

Otras especies:

La enrofloxacin es eficaz en el tratamiento de conejos con septicemia aguda causada por *Pasteurella multocida* (75).

En peces de crianza artificial se han obtenido muy buenos resultados con esta droga en el tratamiento de los patógenos habituales (76, 77, 78). En estudios *in vitro* la enrofloxacin fue el antimicrobiano de mayor actividad frente a los siguientes agentes infecciosos de peces: *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Vibrio salmonicida*, *Vibrio anguillarum* y *Yersinia ruckeri* (79).

Se ha comprobado su eficacia en el tratamiento de enfermedades bacterianas de tortugas

(80), especialmente en enfermedades del tracto respiratorio alto causadas por *Mycoplasma* spp. y *Pasteurella* spp. (81, 82).

Resistencia bacteriana

El amplio espectro de actividad antimicrobiana, y el excelente comportamiento farmacocinético, han hecho de las nuevas fluorquinolonas agentes muy atractivos para el tratamiento de enfermedades infecciosas severas, tanto en el hombre como en los animales. Sin embargo, se ha informado una alarmante tasa de resistencia bacteriana en aislados clínicos humanos, y hay evidencias que indican la emergencia de bacterias resistentes en animales tratados. La mayor incidencia de bacterias resistentes a las fluorquinolonas en personas no expuestas a estos agentes podría ser el resultado del uso extensivo de estos antimicrobianos en medicina veterinaria (29).

La resistencia bacteriana a las fluorquinolonas se debe a mutación cromosómica (20, 87, 88). Hasta el momento no se ha demostrado resistencia mediada por plásmidos (20, 89), probablemente debido a que estas drogas inhiben la conjugación (23). Tampoco se ha descrito inactivación de quinolonas y fluorquinolonas por enzimas microbianas (1, 90).

La mutación cromosómica confiere resistencia a las quinolonas por varios mecanismos: (a) alteración de las enzimas blanco; (b) alteración en la permeabilidad de la membrana celular, y c) mecanismo de expulsión activa (20, 87, 88).

El principal mecanismo de resistencia a las fluorquinolonas se debe a alteraciones en las enzimas diana, y se origina en mutaciones espontáneas de los genes *gyrA* y *gyrB* que codifican las subunidades de la DNA girasa, y en los genes *parC* (*grlA*) y *parE* (*grlB*) que codifican las subunidades de la topoisomerasa IV (16, 19). La resistencia puede deberse a mutaciones puntuales en uno o más genes, a mutaciones en más de un sitio del mismo gen, o a mutaciones múltiples, particularmente en *gyrA* y *parC* (*grlA*) en forma simultánea (91, 92, 93, 94). Las secuencias aminoacídicas de las regiones determinantes de resistencia a las fluorquinolonas son altamente conservadas (93).

El mecanismo de resistencia por impermeabilidad se ha descrito únicamente en las bacterias Gram negativas y se produce por disminución en la expresión de algún tipo de proteína de la membrana externa (porinas *OmpF*, *OmpC* en *E. coli*), o debido a modificaciones de los lipopoli-

sacáridos. Esto resulta en una menor acumulación del antimicrobiano, y en una consecuente disminución de la susceptibilidad microbiana (17, 87).

Algunas bacterias expresan sistemas de eflujo activo codificados cromosómicamente, que expulsan quinolonas desde el interior (87). Este sistema fue descrito inicialmente en *E. coli*, y luego en otras bacterias Gram negativas y Gram positivas (95), y se debe a una sobreexpresión del gen *norA*, que codifica a la proteína de membrana que interviene en el mecanismo de eflujo activo de fluorquinolonas y otras varias drogas (19, 96). Este mecanismo de resistencia parece afectar a las quinolonas en distinto grado, dependiendo de las propiedades físicas de cada una, y aparentemente es más activo con las fluorquinolonas hidrofílicas, tales como la ciprofloxacina y norfloxacina (17, 96).

La resistencia cruzada entre quinolonas se observa con mayor frecuencia entre las más antiguas, como el ácido nalidíxico y el flumequine (1), pero puede existir entre éstas últimas y las fluorquinolonas (97), y entre fluorquinolonas entre sí (10, 90).

La resistencia cruzada entre las fluorquinolonas usadas en animales y aquellas de uso humano es un aspecto particularmente importante para la Salud Pública. Existe una asociación temporal entre la introducción de las fluorquinolonas en la crianza de aves y el sustancial aumento en la prevalencia de *Campylobacter jejuni* resistentes a quinolonas aislados de aves, carne de aves y humanos infectados. Además, estudios recientes han confirmado la similitud entre cepas de *Campylobacter* spp. resistentes a las fluorquinolonas, aisladas de animales y humanos. Existe también una relación entre la introducción de las fluorquinolonas en la producción animal y la aparición de cepas de *Salmonella typhimurium* DT104 y variantes de *S. typhimurium* DT204 resistentes a estos antimicrobianos. Varios países han informado un aumento en la emergencia de cepas bacterianas con menor susceptibilidad a las fluorquinolonas en animales luego de la introducción de estos compuestos para su uso en producción animal (98).

Hay que destacar que ya se ha reportado resistencia a la enrofloxacin en *E. coli* (99), *Campylobacter jejuni* y *C. coli* (86, 100).

CONCLUSIONES

Las fluorquinolonas tienen un mecanismo de acción único, que las convierte en uno de los grupos de antibacterianos más promisorios en

medicina veterinaria. Su actividad bactericida de amplio espectro y su versatilidad, particularidades que permiten su utilización en diversas especies animales, han dado lugar a una gran difusión de su uso. Si bien se trata de un grupo de drogas a las que las bacterias no desarrollan resistencia con facilidad, se han detectado cepas resistentes tanto en pacientes humanos como en animales. Esto implica que se deba proceder con mucho cuidado en su uso para evitar un aumento en la tasa de resistencia y la aparición de serios problemas de Salud Pública.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brown SA. Fluorquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1996; 19: 1-14.
2. Caputo JF, Brown SA, Papich MG. Pharmacokinetics of premafloxacin following single intravenous, oral solution or oral capsule dose to healthy Beagle dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 1997; 20 (Suppl. 1):60-61.
3. Anton MR, Martínez Larrañaga MR, Anadon, A. Plasma disposition of fleroxacin in broiler chickens following intravenous administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 1997; 20 (Suppl. 1): 198-199.
4. Van Den Hoven R. A multi-centre observational study on the efficacy of Dicural^a Palatabs^a (difloxacin) for the treatment of canine cystitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1997; 20 (Suppl. 1): 185-186.
5. Mengozzi G, Intorre L, Bertini S, Soldani G. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and intramuscular administration in sheep. *Am J of Vet Res*.1996; 57 (7): 1040-1043.
6. Altreuther P. Data on chemistry and toxicology of Baytril[®]. *Veterinary Medicine Reviews*. 1987; 2: 87-89.
7. Valdéz EFY, Castagneto HE. Farmacología clínica de las quinolonas de 3ra. generación. *Revista Argentina de Infectología* 1988; 3: 4-10.
8. Vancutsem PM, Babish JG, Schwark WS. The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Veterinarian*, 1990; 80: 173-186.
9. Bywater RJ. The control of infectious diseases: chemotherapy. In: *Veterinary Applied Pharmacology & Therapeutics*, 5th ed., Bailliere Tindall, London. 1991.
10. Sumano López H. Quinolonas y fluoroquinolonas en medicina veterinaria. *Veterinaria México* 1993; 24 (2): 83-92.
11. Abadía AR. Estudio farmacocinético de quinolonas: ciprofloxacina en perro. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, España. 1991 p.

352.

12. Dorfman M, Barsanti J, Budberg SC. Enrofloxacin concentrations in dogs with normal prostate and dogs with chronic bacterial prostatitis. *Am J of Vet Res.* 1995; 56 (3): 386-390.

13. Lewis, R. J., Tsai, F.T.F. ; Wigley, D.B. 1996. Molecular mechanisms of drug inhibition on DNA gyrase. *BioEssays*, 18 (8): 661-671.

14. Wolfson JS, Hooper DC. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1985; 28 (4): 581-586.

15. Anderson VE, Gootz TD, Osheroff N. Topoisomerase IV catalysis and the mechanism of quinolone action. *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 273 (28): 17879-17885.

16. Mariani KJ, Hiasa H. Mechanism of quinolone action: a drug-induced structural perturbation of the DNA precedes strand cleavage by topoisomerase IV. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; 272 (14): 9401-9409.

17. Brighty KE, Gootz TD. The chemistry and biological profile of trovafloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1997; 39 (Suppl. B): 1-14.

18. Drlica K, Zhao X. DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1997; 61 (3):377-392.

19. Fournier B, Hooper DC. Mutations in topoisomerase IV and DNA Gyrase of *Staphylococcus aureus*: novel pleiotropic effects on quinolone and coumarin activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998; 42 (1): 121-128.

20. Hooper DC, Wolfson JS, Ng EY, Swartz MN. Mechanisms of action of and resistance to ciprofloxacin. *The Am J of Med.* 1997; 82 (suppl. A4): 12-20.

21. Gorla N, García Ovando H, Larripa I. Chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed in vitro to enrofloxacin and ciprofloxacin. *Toxicology Letters*. 1999; 104 (1-2): 43-48.

22. Takayama S, Hirohashi M, Kato M, Shimada H. Toxicity of quinolone antimicrobial agents. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1995; 45: 1-45.

23. Mckellar QA. Clinical relevance of the pharmacologic properties of fluorquinolones. *Suppl Compend Contin Educ Pract Veterinary*. 1996;18 (2): 14-21.

24. Dudley MN. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics with special reference to the fluoroquinolones. *The American Journal Of Medicine*. 1991; 91 (suppl. 6A): 45s-50s.

25. Cester CC, Schneider M, Toutain PL. Comparative kinetics of two orally administered fluoroquinolones in dog: Enrofloxacin versus Marbofloxacin. *Revue de Medecine Veterinaire*. 1996;. 147 (10): 703-716.

26. Spreng M, Deleforge J, Thomas V, Boisramé B, Drugeon H. Antibacterial activity of marbofloxacin. A

new fluoroquinolone for veterinary use against canine and feline isolates. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1995; 18 :284-289.

27. Wetzstein HG, De Jong A. In Vitro bactericidal activity and postantibiotic effect of fluorquinolones used in veterinary medicine. *Suppl Compend Contin Educ Pract Vet*. 1996; 18 (2): 22-29.

28. Neer TM. Clinical pharmacologic features of fluoroquinolone antimicrobials drugs. *Journal American Veterinary Medicine Association*. 1998; 193 (5): 577-580.

29. Ziv G. Pharmacotherapeutics of antibacterial fluoroquinolones in small and large animal practice. . *Proceedings of the Sixth Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology*. Session 9: Antimicrobials and Chemotherapeutics, Edinburgh, Scotland. p. 194 . 1994.

30. Bauditz R. Results of clinical studies with Baytril® in calves and pigs . *Veterinary Medicine Reviews*. 1987; 2: 122-129.

31. Scheer M. Studies on the antibacterial activity of Baytril® . *Veterinary Medicine Reviews*. 1987; 2, 90-99.

32. Hannan PCT, Windsor GD, De Jong A, Schmeer N, Stegemann M. Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic Mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997; 41 (9): 2037-2040.

33. Anadón A, Martínez Larrañaga MR, Díaz MJ, Bringas P, Martínez MA, Fernandez Cruz ML, Fernandez MC, Fernandez R. Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens. *Am J of Vet Res*. 1995; 56 (4): 501-506.

34. Kaartinen L, Salonen M, Älli L, Pyörälä S. Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1995; 18: 357-362.

35. Küng K, Riond L, Wanner M. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1993; 16: 462-468.

36. Lekeux P, Art T. Effect of enrofloxacin therapy on shipping fever pneumonia in feedlot cattle. *Veterinary Record*. 1988; 123, 205-207.

37. Walser K, Gandorfer B, Steinberger A, Treitinger E, Winter T. Studies of the antibacterial activity and pharmacokinetics of enrofloxacin (Baytril®) in lactating cows. *Tierärztliche Umschau*. 1993; 48 (7): 414.

38. Aduriz J, Escobal I, Salazar LM, Contreras A, Marco JC. Efficacy of enrofloxacin during the lactation against mastitis caused by *Mycoplasma bovis* in dairy cattle. *Proceedings of the XIX World Buiatrics Congress*, Edinburgh, U.K., BCVA Publications. 1996.

39. Ball HJ, Reilly GAC, Bryson DG. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma bovis* strains isolated in North-

- ern Ireland. Irish Veterinary Journal, 48 (9):316-318.
40. Catarsini, O.; Balbo, S.m.; Pugliese, A.; Prato, F. 1991. Experiences with Baytril® in sheep. Veterinary Medicine Reviews. 1995; 61: 10-12.
41. Giguère S, Sweeney RW, Bélanger M. Pharmacokinetics of enrofloxacin in adult horses and concentration of the drug in serum, body fluids, and endometrial tissues after repeated intragastrically administered doses. Am J of Vet Res. 1996; 57 (7): 1025-1030.
42. Van Duijkeren E, Van Klingeren B, Vulto Ag, Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM, Breukink HJ, Van Miert ASJPAM. In vitro susceptibility to antimicrobial drugs of 62 Salmonella strains isolated from horses in The Netherlands. Vet Microbiol. 1995; 45 (1): 19-26.
43. Aarestrup FM, Jorsal SE, Jensen NE. Serological characterization and microbiological susceptibility of Streptococcus suis isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996. Vet Microbiol. 1998; 60 (1): 59-66.
44. Aarestrup FM, Friis NF. Antimicrobial susceptibility testing of Mycoplasma hyosynoviae isolated from pigs during 1968 to 1971 and during 1995 and 1996. Vet Microbiol. 1998; 61 (1-2): 33-39.
45. Salmon SA, Watts JL, Case CA, Hoffman CA, Wegener HC, Yancey Jr RJ. Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada, and Denmark. J of Clin Microbiol. 1995; 33, (9): 2435-2444.
46. Richez P, Dellac B, Froyman R. Pharmacokinetics and bioavailability of enrofloxacin in pigs after single and repeated in-feed medication with Baytril I.E.R. 2,5 %® [oral communications]. Proceedings of the Sixth Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Session 9: Antimicrobial and Chemotherapeutics, Edinburgh, Scotland. p. 207. 1994
47. Scheer M, Pirro F, Schmeer N. Baytril® IER 2.5 % - A new formulation for the oral application on swine - Antibacterial activity, pharmacokinetic and bioavailability. Tierärztliche Umschau. 1996; 51 (8): 489.
48. Schoning G, Plonait H. [Metaphylaxis and therapy of the MMA syndrome of sows with Baytril]. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 1990; 97 (1): 5-10.
49. Smith IM, Mackie A, Lida J. Effect of giving enrofloxacin in the diet to pigs experimentally infected with Actinobacillus pleuropneumoniae. Veterinary Record. 1991; 129 (2): 25-29.
50. Kyriakis SC, Tsilyiannis VK, Vlemmas J, Lekkas S, Petridou E, Sarris K. The efficacy of enrofloxacin in-feed medication by applying different programs for the control of post weaning oedema disease in weaned piglets. Zentralbl. Veterinarmed [B]. 1997; 44 (9): 523-528.
51. Bauditz R. Results of clinical studies with Baytril® in dogs and cats. Veterinary Medicine Reviews, 2, 137-140.
52. De Manuelle TC, Ihrke PJ, Brandt CM, Kass PH, Vulliet PR. Determination of skin concentrations of enrofloxacin in dogs with pyoderma. Am J Vet Res. 1988; 59 (12):1599-1604.
53. Pellerin JL, Bourdeau P, Sebbag H, Person JM. Epidemiosurveillance of antimicrobial compound resistance of Staphylococcus intermedium clinical isolates from canine pyodermas. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 1998; 21 (2): 115-133.
54. Piriz S, Valle J, Mateos EM, De La Fuente R, Cid D, Ruiz-Santaquiteria JA, Vadillo S. In vitro activity of fifteen antimicrobial agents against methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus intermedium. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 1996; 19 :118-123.
55. Hawkins EC, Boothe DM, Guinn A, Aucoin DP, Ngyuen J. Concentration of enrofloxacin and its active metabolite in alveolar macrophages and pulmonary epithelial lining fluid of dogs. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 1998; 21, 18-23.
56. Duval JM, Budsberg SC. Cortical bone concentrations of enrofloxacin in dogs. American Journal of Veterinary Research. 1995; 56 (2): 188-192.
57. Walker RD, Stein GE, Hauptman JG, MacDonald KH. Pharmacokinetics evaluation of enrofloxacin administered orally to healthy dogs. American Journal Of Veterinary Research. 1992; 53 (12): 2315-2319.
58. Breitschwerdt EB, Davidson MG, Aucoin DP, Levy MG, Szabados NS, Hegarty BC, Kuehne AL, James RL. Efficacy of chloramphenicol, enrofloxacin, and tetracycline for treatment of experimental Rocky Mountain spotted fever in dogs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1991; 35 (11):2375-81.
59. Kruse H, Hofshagen M, Thoresen SI, Bredal WP, Vollset I, Soli NE. The antimicrobial susceptibility of Staphylococcus species isolated from canine dermatitis. Veterinary Research Communication. 1996; 20 (3): 205-214.
60. Mateu-de-antonio EM, Martín M. In vitro efficacy of several antimicrobial combinations against Brucella canis and Brucella melitensis strains isolated from dogs. Veterinary Microbiology. 1995; 45 (1): 1-10.
61. Studdert VP, Hughes KL. Treatment of opportunistic mycobacterial infections with enrofloxacin in cats [clinical reports]. Journal American Veterinary Medicine Association. 1992; 201, (9): 1388-1390.
62. Kordick DL, Papich MG, Breitschwerdt EB. Efficacy of enrofloxacin or doxycycline for treatment of Bartonella henselae or Bartonella clarridgeiae infection in cats. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1997; 41 (11): 2448-55.
63. Bauditz R. Results of clinical studies with Baytril® in poultry. Veterinary Medicine Reviews. 1987; 2, 130-136.
64. Ortiz A, Froyman R, Kleven SH. Evaluation of enrofloxacin against egg transmission of Mycoplasma gallisepticum. Avian Diseases. 1995; 39 (4): 830-836.

65. Charleston B, Gate JJ, Aitken IA, Stephan B, Froyman R. Comparison of the efficacies of three fluoroquinolone antimicrobial agents, given as continuous or pulsed-water medication, against *Escherichia coli* infection in chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998; 42, (1): 83-87.
66. Barbour EK, Hamadeh S, Talhouk R, Sakr W, Darwish R. Evaluation of an enrofloxacin-treatment program against *Mycoplasma gallisepticum* infection in broilers. *Preventive Veterinary Medicine*. 1998; 35 (2): 91-99.
67. Jordan FT, Forrester CA, Ripley PH, Burch DG. In vitro and in vivo comparisons of valnemulin, tiamulin, tylosin, enrofloxacin, and lincomycin/spectinomycin against *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*. 1998; 42 (4): 738-745.
68. Sumano López H, Ocampo CL, Brumbaugh GW, Lizarraga RE. Effectiveness of two fluoroquinolones for the treatment of chronic respiratory disease outbreak in broilers. *British Poultry Sciences*. 1998; 39 (1): 42-46.
69. Heinen E, De Jong A, Scheer M. Antimicrobial activity of fluoroquinolones in serum and tissue in turkeys. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1997; 20 (Suppl. 1), 196-197.
70. Butaye P, Ducatelle R, De Backer P, Vermeersch H, Remon J, Haesebrouck F. In vitro activities of doxycycline and enrofloxacin against European *Chlamydia psittacci* from turkeys. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997; 41 (12):2800-2801.
71. Jordan F, Horrocks B, Froyman R. A model for testing the efficacy of enrofloxacin (Baytril) administered to turkey hens in the control of *Mycoplasma iowae* infection in hedges and embryos. *Avian diseases*. 1993; 37 (4):1057-1061.
72. Delaporte J, Froyman R, Ganiere JP, Florent J. Distribution of enrofloxacin within hatching eggs during drinking water treatment with Baytril 10 % oral solution in breeder turkeys [poster communications]. *Proceedings of the Sixth Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology*. Session 9: Anti-microbials and Chemotherapeutics, Edinburgh, Scotland. 1994; p. 235-236.
73. Froyman R, Scheer M, De Jong A. Serum kinetics of enrofloxacin in Pekin ducks during drinking-water medication with Baytril 10 % oral solution [Poster communications]. *Proceedings of the Sixth Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology*. Session 9: Anti-microbials and Chemotherapeutics, Edinburgh, Scotland. 1994; p. 236.
74. Lindenstruth H, Frost JW. Enrofloxacin (Baytril®) an alternative for official prophylaxis and treatment of psittacosis in imported psittacine birds. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 1993; 100 (9): 364-368.
75. Okerman L, Devriese LA, Gevaert D, Uyttendaele E, Haesebrouck F. In vivo activity of orally administered antibiotics and chemotherapeutics against acute septicemic pasteurellosis in rabbits. *Laboratory Animals*. 1990; 24 (4):341-344.
76. Dalsgaard I, Bjerregaard J. Enrofloxacin as an antibiotic in fish. *Proceedings of the V Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology*. 1991; p. 300-302.
77. Stoffregen DA, Chako AJ, Backman S, Babish JG. Successful therapy of furunculosis in Atlantic salmon *Salmo salar* L. using the fluoroquinolone antimicrobial agent enrofloxacin. *Journal of Fish Diseases*. 1993; 16 (3):219-228.
78. Williams PJ, Courtenay SC, Vasdy C. Use of enrofloxacin to control atypical *Aeromonas salmonicida* in Atlantic tomcod. *Journal of Aquatic Animal Health*. 1997; 9 (3):216-222.
79. Martinsen B, Oppegaard H, Wichstrom R, Myhr E. Temperature-dependent in vitro antimicrobial activity of four 4-quinolones and oxytetracycline against bacteria pathogenic to fish. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1992; 3, (8): 1738-1743
80. Raphael BL, Papich M, Cook RA. Pharmacokinetics of enrofloxacin after a single intramuscular injection in Indian star tortoises (*Geochelone elegans*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 1994; 25 (1):88-94.
81. Jacobson E. The desert tortoise and upper respiratory tract disease. *Tortuga Gazette*. 1991; 27 (7): 2-3.
82. Prezant RM, Isaza R, Jacobson ER. Plasma concentrations and disposition kinetics of enrofloxacin in Gopher tortoises (*Gopherus polyphemus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 1994; 25 (1): 82-87.
83. Wegener HC, Watts JL, Salmon SA, Yancey Jr RJ. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994; 32 (3):793-795.
84. Salmon SA, Watts JL, Aarestrup FM, Pankey JW, Yancey Jr. RJ. Minimum inhibitory concentrations for selected antimicrobial agents against organisms isolated from the mammary glands of dairy heifers in New Zealand and Denmark. *Journal Dairy Science*. 1998; 81, 570-578.
85. Speakman AJ, Binns SH, Dawson S, Hart CA, Gaskell RM. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from cats and a comparison of the agar dilution and E-test methods. *Veterinary Microbiology*. 1997; 54 (1): 63-72.
86. Aarestrup FM, Nielsen EM, Madsen M, Engberg J. Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997; 41 (10): 2244-50.
87. Alarcón T, López-Brea M. Mecanismo de acción y resistencia a fluorquinolonas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 1996; 14 (2): 111-117.
88. Dever A, Dermody TS. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Arch. Internal Medicine*. 1991; 151: 886-895.
89. Dowling PM, Wilson RC, Tyler JW, Duran SH. Phar-

- macokinetics of ciprofloxacin in ponies. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1995; 18, 7-12.
90. Appelbaum PC. Mechanism and frequency of resistance to temafloxacin. *American Journal of Medicine*. 1991; 91 (suppl.6A): 27-30s.
91. Li Z, Deguchi T, Yasuda M, Kawamura T, Kanematsu E, Nishino Y, Ishihara S, Kawada Y. Alteration in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of DNA topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998; 42 (12): 3293-3295.
92. Taba H, Kusano N. Sparfloxacin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: involvement of multiple mutations in gyrA and parC genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998; 42 (9): 2193-2196.
93. Weigel LW, Steward CD, Tenover FC. GyrA mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Esterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998; 42 (10): 2661-2667.
94. Willmott CJ, Maxwell A. A single point mutation in the DNA gyrase protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993; 37 (1): 126-127.
95. Levy SB. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1992; 36 (4): 695-703.
96. Kaatz GW, Seo SM. Mechanisms of fluorquinolone resistance in genetically related strains of *staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997; 41 (12): 2733-2737.
97. Bazile-pham-khac S, Truong Q, Lafont P, Gutmann L, Zhou X, Osman M, Moreau NJ. Resistance to fluorquinolones in *Escherichia coli* isolated from poultry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996; 40 (6): 1504-1507.
98. WHO. Emerging and other communicable diseases, surveillance and control. Report of a WHO Meeting: Use of quinolones in food animals and potential impact on human health, Geneva, Switzerland. 2-5 June 1998. 13 p, <http://www.who.int/emc>.
99. Abd El Kader A, Zakia Z, Khalid B. Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated in Morocco from chickens with colibacillosis. *Veterinary Microbiology*. 1995; 43 (4): 325-330.
100. Jacobs-Reitsma WF, Kan CA, Bolder NM. The induction of quinolone resistance in *Campylobacter* bacteria in broilers by quinolone treatment. *Letters in Applied Microbiology*. 1994; 9 (4): 228-231.

ENROFLOXACINA UNA FLUORQUINOLONA DE USO EXCLUSIVO EN VETERINARIA PARTE II: FARMACOCINÉTICA Y TOXICIDAD

J.L. Otero¹, N. Mestorino², J.O. Errecalde²

¹Departamento de Salud Pública Veterinaria.

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral

²Cátedra de Farmacología, Farmacotecnia y Terapéutica.

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

Resumen: La enrofloxacin, como todas las quinolonas, tiene una estructura basada en el anillo 4-quinolónico. La modificación fundamental respecto de las quinolonas más antiguas, como los ácidos nalidíxico y oxolínico ha sido la introducción de fluor como componente esencial de la molécula. La adición de fluor permite una penetrabilidad tisular y celular realmente sobresaliente, y que muy pocas sustancias antimicrobianas pueden alcanzar. Eso da lugar a ciertas particularidades farmacocinéticas, especialmente vinculadas a su distribución. La enrofloxacin es un antimicrobiano considerado poco tóxico. Sin embargo, existen informes de efectos tóxicos en algunas especies animales. Esto exige respetar algunas consideraciones para su empleo. El comportamiento farmacocinético y la toxicidad de la enrofloxacin, así como las recomendaciones generales para su uso, serán analizadas en el presente trabajo.

Palabras clave: Enrofloxacin, fluorquinolonas, antimicrobianos, farmacocinética, toxicidad.

ENROFLOXACIN: A FLUORQUINOLONE OF EXCLUSIVE USE IN VETERINARY. PART II: PHARMACOKINETIC AND TOXICITY.

Abstract: Enrofloxacin, like all the quinolones, has a structure based on the 4-quinolone ring. The fundamental change with respect to the oldest drugs, like nalidixic acid and oxolinic acid, has been the introduction of one atom of fluorine like an essential molecular component. The addition of fluorine allows a remarkable tissue and cellular penetrability, which is reached by few antimicrobial substances. This gives place to particular pharmacokinetic features, especially those involved in the distribution. Enrofloxacin is an antimicrobial compound considered as not so toxic. Nevertheless, there are reports of toxic effects in some animal species. In this papers, the pharmacokinetic behavior and the toxicity of the fluoroquinolones in general and enrofloxacin in particular, and the general recommendations for their use, are reviewed

Key words: enrofloxacin, fluoroquinolone, antimicrobials, pharmacokinetic, toxicity

Fecha de recepción: 10/08/00

Fecha de aprobación: 10/12/00

Dirección para correspondencia: J.L.Otero Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Litoral. R.P:Kreder 2805 (3080) Esperanza, Santa Fe.

E-mail: jotero@fcv.medvet.unlp.edu.ar

Farmacocinética

Las fluorquinolonas en general tienen buena absorción oral en animales (con la excepción de los rumiantes y probablemente de los equinos) y completa absorción parenteral; semividas de eliminación relativamente largas; gran volumen de distribución (2 a 4 litros/kg y aún más) y excelente penetración tisular (incluyendo fagocitos); eliminándose fundamentalmente por excreción renal y metabolismo hepático (1).

Absorción

En animales las fluorquinolonas tienen muy buena biodisponibilidad por vía oral en todas las especies animales, a excepción de los rumiantes (1, 2, 3). Vancutsem y col. (4) informaron que el tiempo de aparición del pico de concentración plasmática (T_{max}) de enrofloxacin administrada en forma oral a caballos, perros, pavos, pollos y terneros fue de 0,5; 0,9; 1,4; 2,5 y 5,4 horas, respectivamente.

Scheer (5) encontró que la enrofloxacin es fácil y rápidamente absorbida luego de la administración parenteral en terneros, cerdos, perros, gatos, pollos y pavos, alcanzándose concentraciones máximas dentro de las 0,5 a 2 horas; y que los niveles de la droga luego de su administración oral a cerdos y pollos son equivalentes a aquellos encontrados luego de la aplicación parenteral a las mismas dosis, lo cual sugiere buena absorción digestiva.

La absorción oral de enrofloxacin en bovinos es pobre (aproximadamente del 10 %) (4). Aunque los terneros pre rumiantes presentan las mismas pautas de absorción oral que las especies monogástricas se prefiere en ellos la vía parenteral. Si es necesaria la vía oral debe considerarse que los minerales presentes en los sustitutos lácteos pueden producir la quelación del antimicrobiano (4, 6). Por otra parte, se ha reportado una reducción temporaria de la densidad, viabilidad y actividad de los protozoos del rumen, con cierta depresión del metabolismo ruminal, luego de la administración oral de enrofloxacin (7).

En bovinos la enrofloxacin es extensamente absorbida luego de su administración subcutánea, con una biodisponibilidad mayor al 90 % (8, 9, 10). En vacas lecheras alcanzan concentraciones plasmáticas máximas (similares tanto para la vía s.c. como i.m.) dentro de las primeras 4 horas. En un ensayo la biodisponibilidad fue del 82 % luego de la administración I.M., y del 100 % luego de la s.c. (11).

En terneros la absorción es rápida, con una biodisponibilidad sistémica virtualmente completa, tanto por la vía s.c. como i.m. (10, 12).

En ovinos la biodisponibilidad de la enrofloxacin es baja luego de la administración oral, exigiendo el uso de dosis mayores por esta vía para alcanzar el éxito terapéutico (13). Sin embargo, es rápida y casi completamente absorbida y distribuida luego de su inyección i.m. (biodisponibilidad mayor al 85 %). La concentración plasmática máxima es rápidamente alcanzada y permanece alta varias horas, superando las concentraciones inhibitorias mínimas para la mayoría de los patógenos (14).

En equinos, donde otras fluorquinolonas no han demostrado buena absorción por vía oral (15), la enrofloxacin tiene una biodisponibilidad de aproximadamente 60 %, alcanzando concentraciones eficaces en plasma y tejidos, aún en animales no sometidos a ayuno (16, 17, 18). La absorción por vía i.m. es más lenta en esta especie, aparentemente debido al efecto irritante del preparado sobre el sitio de inyección (19).

La biodisponibilidad de la droga es alta tanto en cerdos sometidos a ayuno como en los que reciben alimentos en el momento de la administración (20, 21). Siempre que el consumo de alimentos no se encuentre afectado, la medicación con enrofloxacin en la ración provee, dentro de las 2 a 4 horas, concentraciones séricas y tisulares por encima de la CIM para muchos patógenos importantes en estos animales (22, 23). Una dosis oral de 10 mg/kg asegura concentraciones plasmáticas terapéuticamente eficaces durante 24 horas contra los patógenos más frecuentes en esta especie (24). La administración intramuscular permite una rápida absorción, con una biodisponibilidad mayor al 90 % (25, 26).

En perros la enrofloxacin es rápidamente absorbida por vía oral, con una biodisponibilidad del 72 % (27), aproximadamente el 83 % (28), o cercana al 100 % (29) según distintos autores. También es bien absorbida por la vía oral en gatos, con una biodisponibilidad de casi el 100 % (30).

Es considerable la absorción cuando se administra enrofloxacin por vía oral a pollos, con una biodisponibilidad cercana al 60 % (31, 32).

En conejos la biodisponibilidad es del 77 % para la administración s.c. y 61 % para la absorción gastrointestinal (33).

Distribución

En la mayoría de las especies animales el volumen de distribución de las fluorquinolonas es grande, siendo mucho mayor que el alcanzado por los betalactámicos y aminoglucósidos (1). Se alcanzan altas concentraciones en saliva y secreción nasal; en mucosa, epitelio y secreción bronquial (1), así como en el hígado y en el tracto urinario (4). Penetran bien en el tejido pulmonar, fluido de revestimiento y macrófagos alveolares, resultando en concentraciones mayores a las séricas (34). Varias quinolonas (incluyendo a la enrofloxacin) llegan con rapidez a la glándula mamaria (6).

Las fluorquinolonas penetran y alcanzan concentraciones intracelulares muy elevadas tanto en las células fagocíticas como en las no fagocíticas, con una gran actividad intracelular frente a un amplio rango de microorganismos (1, 35). Se ha demostrado que la fagocitosis y la muerte intracelular de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* es estimulada por la ciprofloxacina (36).

Scheer (5), informó en bovinos, porcinos, perros, gatos, pollos y pavos, una dispersión de la enrofloxacin en todos los órganos y tejidos, siendo la pauta de distribución muy similar en todas las especies estudiadas, con elevadas concentraciones. Los estudios farmacocinéticos en bovinos demostraron que la enrofloxacin es rápida y ampliamente distribuida en todo el organismo, con una excelente disponibilidad sistémica y una tasa de eliminación relativamente baja. La concentración plasmática media excede por mucho las CIM para los microorganismos patógenos más frecuentemente aislados en esta especie (8, 9, 10, 11, 37). En terneros, por ejemplo, se demostró la presencia del principio activo en todos los tejidos y fluidos muestreados, hallándose concentraciones mayores a las del suero -a la hora y después de 4 horas- en pulmones, riñones, hígado, corazón, nódulos linfáticos y pared intestinal. Luego de 12 horas de la aplicación las concentraciones permanecían más altas en los tejidos que en el suero, con los mayores valores en bilis y orina, y luego en orden decreciente, en hígado, riñones, corazón, pulmones y bazo. Las menores concentraciones se encontraron en cerebro (5).

En cerdos la droga es bien distribuida y completamente disponible luego de la inyección i.m., con una eliminación bastante lenta (25). Se encontraron niveles altos de enrofloxacin en mucosa nasal, septo nasal, pulmones, tejido linfático, músculo, hígado y pared intestinal de esta especie (5, 38).

En ovinos, la enrofloxacin administrada en forma i.m. es ampliamente distribuida en el organismo, con una biodisponibilidad mayor al 85 %, y un alto volumen de distribución (14). Las áreas bajo las curvas concentración - tiempo son similares para la administración i.v. e i.m. (biodisponibilidad 99 %) pero reducida para la oral (biodisponibilidad 60 %) (13).

En equinos, luego de administraciones intragástricas múltiples se alcanzan concentraciones superiores a las plasmáticas en hígado, riñón, bazo, líquido sinovial y orina; y similares o levemente mayores a las del plasma en: músculos, piel, corazón, pulmón, estómago, intestinos, vejiga, glándula mamaria y útero. Las concentraciones en líquido peritoneal son significativamente menores que las concentraciones séricas, y las concentraciones en cerebro, cristalino, humor vítreo y humor acuoso son de 10 al 20 % de las del suero (16, 17). Las concentraciones alcanzadas en orina son de 170 a 830 veces mayores que las concurrentes en el plasma (16).

Alta biodisponibilidad, amplia distribución y penetración en tejidos; concentraciones tisulares mayores a las del plasma y por encima de las CIM para los patógenos más comunes; y semivida de eliminación relativamente prolongada, son todas características del comportamiento farmacocinético de la enrofloxacin en perros (28, 39, 40), gatos (39), conejos (41, 42), pollos (31, 32, 43; 44) y pavos (45).

Metabolismo y excreción

Las fluorquinolonas son eliminadas del organismo principalmente por metabolismo hepático y excreción renal (4, 46). Por lo general son parcialmente metabolizadas en el hígado, y excretadas en bilis y orina a altas concentraciones de droga activa (droga inalterada o metabolito activo) (2). Las rutas metabólicas comunes de estos agentes son la dealquilación, glucuronización, oxidación, sulfoxidación, acetilación y ruptura del anillo piperazínico (1, 4). En animales la excreción renal es variable, aunque ocurre filtración glomerular para la fracción no ligada, y también secreción tubular activa (1). La filtración glomerular y la secreción tubular permiten alcanzar altas concentraciones urinarias. El proceso de secreción tubular es sensible al probenecid, y la excreción urinaria disminuye en el fallo renal (47).

El porcentaje de eliminación a través de la bilis varía entre las especies (4). La eliminación transepitelial a través de la pared gastrointestinal genera altas concentraciones en sitios de coloni-

zación de bacterias patógenas, e indudablemente contribuye a la alta eficacia de estos antimicrobianos en las enteritis bacterianas (47).

Existen indicios de que puede ocurrir circulación enterohepática de fluorquinolonas (1).

La enrofloxacin se metaboliza parcialmente a ciprofloxacina, la cual es responsable de una considerable parte de la actividad antimicrobiana (11, 14, 29, 32). El metabolismo se lleva a cabo en el hígado, y posiblemente en otros sitios como la ubre (37) o los macrófagos (40). El efecto de primer paso hepático es bajo, aproximadamente del 7 % (48). Las concentraciones plasmáticas del metabolito con respecto a la droga madre (AUC concentración - tiempo) son de 35-55 % en ovejas (14), 29 % en vacas (37) y 25 % en terneros (10).

En la tabla I se destacan algunos valores de los parámetros farmacocinéticos en distintas especies animales.

2. Toxicidad y efectos adversos. Interacciones Medicamentosas

Se han informado efectos tóxicos de las quinolonas sobre los sistemas nervioso, cardiovascular y gastrointestinal del hombre y de los animales, así como condrotoxicidad, toxicidad sobre la reproducción y el desarrollo, genotoxicidad, carcinogénesis y fototoxicidad (50, 54, 60).

La pobre estabilidad de las fluorquinolonas en orina ácida puede causar cristaluria renal en animales que no estén adecuadamente hidratados (47).

Tabla I: Algunos parámetros farmacocinéticos de la enrofloxacin en especies domésticas (se tomaron valores medios de cada ensayo, sin considerar desvío estándar)

Table I: Some pharmacokinetic parameters of the enrofloxacin in domestic species (the average of the values in each assay has been taken without considering may standard deviation)

ESPECIE	DOSIS y VIA	Cmax (µg/ml)	Tmax (horas)	Vd(ss) (L/kg)	t½β (h)	MRT (h)	MÉTODO ANALÍTICO	Ref.
Bovinos	5 mg/Kg i.v.	-	-	2.1	1.09	4.28	HPLC	(37)
Bovinos	5 mg/kg i.m.	0.73	2.40	-	5.90	7.98	HPLC/BioEns.	(11)
Bovinos	5 mg/kg s.c.	0.98	3.20	-	5.55	8.4	HPLC/BioEns.	(11)
Ovinos	2.5mg/kg i.v.	-	-	3.02	3.73	5.36	HPLC	(14)
Ovinos	2.5mg/kg i.m.	0.78	1.25	3.03	3.65	5.23	HPLC	(14)
Cerdos	2.5mg/kg i.m.	0.61	2.25	-	13.12	19.16	HPLC	(49)
Cerdos	2.5mg/kg i.v.	-	-	2.66	7.73	9.75	HPLC	(49)
Pollos	10 mg/kg PO	2.44	1.64	4.41	14.23	15.30	HPLC	(32)
Pollos	10 mg/kg i.v.	-	-	2.77	10.29	9.65	HPLC	(32)
Perros	5 mg/kg PO	1.44	1.8	2.6	2.7	4.5	HPLC	(28)
Perros	5 mg/kg i.v.	-	-	3.7	4.4	5.4	HPLC	(28)
Gatos	5 mg/kg i.v.	-	-	4.0	6.7	8.6	HPLC	(30)
Gatos	5 mg/kg PO	1.66	0.6	3.1	6.2	8.7	HPLC	(30)
Conejos	5 mg/kg PO	0.45	2.3	-	2.41	8.46	Bioensayo	(33)
Conejos	5 mg/kg i.m.	3.04	-	-	1.82	-	HPLC	(33)

Referencias: Tmax : Tiempo en que se alcanza la máxima concentración ; C max : Máxima Concentración plasmática; Vd : Volumen de distribución; T ½ : Semivida de eliminación; MRT : Tiempo medio de residencia; HPLC: Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento.

En la información suministrada por los fabricantes de la enrofloxacin se especifica que se han hecho pruebas de teratogenicidad, embriotoxicidad y mutagenicidad, con resultados de completa inocuidad, y que no hubo efectos indeseables en sistema nervioso central y cardiovascular, como así tampoco efectos alérgicos (61). Sin embargo, no se recomienda el uso de enrofloxacin en potrillos por ocasionar artropatía y defectos en cartílagos (4, 18), como tampoco en gatos y perros menores de 8 meses y 1 año respectivamente (47). A partir de ensayos en linfocitos humanos se ha informado un posible efecto genotóxico de la enrofloxacin (62).

La enrofloxacin es muy irritante cuando se administra por la vía intramuscular, ocasionando un marcado aumento de la creatinquinasa en suero e inflamación y dolor en el sitio de inyección en algunos casos (63, 64).

Las fluorquinolonas se antagonizan con macrólidos y tetraciclinas frente a estreptococos y enterococos y en general antagonizan también al cloramfenicol (1).

Las fluorquinolonas, incluida la enrofloxacin, disminuyen el clearance hepático y aumentan la semivida de eliminación de la teofilina y cafeína, induciendo un aumento en sus concentraciones séricas (1, 65).

Vancutsem y col. (66) demostraron que la enrofloxacin a niveles correspondientes a los usados en terapéutica causa una inhibición de las enzimas hepáticas P450IA1 y IA2. Por ello deben tomarse precauciones cuando se administra en forma conjunta con drogas que utilizan este sistema enzimático, tales como fenacetina, fenotiazinas y warfarina. Por otra parte, la enrofloxacin incrementa el contenido y estimula la actividad de la P450IIB, pero en forma leve a niveles terapéuticos, de modo que no debería afectar el metabolismo de otros compuestos metabolizados por la P450IIB, tales como el fenobarbital (66). Se ha encontrado que la enrofloxacin en dosis terapéuticas inhibe las monooxigenasas microsomales (citocromo P-450) en el hígado de pollos (67).

Se ha informado un incremento en la frecuencia e intensidad de los ataques en perros epilépticos bajo tratamiento con fenobarbital cuando se le administró enrofloxacin (4).

Recomendaciones para el uso de la enrofloxacin

Para el empleo de la enrofloxacin se imponen las recomendaciones generales que da la Organización Mundial de la Salud (68) para el uso de quinolonas en animales:

1) Las quinolonas, como cualquier agente antibiótico, nunca deben ser usadas como sustituto de las buenas prácticas de manejo de animales.

2) Las quinolonas deben ser administradas de acuerdo con los principios prudentes de uso, es decir, con aquellas prácticas que maximizan el efecto terapéutico a la vez que minimizan la emergencia de resistencia, y que incluyen:

a) tratamientos efectuados sólo bajo supervisión del veterinario, en animales a su cuidado, con registros escritos de uso;

b) tratamientos bajo un diagnóstico basado, siempre que sea posible, en cultivos bacterianos y test de susceptibilidad, con el apoyo de un mantenimiento de registro preciso en los establecimientos;

c) cuando los resultados del cultivo y la susceptibilidad bacteriana son conocidos, es preferible un antibiótico eficaz de espectro reducido antes que una quinolona.

3) Ninguna quinolona debería ser administrada a animales productores de alimentos, a menos que el producto haya sido evaluado y aprobado por autoridades competentes, incluyendo una evaluación completa que considere el potencial desarrollo de resistencia que pueda afectar a la salud pública. Deben alentarse programas de monitoreos posteriores a la aprobación para detectar tendencias hacia la emergencia de resistencia de significancia en salud pública, como también debe estimularse la utilización de los datos obtenidos de esos monitoreos para tomar medidas que sirvan para mitigar el desarrollo de resistencia.

4) La educación de los veterinarios y usuarios finales acerca de los principios de uso prudente es crítica para la implementación de los mismos, y debería cubrir los riesgos de seleccionar bacterias resistentes, la comprensión fundamental de los antimicrobianos y los conceptos del uso prudente. Los educadores veterinarios deberían ser alentados a asegurar que estos principios de uso prudente estén incluidos en las currículas veterinarias.

5) El registro de quinolonas debería ser sólo para uso terapéutico y no para aumentar el rendimiento. Deberían ser registradas sólo para prescripción farmacéutica veterinaria, con apropiada observancia de esa exigencia.

6) Debería ser desalentada la utilización de quinolonas en animales productores de alimentos para indicaciones ajenas a las permitidas.

CONCLUSIONES

La enrofloxacin se caracteriza por una muy buena actividad antimicrobiana, incluso contra microorganismos poco susceptibles o resistentes a los antimicrobianos de uso corriente en animales. Tiene un excelente comportamiento farmacocinético, con fácil administración, absorción casi completa y una distribución tisular que garantiza concentraciones inhibitorias mínimas frente a los microorganismos causantes de la mayoría de las enfermedades en los animales. Su índice terapéutico es alto, y puede administrarse sin mayores problemas en terapias combinadas con otros medicamentos. Representa, sin lugar a dudas, una excelente herramienta para el manejo clínico en medicina veterinaria. Sin embargo, datos toxicológicos y de resistencia antimicrobiana justifican cumplir con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud para el empleo de estos antimicrobianos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brown SA. Fluoroquinolones in animal health. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1996; 19, 1-14.
2. Neer TM. Clinical pharmacologic features of fluoroquinolone antimicrobials drugs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1988; 193 (5): 577-580.
3. Bauditz R. Results of clinical studies with Baytril® in dogs and cats. *Veterinary Medicine Reviews*. 1987; 2: 137-140.
4. Vancutsem PM, Babish JG, Schwark WS. The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Veterinarian*. 1990; 80: 173-186.
5. Scheer M. Concentrations of active ingredient in the serum and in tissue after oral and parenteral administration of Baytril®. *Veterinary Medicine Review*. 1987; 2: 104-118.
- 6-Sumano López, H. 1993. Quinolonas y fluoroquinolonas en medicina veterinaria. *Veterinaria México*, 24 (2) : 83-92.
7. Sadiq A. Effects of orally administered enrofloxacin (Baytril®) on the ruminal functions of adult cattle (in vivo). *Assiut Veterinary Medical Journal*. 1996; 35 (70): 114-129.
8. Martínez Larrañaga MR, Díaz MJ, Martínez MA, Frejo MT, Bringas P, Anadón A. Bioavailability of enrofloxacin after subcutaneous administration in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1997; 20 (Suppl. 1), p. 52.
9. Mckellar QA, Gibson I, Monteiro A, Bregante M. Pharmacokinetics study comparing enrofloxacin and danofloxacin in calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1997; 20 (Suppl. 1), 23-24.
10. Richez P, Dellac B, Froyman R, De Jong A. Pharmacokinetics of enrofloxacin in calves and adult cattle after single and repeated subcutaneous injections [poster communications]. *Proceedings of the Sixth Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Session 9: Anti-microbials and Chemotherapeutics, Edinburgh, Scotland.* . 1994;p. 232-234.
11. Kaartinen L, Salonen M, Älli L, Pyörälä S. Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1995; 18: 357-362.
12. Scheer M, De Jong A. Concentrations of fluoroquinolones in intestinal tract tissues after intramuscular administration to calves. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1997; 20 (Suppl. 1): 50-51.
13. Pozzin O, Harron DWG, Nation G, Tinson AH, Sheen R, Dhanasekharan S. Pharmacokinetics of enrofloxacin following intravenous/intramuscular/oral administration in Nedji sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1997; 20 (Suppl. 1): 60.
14. Mengozzi G, Intorre L, Bertini S, Soldani G. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and intramuscular administration in sheep. *American Journal Of Veterinary Research*. 1996; 57 (7): 1040-1043.
15. Dowling PM, Wilson RC, Tyler JW, Duran SH. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in ponies. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1995; 18: 7-12.
16. Giguère S, Sweeney RW, Bélanger M. Pharmacokinetics of enrofloxacin in adult horses and concentration of the drug in serum, body fluids, and endometrial tissues after repeated intragastrically administered doses. *American Journal Of Veterinary Research*. 1996; 57 (7): 1025-1030.
17. Giguère S, Bélanger M. Concentration of enrofloxacin in equine tissues after long term oral administration [short communications]. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1997; 20: 402-404.
18. Langston VC, Sedrish S, Boothe DM. Disposition of single-dose oral enrofloxacin in the horse. *Journal of*

Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 1996; 19: 316-319.

19. Pyörälä S, Panu S, Kaartinen L. Single-dose pharmacokinetics of enrofloxacin in horses [poster communications]. Proceedings of the Sixth Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, Edinburgh, Scotland. 1994; p. 45-46.

20. Gyrd-hansen N, Nielsen P. The influence of feed on the oral bioavailability of enrofloxacin, oxytetracycline, penicillin V and spiramycin in pigs [poster communications]. Proceedings of the Sixth Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, Edinburgh, Scotland. 1994;p.242-243.

21. Nielsen P. The influence of feed on the oral bioavailability of antibiotics/chemotherapeutics in pigs. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 1997; 20 (Suppl. 1), 30-31.

22. Banholzer E, Heinritzi K, Steinhausen G, Scheer M, Pedersen Mörner. Pharmacokinetics of enrofloxacin in slaughter pigs following different routes of administration. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 1997; 20 (Suppl. 1), p. 48.

23. Richez P, Dellac B, Froyman R. Pharmacokinetics and bioavailability of enrofloxacin in pigs after single and repeated in-feed medication with Baytril I.E.R. 2,5 % [oral communications]. Proceedings of the Sixth Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. Session 9: Anti-microbials and Chemotherapeutics, Edinburgh, Scotland. 1994; p. 207.

24. Nielsen P, Gyrd-hansen N. Bioavailability of enrofloxacin after oral administration to fed and fasted pigs. Pharmacol Toxicol 1997; 80 (5):246-250.

25. Pijpers A, Heinen E, De Jong A, Verheijden JHM. Enrofloxacin pharmacokinetics after intravenous and intramuscular administration in pigs. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 1997; 20 (Suppl. 1): 42-43.

26. Zeng Z, Fung K. Effects of experimentally induced Escherichia coli infection on the pharmacokinetics of enrofloxacin in pigs. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 1997; 20 (Suppl. 1): 39-40.

27. Cester CC, Schneider M, Toutain PL. Comparative kinetics of two orally administered fluoroquinolones in dog: Enrofloxacin versus Marbofloxacin. Revue Medecine Veterinaire. 1996; 147 (10): 703-716.

28. Monlouis JD, De Jong A, Limet A, Richez P. Plasma pharmacokinetics and urine concentrations of enrofloxacin after oral administration of enrofloxacin in dogs. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 1997; 20 (Suppl. 1): 61-63.

29. Küng K, Riond L, Wanner M. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dogs. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 1993; 16: 462-468.

30. Richez P, Monlouis JD, Dellac D, Daube G. Valid-

ation of a therapeutic regimen for enrofloxacin in cats on the basis of pharmacokinetic data. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 1997; 20 (Suppl. 1): 152-153.

31. Abd El Aziz MI, Aziz MA, Soliman FA, Afify NA. Pharmacokinetics evaluation of enrofloxacin in chickens. British Poultry Science. 1997; 38, (2): 164-168.

32. Anadón A, Martínez Larrañaga MR, Díaz MJ, Bringas P, Martínez MA, Fernandez Cruz ML, Fernandez MC, Fernandez R. Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in chickens. American Journal Of Veterinary Research. 1995; 56 (4): 501-506.

33. Broome RL, Brooks DL, Babish JG, Copeland DD, Conzelman GM. Pharmacokinetic properties of enrofloxacin in rabbits. American Journal of Veterinary Research. 1991; 52, (11): 1835-1841.

34. Wise R. Comparative penetration of selected fluoroquinolones into respiratory tract fluids and tissues. The American Journal Of Medicine. 1991; 91 (suppl. 6A): 67s-70s.

35. Pascual A, García I. Penetración y actividad intracelular de las fluorquinolonas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1998; 16 (3):138-143.

36. Wetzstein HG, De Jong A. In Vitro bactericidal activity and postantibiotic effect of fluorquinolones used in veterinary medicine. Suppl Compend Contin Educ Pract Vet. 1996; 18 (2): 22-29.

37. Malbe M, Salonen M, Fang W, Ööpik T, Jalakas M, Klaassen M, Sandholm M. Disposition of enrofloxacin (Baytril) into the udder after intravenous and intra-arterial injections into dairy cows. Journal of Veterinary Medicine A. 1996; 43: 377-386.

38. Ganière JP, Pedersen Mörner A, De Jong A, Monlouis JD, Richez P. Tissue distribution of intramuscularly administered enrofloxacin and danofloxacin in pigs. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 1997; 20 (Suppl. 1): 145-146.

39. Dorfman M, Barsanti J, Budsberg SC. Enrofloxacin concentrations in dogs with normal prostate and dogs with chronic bacterial prostatitis. American Journal of Veterinary Research. 1995; 56 (3): 386-390.

40. Hawkins EC, Boothe DM, Guinn A, Aucoin DP, Ngyuen J. Concentration of enrofloxacin and its active metabolite in alveolar macrophages and pulmonary epithelial lining fluid of dogs. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 1998; 21: 18-23.

41. Aramayona JJ, Mora J, Fraile LJ, García MA, Abadía AR, Bregante M.A. Penetration of enrofloxacin and ciprofloxacin into breast milk, and pharmacokinetics of the drugs in lactating rabbits and neonatal offspring. American Journal Veterinary Research. 1996; 57 (4): 547-553.

42. Cabanes A, Arboix M, García Anton JM, Reig F. Pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intramuscular injection in rabbits. American Journal of Veterinary Research. 1992; 53 (11): 2090-2093.

43. Ganière JP, Hervouet P, Delaporte J, Froyman R. Serum kinetics of enrofloxacin in chickens during continuous drinking water medication. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1997; 20 (Suppl. 1): 202-203.
44. Kietzmann M, Knoll U, Glünder G. Pharmacokinetics of enrofloxacin and danofloxacin in broiler chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1997; 20 (Suppl. 1): 202.
45. Heinen E, De Jong A, Scheer M. Antimicrobial activity of fluoroquinolones in serum and tissue in turkeys. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1997; 20 (Suppl. 1): 196-197.
46. Dudley MN. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibiotics with special reference to the fluoroquinolones. *The American Journal Of Medicine*. 1991; 91 (suppl. 6A): 45s-50s.
47. Mckellar QA. Clinical relevance of the pharmacologic properties of fluorquinolones. *Suppl Compend Contin Educ Pract Vet*. 1996; 18 (2): 14-21.
48. Cester CC, Toutain PL. A comprehensive model for enrofloxacin and ciprofloxacin transformation and disposition in dog. *Journal of Pharmacol. Sciences*. 1997; 86 (10):1148-1155.
49. Richez P, Pedersen Mörner A, De Jong A, Monlouis JD. Plasma pharmacokinetics of parenterally administered danofloxacin and enrofloxacin in pigs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1997; 20 (Suppl. 1): 41-42.
50. Schlüter G. Ciprofloxacin: review of potential toxicologic effects. *American Journal of Medicine*. 1987; 82 (suppl. 4A): 91-93.
51. Corrado ML, Struble WE, Chennekatu P, Hoagland V, Sabbaj J. Norfloxacin: review of safety studies. *American Journal of Medicine*. 1987; 82 (suppl. 6B): 22-26.
52. Wolfson JS, Hooper DC. Overview of fluoquinolone safety. *American Journal of Medicine*, 91 (suppl 6A): 153s-161s.
- 53- Burkhardt, J.e.; Hill, M.a.; Carlton, W.w. 1992. Morphologic and biochemical changes in articular cartilages of immature beagle dogs dosed with difloxacin *Toxicol Pathol*. 1991; 20 (2): 246-252.
54. Takayama S, Hirohashi M, Kato M, Shimada H. Toxicity of quinolone antimicrobial agents. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1995; 45: 1-45.
55. Shimada H, Itoh S. Effects of new quinolone antibacterial agents on mammalian chromosomes. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1997; 47: 115-123.
56. Dellamonica P, Dunais B. Tolerability of fluorquinolones: focus on pefloxacin. *Clin Drug Invest*. 1996; 11 (Suppl. 2): 36-42.
57. Spavone F, Woehrle F, Guichard Y, Thibaud D, Bardon T. In vivo study of flumequine toxicity on juvenile canine cartilage. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1997; 20 (Suppl. 1): 257-258.
58. Menschik M, Neumüller J, Steiner CW, Erlacher L, Köller M, Ullrich R, Graninger W, Graninger WB. Effects of ciprofloxacin and ofloxacin on adult human cartilage In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997; 41 (11): 2562-2565.
59. Schmuck G, Schürmann A, Schlüter G. Determination of the excitatory potencies of fluoroquinolones in the central nervous system by an In Vitro model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998; 42 (7): 1831-1836.
60. Yoshida K, Yabe K, Nishida S, Yamamoto N, Ohshima C, Sekiguchi M, Yamada K, Furuhashi K. Pharmacokinetic disposition and arthropathic potential of oral ofloxacin in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 1998; 21: 128-132.
61. Altreuther P. Data on chemistry and toxicology of Baytril(. *Veterinary Medicine Reviews*. 1998; 2: 87-89.
62. Gorla N, García Ovando H, Larripa I. Chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed in vitro to enrofloxacin and ciprofloxacin. *Toxicol Lett*. 1999; 104 (1-2): 43-48.
63. Kaartinen L, Panu S, Pyörälä S. Pharmacokinetics of enrofloxacin in horses after single intravenous and intramuscular administration. *Equine Veterinary Journal*. 1997; 29 (5):378-381.
64. Pyörälä S. Local tissue damage in cows after intramuscular injections of eight antimicrobial agents. *Acta veterinaria scandinavica*. 1994; 35: 107-110.
65. Intorre L, Mengozzi G, Maccheroni M, Bertini, S Soldani G. Influence of enrofloxacin on theophylline steady-state serum concentration in the dog [poster communications]. *Proceedings of the Sixth Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology*, Edinburgh, Scotland. 1994; p.100.
66. Vancutsem PM, Babish JG. In vitro and in vivo study of the effects of enrofloxacin on hepatic cytochrome P-450. Potential for drug interactions. *Veterinary and Human Toxicology*. 1996; 38 (4): 254-259.
67. Shlosberg A, Ershov E, Bellaiche M, Hanji V, Weisman Y, Soback S. The inhibitory effects of the fluorquinolone antimicrobials norfloxacin and enrofloxacin on hepatic microsomal cytochrome P-450 monooxygenases in broiler chickens. *Drug Metabol Drug Interac*. 1997; 14 (2):109-122.
68. WHO. Emerging and other communicable diseases, surveillance and control. Report of a WHO Meeting: Use of quinolones in food animals and potential impact on human health, Geneva, Switzerland. 2-5 June 1998. 13 p, <http://www.who.int/emc>.

PERITONITIS BILIAR POR COLELITIASIS CON PERFORACIÓN DE LA VESÍCULA BILIAR EN UN PERRO. PRESENTACIÓN DE UN CASO

D. Arias², L. Klima¹, R. Rodriguez^{1,2}, A. Cruz², G. Bigeon², M. Tortora², M. Villanueva², N. Stanchi³

¹Servicio de Diagnóstico por imágenes. ²Servicio de Cardiología. ³Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

Resumen: La colelitiasis es una de las múltiples causas del síndrome de Obstrucción Biliar Ductal Extrahepática (OBDE). Los colelitos son raros en los pequeños animales. Si bien no hay relación con raza y sexo la mayoría de los casos registrados se dieron en animales de más de dos años. En el presente trabajo se describen las características clínicas y métodos complementarios que permitieron llegar al diagnóstico de colelitiasis con ruptura de la vesícula biliar y su posterior resolución quirúrgica.

Palabras clave: Colelitiasis, caninos

CHOLELITHIASIS GALLBLADDER PERFORATION, AND BILE PERITONITIS IN A DOG. A CASE REPORT

Abstract: The cholelithiasis is one of the multiple causes of the syndrome of the Biliar Ductal Extrahepatic Obstruction. Colelitos are strange in the small animals. Although there is not relationship with race and sex most of the registered cases were given in animals of more than two years. In this work the clinical characteristics and complementary methods are described that allowed to arrive to the colelithiasis diagnosis with rupture of the vesicle biliar and their later surgical resolution.

Key words: Colelitiasis, dog

Fecha de recepción: 24/05/00

Fecha de aprobación: 09/08/01

Dirección para correspondencia: D.O.Arias. Servicio de Cardiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. C.C. 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: darias@fcv.medvet.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La colelitiasis es una de las múltiples causas del síndrome de Obstrucción Biliar Ductal Extrahepática (OBDE). Los colelitos son raros en los pequeños animales. Si bien no hay relación con raza y sexo la mayoría de los casos registrados se dieron en animales de más de dos años (1, 11).

Se reconocen como causas predisponentes; deshidratación, infección bacteriana, evacuación biliar infrecuente, en la anorexia y cambios en la composición de la bilis (1, 2). Generalmente su composición química es una mezcla de bilirrubina, colesterol, bilis, magnesio, oxalatos y calcio, de este último elemento depende su radiopacidad (8, 9, 13).

Los signos clínicos, si bien inespecíficos, suelen incluir una historia de emesis, dolor abdominal e ictericia. En cuanto a los datos de laboratorio los más llamativos son: aumento de la bilirrubinemia, fundamentalmente de la fracción conjugada, junto con valores incrementados de Fosfatasa Alcalina Sérica (FAS) y Alanin Amino Transferasa (ALT) (5, 6). Ultrasonográficamente se observa una imagen hiperecoica lineal, con sombra posterior en correspondencia anatómica con la vesícula biliar (8, 9, 13).

La ruptura de la vesícula biliar es poco frecuente en pequeños animales y las causas son múltiples y variadas (Tabla 1) (1). El tratamiento de la ruptura de la vesícula o de los conductos biliares es quirúrgico y el pronóstico es de reservado a grave según el tiempo transcurrido entre la ruptura, el diagnóstico y la resolución quirúrgica (1, 2, 5, 6).

PRESENTACIÓN DEL CASO

Un canino hembra, de raza doberman de 10 años de edad y 30 kg de peso fue derivado con antecedentes de inapetencia y vómitos, con una evolución de 7 días, presuntivamente debido a la ingestión de un cuerpo extraño (hueso) según la referencia del propietario. Clínicamente el estado general era bueno con una temperatura de 38,7 °C, dolor difuso a la palpación abdominal, con mucosas aparentes rosadas, llenado capilar normal y pulso de 160 por minuto. La auscultación torácica y cardíaca no evidenció alteraciones.

DIAGNÓSTICO

Se indicó un estudio radiográfico simple de abdomen en posición latero lateral y ventrodorsal, que fue realizado 72 h posteriores a la primera consulta, observándose una estructura esca-

samente radiodensa de forma irregular y de aproximadamente 2 cm de diámetro, localizada en epigastrio ventral, ligeramente caudal al píloro, compatible con cuerpo extraño. También se apreció una imagen en vidrio esmerilado (compatible con peritonitis) en correspondencia con el área epi y mesogástrica. No se observaron signos sugerentes de obstrucción intestinal. El estudio ultrasonográfico reveló la presencia de una imagen hiperecoica semicircular de 24 mm, con sombra posterior, localizada topográficamente en el área de la vesícula biliar. Al no ser observada la imagen de esta se sospechó una ruptura de vesícula biliar por colelito. Además la presencia de una imagen ecográficamente compatible con peritonitis coincidió con los hallazgos radiográficos (8, 9, 13).

La bioquímica sérica reveló: hiperbilirrubinemia, incremento en la actividad de la FAS, y ALT e hipoproteinemia (Tabla 2).

En ese momento, clínicamente el paciente mostraba un deterioro de su estado general, anorexia y una marcada ictericia de las mucosas aparentes.

En base a estos hallazgos se decidió practicar una laparotomía exploratoria, con abordaje mediano xifopúbico. Durante la misma se constató la presencia de efusión francamente icterica, peritonitis biliar, mesenterio, grasa abdominal ictericas y ganglios mesentéricos infartados. En relación a la zona central de la cara visceral del hígado se halló libre un cálculo de forma esferoidal y de color pardo verdoso de 2,5 cm de diámetro, adyacente a la vesícula biliar y al ser inspeccionada se comprobó que se hallaba colapsada y con un desgarro en la cara hepática.

El desgarro de la pared vesicular se suturó con un patrón de puntos simples y sobre ésta una sutura continua de Lembert utilizando en ambos casos Maxon 4/0. Se realizaron 4 lavados de la cavidad abdominal con solución fisiológica utilizando 4 litros por lavado hasta que la solución aspirada fue transparente. Se colocaron 2 drenajes de Penrose en la proximidad de la vesícula extrayéndolos por dos incisiones paramedianas en la pared abdominal. Se realizó la síntesis de la laparotomía en la forma habitual y vendaje abdominal con apósitos absorbentes estériles (pañal sanitario) que se cambiaron cuatro veces por día (2, 12).

En el posoperatorio se administraron soluciones parenterales de Ringer y solución salina isotónica (0,9 %) a través de un catéter endovenoso.

so colocado en la vena cefálica antebraquial durante 72 h.

La antibióticoterapia consistió en metronidazol 10 mg por kg cada 8 h, EV durante 3 días continuando luego por vía oral asociado con enrofloxacin 10 mg por kg IM cada 12 h durante 2 semanas. Se complementó con vitamina K, 1 mg por kg cada 12 h por vía SC durante 5 días. Se indicó ayuno total por 24 h instaurándose luego dieta hipograsa. El tiempo de recuperación total fue de 10 días, en ese momento además se retiraron los puntos de sutura.

La constitución química del cálculo era una mezcla de bilirrubina, colesterol, Ca y Mg. El estudio bacteriológico del mismo fue negativo tanto para microorganismos aerobios como anaerobios.

DISCUSIÓN

La obstrucción ductal biliar extrahepática con posterior ruptura de vesícula es una entidad sumamente infrecuente en Medicina Veterinaria (1, 2, 3, 4, 7), lo llamativo y característico del cuadro clínico la convierten en una patología que difícilmente pueda pasar subdiagnosticada o no diagnosticada. En este caso el examen clínico permitió inferir una enfermedad hepatobiliar, pero fueron los métodos de diagnóstico complementarios que confirmaron la sospecha clínica y la colelitiasis con posible posterior ruptura de vesícula biliar. La confirmación se logró mediante la laparotomía exploratoria tras lo cual se llevó a cabo su resolución quirúrgica. Considerando el pronóstico grave de la OBDE, tanto por sus características clínicas como por lo dificultoso de su resolución quirúrgica el diagnóstico precoz a través de la utiliza-

TABLA 1 Causas más frecuentes de Obstrucción Biliar Ductal Extrahepática.

Table 1. More frequent causes of Biliar Ductal Extrahepatic Obstruction.

Neoplasias	Biliar Pancreática Duodenal Linfática
Estenosis	Trauma Pos pancreatitis Pos duodenitis
Obstruccion Extraluminal	Abscesos hiliares
Colelitiasis	Composicion mixta Pigmento Colesterol (Raro)
Inflamatorias de Origen Desconocido	Hepatitis Activa Crónica Colangiohepatitis
Síndrome de la bilis lodosa	
Parásitos	Nematodos Trematodos Hepáticos
Degenerativas	Cirrosis Lipidosis <i>Platynosomum concinnum</i>
Causas de ruptura de Vesícula Biliar	
Trauma Romo	(accidente automovilístico, patadas, golpes por caída etc.)
Trauma Agudo	(elementos lacerantes, armas de fuego)
Iatrogenia	(Biopsia percutanea, endoscopia, cirugia, laparoscopia)
Ruptura patológica	como secuela de litiasis, infeccion, neoplasia.

TABLA 2 Resultados de los análisis bioquímicos y hematológicos realizados al animal afectado
Table 2. Biochemical and hematological results of animal blood.

Suero	valor obtenido	Valor normal
Bilirrubina total	2,31 mg/dl	0.1 a 0.6 mg/ dl
Bilirrubina directa	1,55 mg/dl	0.06a 0.12 mg/dl
Bilirrubina indirecta	0,75 mg/dl	
Proteínas totales	4,4 g/dl	5.3 a 7,8 g/l
Albúmina	2 g/dl	2,3 a 3,2 g/l
Globulina	2,4 g/dl	3,1 a 4,6 g/l
Relación albúmina globulina	0,83	0.69 a 0,74
Fosfatasa Alcalina Sérica (FAS)	450 UI	< a 115 U/L
Alanin Amino Taransferasa (ALT)	21,1 UI	< a 30 U/L
Hematología		
Hematocrito	32 %	x 45 %
Hemoglobina	9,8 g/dl	x 15 mg/dl
Glóbulos Blancos	13 800 por mm ³	x 9000 / mm ³
Glóbulos Rojos	3 800 000 por mm ³	6800000/mm ³
Formula Leucocitaria Relativa		
Neutrófilos	94	57 a 79
Eosinófilos	2	0 a 5
Linfocitos	2	12 a 32
Monocitos	2	0 a 5
Basófilos	0	0 a 1

ción rutinaria de los métodos complementarios de diagnóstico permitiría prevenir la ruptura vesicular o ductal y llevaría a una prognosis más favorable.

BIBLIOGRAFÍA

1.Fossum, T,W, Willard MD. Diseases of the gallbladder and extrahepatic biliary system. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and cat. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1995: 1393-8.

2.Church EM, Matthiiesen DT. Surgical treatment of 23 dogs whit necrotizing cholecystitis. J Am Anim Hosp Assoc 1988; 24: 305-10.

3.Hager DA. Diseases of the gallbladder on the extrahepatic biliary system. In: Ettinger SJ, ed. Texbook of Veterinary Internal Medicine, Diseases of the dog and cat. 3rd Philadelphia: W.B. Saunders, 1989: 1555-8.

4.Harris, S. Obstructive Cholelitiasis and Gallbladder Rupture in a Dog. J. Small Animal Practice. 25: 661-667; 1984

5.Kirpenstijn J, Fingland RB, Ulrich T, Sikkema DA, Allen SA. Cholelitiasis in dogs: 29 cases (1980-1990). J Am

Med Assoc 1993; 202: 1137-42

6.Neer, M.: A review of Disorders of the Gallbladder and Extrahepatic Biliary Tract in the Dog and Cat. J Vet Inter Med. 1992; 6: 186-192.

7.Nelson R, Couto G. Pilares de Medicina Interna en Animales Pequeños. Ed. Intermédica 1995. Pag. 363 a 403

8.Nyland T, Mattom J. Veterinary Diagnostic Ultrasound Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1995. Pag 52-72.

9.Reed AL. Ultrasonographic findings of diseases of the gallbladder and biliary tract. Vet Med 1995; 90: 950-8.

10.Reed A. Ecografía en la Colecistopatía y Patología Biliar. Selecciones Veterinarias 1998. 6, (1): 54-58

11.Kirpensteijn J, Fingland RB, Ulrich T, Sikkema DA, Allen SA. Cholelitiasis in Dogs: 29 cases (1980-1990) JAVMA 1993; 202:1137-42.

12. Bojrab J. Fisiopatología y Clínica Quirúrgica en animales Pequeños. Editorial Intermédica. Segunda Edición 1996: 324-5

13. Anderson NV, Veterinary Gastroenterology Second Edition. Lea&Febiger. London. 1992

EFFECTO DE LAS LLUVIAS SOBRE LA COMPOSICIÓN MINERAL DE GRAMÍNEAS Y *Lotus glaber mill* DEL PARTIDO DE MAGDALENA

C.M. Tittarelli¹, M.J. Giuliadori², G.A. Mattioli³, C.E. Ramírez^{1†}

¹Cátedra de Fisiología, ² Cátedra de Patología Médica,

³Centro de Diagnóstico Veterinario (CEDIVE).

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

Resumen: Los excesos hídricos incrementan la absorción de Fe por el forraje y éste puede reducir la captación de Cu y Zn. En el partido de Magdalena en los años donde aumentó el régimen de lluvias se registraron mayores prevalencias de hipocuprosis bovina. El objetivo del presente trabajo es establecer los cambios provocados por el exceso hídrico del suelo sobre la composición mineral del forraje. En doce establecimientos del partido de Magdalena, entre marzo y diciembre de 1997, se tomaron 76 muestras pareadas de *Lotus glaber Mill* (= *Lotus tenuis Waldst. et Kit. ex Wild.*) y gramíneas durante períodos secos y húmedos. Las muestras se sometieron a digestión ácida y se determinó el contenido de Cu, Fe, Mn y Zn por espectrofotometría de absorción atómica y el de S por titulación con arsenazo III. Los datos se analizaron mediante test de T y análisis de varianza. El contenido de Fe aumentó significativamente durante los períodos húmedos: 579 vs 206 ppm en L. glaber y 858 vs 104 ppm en gramíneas. El L. glaber presentó mayores concentraciones de Cu y Zn que las gramíneas. El contenido de Cu aumentó significativamente en las gramíneas durante el período húmedo y en el L. glaber no se modificó. El Mn aumentó significativamente en el L. glaber durante el período húmedo.

Palabras clave: hipocuprosis, minerales, forrajes, excesos hídricos, hierro.

RAINFALL EFFECT ON GRASS AND LOTUS GLABER MILL. MINERAL COMPOSITION FROM MAGDALENA DISTRICT

Abstract: Water excess increases forage Fe absorption, and in turn, Fe can reduce both Cu and Zn uptake by roots. It is known that Cu deficiency prevalence in cattle is higher when annual rainfall in Magdalena district is heavier. Our objective is to assess the changes in forage mineral composition caused by water excess in soil. Seventy six samples of *Lotus glaber Mill*. (= *Lotus tenuis Waldst. et Kit. ex Wild.*) and accompanying grass were taken, during dry and wet periods, in 12 beef breeding farms from Magdalena district, from march through December 1997. Samples were acid digested, and Cu, Fe, Mn and Zn concentration was measured by atomic absorption, whereas S content was measured by Arsenaze III titration. Data were analyzed by T test and variance ($p < 0.05$). Iron concentration increased during wet periods: 579 vs 206 ppm for L. glaber and 858 vs 104 for grass samples ($p < 0.05$). L. glaber samples had higher Cu and Zn contents than grass samples. Copper concentration increased in grass samples ($p < 0.05$). Manganese concentration increased in L. glaber samples during wet periods ($p < 0.05$).

Key Words: hipocuprosis, minerals, forage, water excess, Iron.

Fecha de recepción: 02/08/00

Fecha de aprobación: 12/07/01

Dirección para correspondencia: C.M. Tittarelli. Cátedra de Fisiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC296 (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: titareli@fcv.medvet.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La composición mineral del forraje depende de una compleja interacción entre la planta y los componentes del suelo, éstos pueden alterarse por los excesos hídricos (1, 2, 3). Estos eventos pueden aumentar las concentraciones de Fe, y éste a su vez puede reducir la absorción de Cu y Zn por las plantas (4). Por otro lado, el aumento del régimen de lluvias coincide con una mayor incidencia de hipocuprosis bovina en el partido de Magdalena, Provincia de Buenos Aires (5). Esta deficiencia tiene carácter endémico en la zona, y se debe a bajas concentraciones de Cu, sumadas a elevadas concentraciones de Fe y S en el forraje, que actuarían como factores de interferencia en la nutrición del animal (6). En el marco de un programa de estudio de la hipocuprosis en la zona, se decidió realizar un ensayo con el objetivo de establecer los cambios provocados por el exceso hídrico del suelo sobre la composición mineral del forraje. Se incluyó la medición de los elementos indicados como responsables de la deficiencia: Cu, Fe y S. Asimismo se evaluó el Zn, para corroborar si éste también sufría interferencias, y el Mn, debido a que existen concreciones ferromangánicas en el subsuelo de la zona (7), que podrían actuar como dadores de ambos elementos. Debido a que los pastizales naturales son la principal fuente forrajera en la zona, se decidió trabajar con gramíneas naturales y una leguminosa, el *Lotus glaber* Mill (= *Lotus tenuis* Waldst. et Kit. ex Wild.), especie naturalizada y caracterizada por su tolerancia al anegamiento y por su gran aptitud de resiembra natural (8, 9).

MATERIALES Y MÉTODOS

En 12 establecimientos del partido de Magdalena, desde marzo a diciembre, se tomaron 76 muestras pareadas de *L. glaber* y gramíneas durante períodos secos, sin precipitaciones, y períodos húmedos, después de las lluvias. La altura de corte de las especies se realizó intentando que la muestra recolectada reflejara lo consumido por los bovinos, acción que se observó directamente durante el pastoreo realizado por los animales.

Las muestras se lavaron 3 veces con agua bidestilada y se secaron en estufa a 60 °C hasta peso constante. Posteriormente se molieron con molino Willey hasta pasar un tamiz de 0,2 mm y se sometieron a digestión húmeda con ácido nítrico: ácido perclórico 2:1.

Se determinó el contenido de Cu, Fe, Mn y Zn por espectrofotometría de absorción atómica de llama (GBC 902) y el de S por combustión en frasco de oxígeno y titulación con arsenazo III (10). La concentración de los elementos se expresó en relación al contenido de materia seca (MS) del forraje.

Los datos se analizaron estadísticamente mediante test de T y análisis de varianza, empleando un nivel de significancia de 95 % ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Las medidas de promedio, error estándar, valores máximos y mínimos y el porcentaje de muestras con niveles críticos, por deficiencia o

Tabla 1: Contenidos de minerales en 76 muestras pareadas de gramíneas y *L. glaber* del partido de Magdalena. Los valores de concentración están referidos a materia seca.

Table 1: Mineral content of 76 paired grass and *L. glaber* samples from Magdalena District. Values are given on dry matter.

	Cu ppm		Fe ppm		Mn ppm		Zn ppm		S %	
	Gram.	Lotus	Gram.	Lotus	Gram.	Lotus	Gram.	Lotus	Gram.	Lotus
X	7,2 ^a	11,5 ^b	383 ^a	390 ^a	68,2 ^a	74,5 ^a	30 ^c	35,5 ^d	0,37 ^a	0,29 ^b
±ES	±0,4	±0,4	±56	±95	±5,4	±5,7	±2,1	±1,5	±0,02	±0,02
Máx.	14,2	18,6	1417	2440	140	170	52,5	50,8	0,67	0,41
Mín.	2,8	7,1	74,7	66,3	13,8	37,7	2,1	17,5	0,21	0,21
%NC	66	3	50	33	21	6	42	24	75,67	40,54

NC: Nivel crítico de deficiencia: Cu (<8 ppm), Mn (<40 ppm) y Zn (<30 ppm) (13)

Niveles críticos de exceso: Fe (> 250 ppm) y S (>0,3%). (13; 12)

Letras diferentes indican diferencias significativas: a b ($p < 0,01$) y cd ($p < 0,05$).

Gram: Gramínea

Tabla 2: Contenidos de minerales en 38 muestras de gramíneas durante períodos seco y húmedo y porcentaje de muestras con niveles críticos. Los valores de concentración están referidos a materia seca.

Table 2: Mineral content of 38 grass samples during dry and wet periods, including percentage of samples below critical levels. Values are given on dry matter.

	Cu ppm		Fe ppm		Mn ppm		Zn ppm		S %	
	Seco	Húmedo	Seco	Húmedo	Seco	Húmedo	Seco	Húmedo	Seco	Húmedo
X	6,4 ^c	8,1 ^d	206 ^a	579 ^b	60 ^a	77 ^a	31 ^a	29 ^a	0,394 ^a	0,345 ^a
± ES	±0,3	±0,7	±,29	± 96	± 6,8	± 8,9	± 2,4	± 3,5	± 0,02	±0,02
Máx.	8,5	14,2	518	1417	140,1	132,4	52,5	47,8	0,668	0,559
Mín.	2,9	2,8	74,7	176,4	15,3	13,8	8,9	2,1	0,245	0,206
%NC	85	44,5	30	72,2	20	22,2	45	38,9	78,9	72,2

NC: Nivel crítico de deficiencia: Cu (<8 ppm), Mn (<40 ppm) y Zn (<30 ppm) (13)

Niveles críticos de exceso: Fe (> 250 ppm) y S (>0,3%). (13, 12)

Letras diferentes indican diferencias significativas: a b (p<0,01) y cd (p<0,05).

Tabla 3: Contenidos de minerales en 38 muestras de *L. glaber* durante dos períodos, seco y húmedo, y porcentaje de muestras deficientes. Los valores de concentración están referidos a materia seca.

Table 3: Mineral content of 38 *L. glaber* samples during dry and wet periods, and percentage of samples below critical levels. Values are given on dry matter.

	Cu ppm		Fe ppm		Mn ppm		Zn ppm		S %	
	Seco	Húmedo	Seco	Húmedo	Seco	Húmedo	Seco	Húmedo	Seco	Húmedo
X	11,2 ^a	12 ^a	126 ^a	858 ^b	58 ^a	104 ^b	36 ^a	35 ^a	0,298 ^a	0,288 ^a
±ES	± 0,4	± 0,7	± 13	± 210	± 3,6	± 9,1	± 1,8	± 2,6	± 0,01	± 0,01
Máx.	17,2	18,6	320	2440	105,9	170	50,8	45,8	0,409	0,371
Mín.	8,2	7,1	66,3	173,8	37,7	55,3	17,5	18,8	0,213	0,215
%NC	0	7,7	8,7	76,9	8,7	0	20,8	30,8	47,8	28,6

NC: Nivel crítico de deficiencia: Cu (<8 ppm), Mn (<40 ppm) y Zn (<30 ppm) (13)

Niveles críticos de exceso: Fe (> 250 ppm) y S (> 0,3%). (13, 12)

Letras diferentes indican diferencias significativas: a b (p<0,01) y cd (p<0,05).

exceso, se presentan para el total de las muestras en la Tabla 1 y discriminados por período para gramíneas y *L. glaber* en las Tablas 2 y 3 respectivamente.

DISCUSIÓN

Los resultados permiten observar que durante el período húmedo se elevan las concentraciones de Fe, tanto en gramíneas como en *L. glaber*. Debido a que el exceso hídrico se presenta en el Partido de Magdalena durante el otoño-invierno, por la menor temperatura ambiente (7), el conse-

cuente exceso de Fe sería una de las causas de la disminución de las cupremias reportadas entre la primavera y el verano siguiente debido al tiempo de agotamiento de las reservas hepáticas de Cu (5). Debe tenerse en cuenta que las concentraciones de Fe obtenidas en este trabajo pueden ser menores a las consumidas por el ganado, debido a que el lavado elimina la contaminación con suelo que es mayor durante el invierno debido a la baja producción forrajera (11).

La posibilidad de que las concreciones ferromangánicas del subsuelo sean la fuente de Fe

durante el exceso hídrico parece coincidir con que también aumenta significativamente la concentración de Mn en el *L. glaber*.

Contrariamente a lo postulado, la mayor absorción de Fe en el período húmedo aparentemente no perjudicó la absorción de Cu y Zn por el forraje. Las concentraciones de Cu en las gramíneas son bajas y coinciden con los reportes previos de la zona (6). Los contenidos de S, no varían entre períodos, son elevados y un alto porcentaje supera el 0,3 % (MS), suficiente como para interferir con la absorción de Cu en los animales (12).

Se concluye que en las condiciones de este trabajo los excesos hídricos del suelo modificarían la composición mineral del forraje, especialmente aumentando la concentración de Fe y este factor debe ser tenido en cuenta para futuros estudios sobre el comportamiento epidemiológico de la hipocuprosis en la zona.

BIBLIOGRAFÍA

1. Reid RL, Horvath DJ. Soil chemistry and mineral problems in farm livestock. A review. *Anim. Feed Sci technol* 1980; 5: 95-179.
2. Beeson KC, Matrone G. The soil factor in nutrition: animal and human. Ed. Marcel Dekker. New York (USA), 1976; p. 152-168.
3. Campbell AG, Coup MR, Bishop WH, Wright DE. Effect of elevated iron on the copper status of grazing cattle. *N Z J Agric Res* 1974; 17: 393-399.
4. Kabata-Pendias A, Pendias H. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Ratón, Florida (USA), 1984; p. 75-86, 99-109, 233-238.
5. Ramírez CE, Mattioli GA, Tittarelli CM, Giuliadori MJ, Yano H. Cattle Hypocuprosis in Argentine associated with periodically Flooded Soils. *Livest Prod Sci* 1998; 55: 47-52.
6. Mattioli GA, Ramírez CE, Giuliadori MJ, Tittarelli CM, Yano H, Matsui T. Characterization of cattle copper deficiency in Magdalena district. *Livest. Prod. Sci.* 1996; 47: 7-10.
7. Sánchez RO, Ferrer JA, Duymovich OA, Hurtado MA. Estudio pedológico integral de los partidos de Magdalena y Brandsen (Prov. de Buenos Aires) *Anales del LEMIT*, 1976; Serie II, N° 310.
8. Montes L, Cauhepe MA. Evaluación de Lotus Tenuis mediante dos métodos de siembra. *Rev Arg Prod Anim* 1985; 5: 313-321.
9. Vonesch E. Composición y digestibilidad de forrajeras de la provincia de Buenos Aires. *Rev Fac Agr Vet Buenos Aires*, 1968; 17: 49-58.
10. Hamm JW, Bettany JR, Halstead EH. A soil test for

sulfur and interpretative criteria for Saskatchewan. *Comm Soil Sci Plant Anal* 1973; 4: 219-231.

11. Dewes HF. The rate of soil ingestion by dairy cows and the effect on available copper, calcium, sodium and magnesium. *New Zealand Vet J* 1996; 44: 199-200.

12. Mason J. The relationship between copper, molybdenum and sulfur in ruminant and non-ruminant animals. A review. *Vet Sci Commun* 1978; 2: 85-94.

13. McDowell, L.R. Minerals in animal and human nutrition. Academic Press. New York (USA), 1992; p. 524.

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN FRESCO, REFRIGERADO Y CONGELADO. APLICACIÓN Y DESARROLLO EN CANINOS

M.A. Stornelli^{1,2}, M.C. Stornelli¹, M.S. Arauz², L. De La Sota¹.

¹ Cátedra de Reproducción Animal. ² Servicio Central de Laboratorio.

Resumen: La Inseminación Artificial (IA) en caninos es una práctica que brinda grandes beneficios en la clínica reproductiva diaria. Esta biotecnología puede ser de moderada o alta complejidad, de bajo o mediano costo, según la técnica y el tipo de semen (fresco, refrigerado o congelado) utilizado. En cada caso brinda diferentes posibilidades, otorgando siempre grandes beneficios en la reproducción canina. Si se extrae semen de buena calidad, se lo acondiciona y maneja adecuadamente, se realiza la IA en el momento oportuno y se aplica la técnica adecuada, se pueden obtener porcentajes de fertilidad muy alentadores. Sin embargo, si los factores mencionados no son adecuadamente controlados puede tornarse una práctica desalentadora. La aplicación de IA con semen criopreservado aumentará las posibilidades de desarrollo del profesional veterinario en nuestro país.

Palabras claves: Inseminación artificial caninos- semen refrigerado- semen congelado

ARTIFICIAL INSEMINATION WITH FRESH, CHILLED AND FROZEN SEMEN. APPLICATION AND DEVELOPMENT IN CANINE.

Abstract: Artificial insemination in dogs is a technique with great potential in clinical reproduction. This biotechnology can be implemented with moderate or high complexity and with low or medium cost depending the technique and the type of semen used (fresh, chilled, frozen). In any case it can produce great benefits to canine reproduction. If good semen quality is obtained, and it is properly handled and artificial insemination is done at the right time, the pregnancy resulted could be very encouraging. However if those factors are not properly controlled the results obtained could be very discouraging. The use of artificial insemination with frozen semen will increase the professional development of the veterinarians in our country.

Key words: Artificial insemination-dog- chilled semen-frozen semen

Fecha de recepción: 05/03/01

Fecha de aprobación: 27/08/01

Dirección para correspondencia: Alejandra Stornelli, CC 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: astornel@fcv.medvet.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Desde que Lazzaro Spallanzani en 1787 realizó la primera Inseminación Artificial (IA) con semen fresco en caninos, este procedimiento ha sido aplicado y desarrollado a través del tiempo en la reproducción de pequeños animales. Ya en 1776 Spallanzani había observado que las bajas temperaturas provocaban una reducción reversible de la actividad metabólica de los espermatozoides, lo cual permitía almacenarlos (1). Fue en 1956 que Harrop logra la primer preñez con semen refrigerado (2) abriendo las puertas a la criopreservación. Posteriormente, en 1969, se comunica por primera vez una IA satisfactoria con semen congelado (3).

Con el avance de la biotecnología, cada vez es más frecuente el uso de IA tanto para realizarla con semen fresco como con semen criopreservado. El estado de salud y nutrición de los reproductores, así como el manejo del momento de inseminación, semen utilizado y técnica de inseminación determinarán el éxito o fracaso de la IA. La misma permite la interacción de dos reproductores cuando no se puede llevar a cabo el servicio natural, optimizar el uso de semen de buena calidad (inseminando a 2 o más perras con un mismo eyaculado) y utilizar semen criopreservado. La IA con semen refrigerado o congelado permite trabajar con dos reproductores en localizaciones geográficas distantes sin necesidad de transportarlos, lo cual brinda grandes ventajas para los criadores. Así mismo la congelación de semen en caninos se encuentra en constante estudio y desarrollo debido al creciente interés de criadores y teriogenólogos. Este método de criopreservación hace posible el uso de reproductores mucho después de finalizado su período útil como semental y la conservación del material genético del macho siendo esto último de gran importancia en cánidos silvestres en peligro de extinción.

El objetivo de este trabajo fue analizar los factores que condicionan el éxito de la IA y la posibilidad de realizarla con semen criopreservado en nuestro país.

ÉXITO O FRACASO DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

La IA es una técnica útil, de baja o mediana complejidad, de moderado costo, que brinda grandes posibilidades en la clínica reproductiva diaria y el desarrollo biotecnológico. Sin embargo, si no se tienen en cuenta algunos factores sumamente importantes en su aplicación, puede tornarse una práctica desalentadora.

El éxito de la IA en caninos está íntimamente relacionado con:

- 1) Estado de salud y nutrición de los reproductores.
- 2) Detección del momento de mayor fertilidad de la hembra.
- 3) Tipo, manejo y calidad del semen utilizado.
- 4) Implementación de una técnica adecuada de IA.

Si se cumplen con estos requisitos, la probabilidad de éxito será alta mientras que, en caso contrario, será una experiencia frustrante.

Estado de salud y nutrición de los reproductores

La reproducción es una función altamente especializada y es preciso lograr el exacto equilibrio entre la sanidad y la nutrición para que el animal pueda expresar completamente su capacidad reproductiva.

La aplicación de IA en animales sanos, fértiles y adecuadamente alimentados hará posible aumentar las posibilidades de éxito, no solo en lograr una preñez, sino también una camada de alto número de cachorros.

Utilizar IA en una hembra con alguna afección orgánica o un inadecuado aporte nutricional que comprometa su fertilidad, sólo significará un mal aprovechamiento de recursos y tecnología.

Detección del momento de mayor fertilidad de la hembra

La IA debe ser realizada en el momento adecuado para que los espermatozoides puedan interrelacionar con óvulos maduros capaces de ser fecundados, de otro modo no será un procedimiento exitoso. Este factor es crítico cuando se trabaja con semen criopreservado.

En los caninos la duración del proestro es variable, pudiendo oscilar entre 2 y 25 días. La ovulación ocurre aproximadamente 48 horas luego de ocurrido el pico preovulatorio de hormona luteinizante (LH), al inicio del estro. El oocito es ovulado al comienzo de la primera división meiótica, la maduración se completa en el oviducto y requiere aproximadamente 2 días (4). Las particularidades fisiológicas de los caninos dificultan la estimación del momento de mayor fertilidad de la hembra sin el uso de métodos complementarios.

Debido a la elevación de la estrogenemia en

el proestro, el número de capas celulares del epitelio vaginal aumenta. Este hecho hace que las células luminales se alejen de la irrigación sanguínea evolucionando hacia la muerte. Este fenómeno podrá visualizarse claramente en los extendidos vaginales en los cuales aumentará el porcentaje de células superficiales a medida que se acerca el fin del proestro y el comienzo del estro (5). El estudio de extendidos vaginales seriados desde el comienzo del proestro nos permitirá, junto con la imagen vaginoscópica, aproximar el comienzo del estro (6,7). Sin embargo no podremos identificar exactamente el momento de mayor fertilidad de la hembra.

El dosaje de progesterona sérica hará posible determinar el momento de la ovulación a través de la estimación indirecta del pico de LH. La progesterona asciende de niveles basales (0,5 ng/ml) a niveles superiores (≥ 2 ng/ml) cuando ocurre el pico preovulatorio de LH. El dosaje sérico de LH es el método más exacto para identificar el pico de LH. Sin embargo, debido al costo, este método no se utiliza rutinariamente (8).

Si estimamos el día en que ocurre el pico preovulatorio de LH, dos días más tarde ocurrirá la ovulación de oocitos primarios, los cuales madurarán en aproximadamente 48 horas (8, 9, 10). Los óvulos permanecerán capaces de ser fecundados por 4 o 5 días, momento en el cual realizaremos la IA. Si trabajamos con semen congelado el momento indicado para realizar la IA será entre 72 y 96 horas luego de la ovulación (11).

Tipo, manejo y calidad del semen utilizado

El conocimiento de la calidad de semen de un reproductor nos permitirá estimar las probabilidades de éxito en la utilización del mismo para realizar IA con semen fresco o criopreservado. En el perro la información disponible sobre la relación entre calidad del semen y fertilidad es escasa comparada con otras especies. Se ha estimado que la cantidad mínima de espermatozoides necesarios para preñar una hembra es de 150 a 200 x 10^6 (12, 13, 14). Sin embargo se han comunicado preñeces con 20 x 10^6 de espermatozoides depositando quirúrgicamente semen fresco en la porción proximal del cuerno uterino y dos dosis de 30-35 x 10^6 de espermatozoides realizando IA intrauterina por medio de cateterización cervical con endoscopio (15, 16).

La significación de las alteraciones morfológicas de los espermatozoides es otro parámetro muy poco estudiado. Algunos autores han comu-

nicado que los defectos espermáticos primarios y secundarios no deben exceder el 30 o 40 % (17, 18). Si bien la relación entre el tipo de defecto y fertilidad no ha sido establecida, se ha observado pérdida de la capacidad fecundante asociada con la presencia de gota citoplasmática proximal. Por el contrario, la presencia de gota citoplasmática distal no se ha relacionado con pérdida de fertilidad seminal. Ambos defectos disminuyen la resistencia espermática al congelado (19).

La motilidad es una variable de gran importancia en la calidad seminal. Se estima que un semen de buena calidad debe poseer no menos del 70 % de espermatozoides con motilidad progresiva (20). En el semen congelado la motilidad espermática luego del descongelado es el mejor indicador de fertilidad (19).

La adición de Royal Jelly a diluyentes con Equex STM paste parece tener efectos sinérgicos en la viabilidad espermática al descongelado (21). Se han encontrado efectos benéficos en la adición de Orvus ES paste al diluyente, tanto en la protección acrosómica como en el porcentaje de espermatozoides móviles al descongelado (22). El semen de baja calidad se relaciona no sólo con bajas tasas de preñez sino también con producción de camadas de escaso número de cachorros (11, 23, 24).

En la actualidad la IA se realiza con semen fresco, refrigerado o congelado, cada tipo de semen nos brindará distintas posibilidades de aplicación así como también exigirá un manejo de diferente complejidad. En nuestro país la IA con semen fresco se realiza ocasionalmente, no utilizándose en la práctica reproductiva diaria la IA con semen refrigerado y/o congelado. Considerando la baja complejidad necesaria para la realización de esta técnica con semen fresco o refrigerado y las posibilidades que brinda, en poco tiempo será utilizada más frecuentemente si se difunde adecuadamente su técnica de realización, manejo y aplicaciones.

La IA con semen congelado requiere un mayor desarrollo de la metodología de congelación en nuestro país. Sin embargo, el trabajo realizado en el área indica que en un futuro cercano estará disponible en la Argentina la posibilidad de acceder a bancos de semen congelado.

IA con semen fresco

La IA con semen fresco es una práctica sencilla y poco costosa que puede implementarse sin inconvenientes en la clínica reproductiva diaria.

La utilización de IA con semen fresco brindará resultados comparables (tasas de preñez y tamaño de la camada) con los obtenidos mediante servicio natural (11, 23, 24, 25).

En un estudio realizado con 422 hembras, luego del servicio natural, realizado en el momento de mayor fertilidad, se obtuvo una tasa de preñez del 84.4 % (23). Por otra parte implementando IA con semen fresco se obtuvo un porcentaje de preñez de 83,8 % (19).

La obtención de semen se realiza rutinariamente por masturbación, aunque puede utilizarse electro eyaculación en animales muy agresivos o en los que no logran eyacular por la técnica manual. La recolección de la fracción espermática es suficiente para realizar la IA, parte de la fracción prostática puede recolectarse sólo para asegurarse que se ha recolectado toda la segunda fracción. Si el volumen de la fracción espermática es escaso, la fracción prostática puede servir para aumentarlo y facilitar el manejo del semen. Una vez colectado en un recipiente adecuado, el semen es aspirado con una jeringa y depositado inmediatamente luego de la extracción en la vagina craneal, mediante una sonda de longitud variable según el tamaño de la hembra (26). Es muy importante asegurarse que se ha obtenido un eyaculado de buena calidad mediante la evaluación de la concentración y motilidad espermática a través de la observación rápida de una alícuota de semen separada con este fin.

Todo el material utilizado para la recolección, así como el usado para la IA debe ser estéril y libre de sustancias químicas contaminantes que puedan afectar la calidad del eyaculado. También es necesario que el material se encuentre a 37 °C para evitar el shock térmico de los espermatozoides (20).

Mediante IA con semen fresco se podrá obtener descendencia cuando no es posible realizar servicio natural por diferentes causas pudiendo ser aprovechados estos animales como reproductores. Esta práctica no debe ser llevada a cabo cuando la imposibilidad del servicio se relacione con problemas de transmisión hereditaria.

IA con semen refrigerado

Mediante el agregado de diluyentes, el semen puede ser refrigerado y de esta manera conservado y transportado. Las bajas temperaturas disminuyen las tasas metabólicas del espermatozoide y prolongan su longevidad (27). Los diluyentes protegen a las membranas del espermato-

zoide del daño causado por los cambios de temperatura, proveen energía y mantienen estables el pH y la osmolalidad (28, 29). Los antibióticos agregados a los diluyentes evitan la proliferación bacteriana, en especial en los que contienen yema de huevo (30).

Para la conservación de semen a 4 °C han sido usados diferentes diluyentes. Dentro de los más utilizados se encuentra el tris-buffer con el agregado de 20 % de yema de huevo (TYH) y diluyentes compuestos por yema de huevo y crema o leche descremada (12, 13). Algunas experiencias realizadas *in vitro* encuentran mejor conservación del semen en TYH (30, 31). Con la utilización de tris-buffer con el agregado de 20 % de yema de huevo como diluyente se han obtenido tasas de preñez de 62,5 % (24). Se han logrado buenos resultados *in vitro* almacenando y conservando semen canino diluido en MR-A® (Kubus SA, España) -yema de huevo a 4 y 15 °C (31, 32).

Las mejores tasas de preñez obtenidas utilizando semen refrigerado se lograron con diluyentes realizados con tris/yema de huevo (62,5 %) y yema de huevo/crema (51,1 %) (25).

Para la refrigeración se colecta la fracción espermática del semen y se la mezcla con el diluyente elegido, el cual debe encontrarse a la temperatura del semen en el momento de la dilución. Entre semen y diluyente debe respetarse una relación 1:3 o 1:4, una proporción excesiva de diluyente tendrá influencias negativas sobre la motilidad. El semen así preparado puede refrigerarse a 4 °C y utilizarse para IA lográndose tasas de preñez aceptables durante las primeras 24-48 h. Previo a la IA el semen refrigerado debe alcanzar lentamente la temperatura ambiente (14, 25).

La utilización de semen refrigerado con diluyentes protectores como el tris-buffer con el agregado de 20 % de yema de huevo permite conservar espermatozoides con buena capacidad fecundante por un período de tiempo suficiente para trasladar el semen e inseminar animales ubicados en localizaciones geográficas distantes. Esto hace posible la IA de una hembra con el semen de un macho que se encuentre en otra provincia u otro país limítrofe o cercano con mínimo gasto y baja complejidad de manejo. De esta manera se amplían las posibilidades de uso de un reproductor, permitiendo la comercialización de semen y facilitando el intercambio genético entre diferentes establecimientos. La simplicidad de manejo del semen refrigerado y su bajo costo, lo convierten en una excelente opción para nuestro país.

IA con semen congelado

La congelación de semen canino es un procedimiento que no puede realizarse en la práctica veterinaria diaria ya que requiere equipos especiales y personal especializado en el área (12, 13, 19, 33, 34). Sin embargo el uso de semen congelado puede implementarse respetando algunas normas básicas manejo y descongelado del mismo.

Mediante la congelación es posible el uso del semen de un macho cuando este ya no puede ser usado como reproductor, inseminar una hembra que se encuentre en una localización geográfica distante y almacenar semen en épocas en las cuales el reproductor no sea requerido para servicios. Así mismo un banco de semen puede constituir un importante reservorio genético para la cinofilia y la conservación de razas en las que la población pueda disminuir drásticamente en el futuro.

El semen canino puede congelarse en pastillas o pajuelas de 0,5 o 0,25 ml. Las pastillas, difíciles de identificar, se usan ocasionalmente a diferencia de las pajuelas que son preferidas por su más fácil identificación y mejor manejo en el descongelado (11, 35, 36).

Controles periódicos del termo de almacenamiento que aseguren un volumen de nitrógeno que permita una buena conservación del semen y una reducida exposición del mismo a temperatura ambiente fuera del nitrógeno durante el manejo de pajuelas o pastillas permitirá conservarlo en buenas condiciones para su posterior uso.

Cada tipo de almacenamiento (pastillas, pajuelas) requiere diferentes condiciones de descongelado. Las pastillas se descongelan a 37 °C utilizando usualmente solución salina de cloruro o citrato de sodio como diluyente. Las pajuelas de 0,5 ml se descongelan en baño térmico a 37 °C durante 1 minuto o a 75 °C durante 6 segundos, mientras que las minipajuelas (0,25 ml) deben descongelarse a 75°C durante 5 segundos (13, 34).

La mayoría de los autores logran mejores resultados utilizando inseminación intrauterina (mediante laparotomía, laparoscopia o cateterismo cervical) para el uso de semen congelado (24, 37). Los porcentajes de preñez obtenidos con el uso de inseminación intrauterina varían entre 60% y 90 % (14, 16, 35, 37, 38). Los resultados obtenidos por los diferentes autores son muy variables, esto puede explicarse por la variabilidad existente entre diluyentes, envasado y metodología de congelación y descongelación utilizadas (Tabla I).

Por otra parte, la técnica de inseminación intrauterina utilizada varía con la disponibilidad de material, equipos y entrenamiento de cada especialista (24, 37, 38). Nothling informa buenos resultados (87,5 % de preñez) con el uso de IA intravaginal mediante el agregado de fracción prostática al semen luego del descongelado (39). Hasta el momento, esta experiencia no ha sido reproducida por otros autores con éxito. El tamaño de camada promedio alcanza valores entre 2,8 y 5,4 utilizando IA transcervical (38, 40, 41), 4,8 mediante la aplicación de IA intrauterina quirúrgica (40) y 4,6 IA vaginal (42). Los resultados obtenidos en IA con semen congelado (porcentaje de preñez y tamaño de camada) son inferiores a los obtenidos en IA con semen fresco, sin embargo son lo suficientemente buenos, como para estimular su uso en especial cuando un reproductor es realmente valioso.

El uso de semen con bajo porcentaje de espermatozoides viables al descongelado y las fallas en la determinación del momento de mayor fertilidad son dos factores críticos cuando se trabaja con semen congelado (43, 44, 45, 46).

El proceso de congelación - descongelación resulta en una reducida fertilidad comparada con la del semen fresco. Se ha comprobado que esto resulta de una combinación tanto de pérdida de viabilidad como de daño de la población espermática sobreviviente. Se estima que entre el 40 y 50% de la población de espermatozoides no sobrevive al proceso de congelación - descongelación. Por otro lado, parte de la población de espermatozoides que sobreviven habrán sufrido daños que los convierten en incapaces de fecundar (43). Por lo tanto la IA debe ser realizada con un número de espermatozoides vivos y competentes al descongelado, suficientes para obtener una alta probabilidad de fertilización. Es por esto que debe considerarse un protocolo de criopreservación que no sólo logre una gran población de sobrevivientes sino también la integridad de las células que la conforman (15). En el perro se estima que 200 X 10⁶ espermatozoides viables al descongelado son necesarios para obtener tasas aceptables de preñez (5).

En la clínica reproductiva, el semen congelado es usado frecuentemente en Estados Unidos, ocasionalmente en Europa y muy raramente en Sud América; sin embargo la aplicación de esta biotecnología se encuentra en amplio desarrollo. La congelación de semen canino aplicando metodologías que permitan obtener porcentajes aceptables de espermatozoides viables al descongela-

do hará posible introducir esta biotecnología en nuestro medio. Si bien el proceso de congelación de semen canino requiere un moderado costo, equipamiento, infraestructura y entrenamiento del operador, su utilización mediante IA puede ser aplicada en la práctica diaria mediante el uso de técnicas de IA intrauterinas sencillas (IA quirúrgica) que no requieren más entrenamiento que el necesario para realizar una ovariectomía, práctica de rutina en el ejercicio profesional diario.

Técnicas de inseminación

En el servicio natural el macho realiza la eyaculación dentro de la vagina de la hembra. En la IA el depósito del espermatozoides en el tracto genital femenino puede realizarse dentro de la vagina o dentro del cuerpo del útero dependiendo de la calidad del semen y del uso de semen fresco, refrigerado o congelado.

Cuanto más alto en el tracto genital femenino sea realizada la inseminación, menos esper-

Tabla I: Porcentajes de preñez en la perra obtenidos realizando IA con semen congelado

Table I. Bitch pregnant rate in artificial insemination with frozen semen

Autor	Volumen de pajueta	Técnica de IA	Porcentaje de preñez	tamaño promedio de la camada
Silva 1996	0,5 ml	IAUL	60	SD
Nothling 1997	0,25 ml	IAV	100	9
Nothling 1993	0,25 ml	IAVCFP	92,9/100	9.3
	frac. prost	IAVSFP	60	10.7
Fastard 1984	0,5 ml	IAUT	64-69	SD
Fosberg 1995	0,5 ml	IAV	40-80	4
		IAUN	83-91	5.4
Fontbone 1993	0,5 ml	IAV	52,6	4.2
		IAUT	73,6	5.5
Wilson 1993	0,5 ml	IAUT	80	5

inseminación artificial vaginal: IAV; inseminación artificial vaginal con fracción prostática: IAVCFP; inseminación artificial vaginal sin fracción prostática: IAVSFP; inseminación artificial uterina laparoscópica: IAUL ; inseminación artificial uterina cateter noruego: IAUN; inseminación artificial uterina transcervical: IAUT; no se informa el dato en el trabajo de referencia: SD

matozoides necesitaremos para lograr la fertilización (44). Esto fue demostrado claramente en los ovinos, especie en la cual la IA intrauterina requiere una dosis inseminante 10 veces menor que la cervical posterior (43).

Cuando se trabaja con semen fresco se utiliza IA intravaginal, reservando la vía intrauterina cuando se trabaja con semen hipospérmico. La IA intravaginal es una técnica sencilla que se aplica también con semen refrigerado. Cuando se trabaja con semen congelado la IA es usualmente intrauterina (16, 24, 37), aunque algunos autores obtienen buenos resultados con IA intravaginal (38).

Inseminación artificial intravaginal

En la IA intravaginal el semen será depositado en la vagina craneal la hembra mediante un catéter de longitud acorde al tamaño del animal. La vagina de la hembra canina es de una longitud

apreciable (10 a 12 cm en una Beagle de 10 kg de peso), y varía enormemente con la raza considerada. Es así que el tamaño de los catéteres también tendrá gran variación.

El catéter se introducirá a través de los labios vulvares, evitando la fosa del clítoris, dirigiéndose primero hacia dorsal para luego dirigirse hacia craneal adecuándose a la anatomía de la hembra canina. Una vez que el catéter se encuentra en el fondo de la vagina, el semen es impulsado a través de él mediante una jeringa y depositado en vagina craneal. Luego el catéter es retirado y la hembra es mantenida 10 a 15 minutos con el tren posterior sobreelevado (26).

La totalidad del material utilizado deberá estar estéril, libre de sustancias que alteren la viabilidad espermática y precalentado a 37 °C para evitar alterar la calidad del eyaculado (29).

Inseminación artificial intrauterina

La inseminación artificial intrauterina puede realizarse depositando el semen en el útero, a través de la cateterización de cérvix o inoculándolo directamente en el cuerpo o cuernos uterinos en forma quirúrgica. La elección de la técnica dependerá de la calidad y tipo de semen utilizado, como se trató anteriormente, y de los equipos disponibles.

Inseminación artificial intrauterina transcervical

La IA intrauterina puede realizarse mediante la cateterización del cuello uterino con catéteres de 20 a 50 cm de longitud y 0,5 mm de diámetro, con la punta protegida por una cubierta de nylon (catéter Noruego).

Con la hembra en estación, el operador fija el cérvix entre sus dedos a través de la pared abdominal, con la otra mano introduce el catéter hasta la región del cuello, retira la cubierta de nylon y penetra el cuello uterino para depositar el semen en el cuerpo del útero. No es necesario sedar al animal, pero el operador necesita entrenamiento previo para realizar correctamente la técnica (24).

La cateterización del cuello puede realizarse visualizando el cérvix con ayuda de un endoscopio (16). Este método permite al operador visualizar el cuello facilitando la maniobra de cateterización uterina. La hembra no necesita sedación, el operador requiere cierto entrenamiento y el equipamiento posee un costo considerable.

Inseminación artificial intrauterina quirúrgica

Puede realizarse mediante laparotomía, con anestesia general o epidural. Se deposita lentamente el semen en el cuerpo o cuernos uterinos mediante una jeringa y una aguja calibre 21, con el bisel hacia arriba y una inclinación de 45 °C. Es una práctica sencilla pero el número de inseminaciones es limitado y deben extremarse las medidas para evitar infecciones (14, 47). También puede realizarse mediante laparoscopia, técnica utilizada rutinariamente en ginecología humana. Sin embargo, el costo de los equipos hace que esta técnica halla sido utilizada sólo ocasionalmente (48).

CONCLUSIONES

Si bien la IA con semen fresco es una práctica usada rutinariamente en la reproducción de pequeños animales, no ocurre lo mismo con la IA

con semen criopreservado (refrigerado o congelado). Sin embargo, el continuo estudio de los factores que posibilitan una mejor criopreservación de semen relacionados con los procesos de refrigerado, congelado y descongelado, posibilitarán en el futuro la aplicación frecuente de esa biotecnología.

La utilización de diluyentes que permitan conservar el semen canino a 4 °C, logrando altos porcentajes de espermatozoides vivos con motilidad progresiva e integridad acrosómica durante 2 a 5 días, hará posible el traslado de semen a diferentes puntos de nuestro país e incluso a países limítrofes o cercanos. Esto evitará el traslado de animales para la realización de servicio natural, disminuyendo los costos y esfuerzo que esto implica. Es importante destacar que el proceso de refrigeración de semen canino es de bajo costo y fácil realización, pudiendo implementarse con mínimo equipamiento y moderado entrenamiento del operador. Por otro lado el semen refrigerado puede utilizarse realizando IA intravaginal, técnica poco costosa y de baja complejidad. La implementación de técnicas de refrigeración de semen e inseminación artificial con semen refrigerado en nuestro país permitirá a los médicos veterinarios de práctica privada brindar un nuevo servicio, aumentar sus ingresos y mejorar su práctica diaria.

Procesos adecuados de dilución, elección correcta del buffer y crioprotectores, tiempo suficiente de equilibrio, curvas apropiadas de congelado y descongelado, determinarán un porcentaje reducido de células con membrana espermática dañada y una mayor sobrevida de los espermatozoides en el tracto genital femenino. La conservación de la integridad estructural y de la fisiología espermática forman parte de los factores que permiten altos porcentajes de preñez y tamaño de camada mayores. Con el desarrollo de la criopreservación de semen junto con la determinación exacta del momento de mayor fertilidad de la hembra y una adecuada técnica de IA, esta biotecnología brindará grandes posibilidades en el futuro.

Por otra parte, la congelación de semen canino aplicando metodologías que permitan obtener porcentajes aceptables de espermatozoides viables al descongelado hará posible introducir esta biotecnología en nuestro medio. Si bien el proceso de congelación de semen canino requiere un moderado costo, equipamiento, infraestructura y entrenamiento del operador, su utilización mediante IA puede ser aplicada en la práctica diaria mediante el uso de técnicas de IA intrauteri-

nas sencillas (IA quirúrgica) que no requieren más entrenamiento que el necesario para realizar una ovariectomía, práctica de rutina en el ejercicio profesional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Spallanzani L. *Observatione e esperienze in torno ai vercimelli spermatici del' uomo e degli animali. Opuscoli di fisica animale e vegetatile opuscolo. II. Modena. 1776.*
2. Harrop AE. *Mating natural service and artificial insemination in reproduction in the dog.* Ed., Tindall & Cox. London (England), 1960; p.87-99.
3. Seager SWJ. *Successful pregnancies utilizing frozen dog semen.* *AI Digest* 1969; 17:6-7.
4. Fastard W. *Assisted reproductive technology in canid species.* *Theriogenology.* 2000; 53:175-186.
5. Johnston DJ, Kuztritz MVR, Olson P. *Canine and feline theriogenology.* Ed. Saunders. Philadelphia (United States), 2001; 16:287-306.
6. Lindsay FE, Jeffcoate IA, Concannon PW. *Vaginoscopy and fertile period in the bitch.* *Proceedings 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination.* Dublin. 1988; 4:565.
7. Fosberg CL. *Accurate monitory of the estrus cycle of the bitch for artificial insemination.* *Proceedings 19th World Congress of the WASAVA.* 1994; p.601-605.
8. Concannon PW, Hansen W, Visek WJ. *The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone.* *Biol. Reprod.* 1975; 13:112-121.
9. Concannon PW, Hansen W, McEntee K. *Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch.* *Biol Reprod.* 1977; 17:604-613.
10. Concannon PW. *A review for breeding management and artificial insemination with chilled or frozen semen.* *Proceedings of canine reproduction Symposium.* September 1997. American college of theriogenologist. 1997; p.1-17.
11. Fosberg CL, Fosberg M. *Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen.* *J. Reprod. Fertil.* 1989; 39:299-310.
12. Morrow DA. *Current Therapy in theriogenology: Diagnosis, Treatment and Prevention of Reproductive Disease in Animals.* Ed. Saunders. Philadelphia (United States). 1980; p.661-665.
13. Kirk RW. *Current Veterinary Therapy X: Small Animal Practice.* Ed. Saunders. Philadelphia (United States). 1989; p.1247-1259.
14. Dumond C, Fontbonne A. *Les indispensables de l' animaux de compagne.* Ed P.M.C.A.C. Paris (Francia), 1993; p.153-159.
15. Tsutsui T, Shimizu O, Ohara N. *Relationship between the number of sperms and the rate of implantation in bitches inseminated into unilateral uterine horn.* *J Vet Med Sci.* 1989; 51:257-263.
16. Wilson M. *Non surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen.* *J Reprod Fertil.* 1993; 47:307-311.
17. Feldman EC, Nelson RW. *Canine and feline endocrinology and reproduction.* Ed Saunders. Philadelphia (United States), 1987; p.481-524.
18. Oettlé EE. *Sperm morphology and fertility in the dog.* *J Reprod Fertil.* 1993; 47:257-260.
19. Morton DB, Bruce SG. *Semen evaluation, criopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs.* *J Reprod Fertil.* 1989; 39:311-316.
20. Johnston SD. *Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital.* *Vet. Clin. North. Am.* 1991; 21 (3):545-551.
21. Kong IK, Choi SG, Bae HI, Oh DH, Oh HJ, Kim HR, Kin JK. *Effect of addition of royal jelly in tris -buffer extender on the pos -thaw viability of canine semen.* *Theriogenology* 2001; 55:309.
22. Tsutsui T, Hase M, Hori T, Komoriya K, Shimizu N, Nagakubo K, Kawakami E. *Effect of addition of Orvus ES paste to frozen canine semen extender on sperm acrosomes.* *J Vet Med Sci* 2000; 62 (5):537-538.
23. England GCW, Allen WE. *Seminal characteristics and fertility in dogs.* *Vet Rec* 1989; 125:399.
24. Fosberg CL. *Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen.* *Vet Clin North Am* 1991; 21:467-485.
25. Fosberg CL. *Artificial Insemination with semen fresh, chilled extended and frozen-thawed semen in the dog.* *Seminar in Veterinary Medicine and Surgery.* 1996; 10 (1):48-58.
26. Ettinger SJ, Feldman ER. *Textbook of Veterinary Internal Medicine.* Ed. Saunders Philadelphia (United States), 1995; p.1664-1662
27. Watson PF. *Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function.* *J Reprod Fertil* 1995; 7:781-791.
28. Lardy HA, Philips PH. *Preservation of spermatozoa.* *Proc Am Soc Anim Prod.* 32 ND Ann Meet 1939; p.219-231.
29. Marshall F, Hugh A. *Reproduction in the male in Marshall's physiology of reproduction.* Ed Churchill Livingstone. New York (United States), 1990; p.769-775
30. Rota A, Strom B, Fosberg CL. *Effects of seminal plasma and three extender on canine semen stored at 4°C.* *Theriogenology* 1995; 44:885-900.
31. Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, Savignone CA, García M, de la Sota RL. *Estudio comparativo del efecto de tres diluyentes sobre la supervivencia de semen canino almacenado a 4°C.* *Revista Brasileira de Reproducción Animal.* 2001; 25 (3):468-470.

A. Stornelli y col.

32. Savignone CA, Stornelli MA, Stornelli MC, Arauz MS, de la Sota RL. Estudio de la supervivencia espermática del semen almacenado a 4°C y 15°C en MRA® - yema de huevo. Resúmenes del I Congreso Nacional de la Asociación de Veterinarios Especializados en Animales de Compañía de Argentina. 2001; p.165.
33. England GCW. Criopreservation of dog semen: A review. *J Reprod Fertil.* 1993; 47:243-255.
34. Smith FO. Update on freezing canine semen, in Kirk RW (ed) *Current veterinary therapy IX.* Ed Saunders Philadelphia (United States), 1986; p.1243-1248.
35. Nothling JO, Volkman DH. Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. *J Reprod Fertil.* 1997; 51:109-116.
36. Dobrinski I, Lulai C, Barth AD, Post K. Effects of four extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J Reprod Fertil.* 1993; 47:291-296.
37. Silva LDM, Onclin K, Lejeune B, Vestergren JP. Comparison of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet Rec.* 1996; p.154-157.
38. Fosberg CL, Strom B, Govette G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology* 1999; 52:11-23.
39. Nothling JO, Volkman DH. Effect of addition of autologous prostatic fluids on the fertility of frozen-thawed dog semen after intravaginal insemination. *J Reprod Fertil.* 1993; 47:325-327.
40. Günzel-Apel AR. Artificial insemination with frozen semen in the bitch: intrauterine insemination techniques. Third conference of the European society for domestic animal reproduction. 1999; 6:71-72.
41. Szász F, Gábor G, Solti L. Comparative study of different methods for dog semen cryopreservation and testing under clinical conditions. *Acta Veterinaria Hungarica* 2000; 48 (33):325-333.
42. Nötling JO, Gerstenberg C, Volkman DH. Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen. A retrospective study. *ASAfr Vet Ass.* 1995; 66 (2):49-55.
43. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 2000; 60:481-492
44. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci.* 2000; 62:77-111.
45. Fastard W. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with semen fresh or frozen semen. *J Small Anim Pract.* 1984; 25:561-565.
46. Fastard W, Andersen-Berg K. Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in the dog. *J Reprod Fertil.* 1989; 39:289-292.
47. Held JP. Critical evaluation of the success and role of chilled and frozen semen in today's veterinary practice. *Proceedings of canine reproduction Symposium.* September 1997. American college of theriogenologist 1997; p.49-59.
- 48 Wildt DE. Laparoscopy, in Burke T. J. *Small Animal Reproduction and infertility.* Ed. Lea & Febiger. Philadelphia (United States), 1986; p.121-140.

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 más abajo detallado.

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). Una traducción de estos requerimientos pueden ser recuperados en INTERNET en la dirección electrónica:

<http://www.medvet.unlp.edu.ar/>

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.medvet.unlp.edu.ar/publicaciones>. 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 repro-

ducción, podrán enviarse fotografías o gráficos en formato TIF, CRD, JPG, GIF o BMP. El costo de cada artículo será de \$ 50 (equivalente a U\$S 50) hasta 7 hojas (publicadas) y \$ 10 (equivalente a U\$S 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. 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 (ambos en minúscula), 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 en español las 200 palabras y las 400 en inglés.

c)Palabras clave: al finalizar el resumen y el "abstract" en ren-

glón 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 claramente 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 autores 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, bibliografía y 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.medvet.unlp.edu.ar
Web: www.medvet.unlp.edu.ar