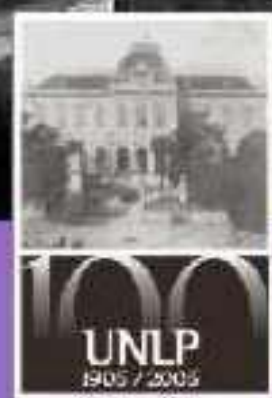


ANALECTA VETERINARIA



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

Volumen 25 nº 2 año 2005





Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias

Autoridades

Decano

Dr. Edgardo Nosetto

Vicedecano

Bac. Reinaldo Fonrouge

Secretario Académico

Méd.Vet. Enrique Félix Costa

Secretario de Postgrado

Dra. Pilar Peral García

Secretario de Extensión Universitaria

Dr. Jorge Romero

Secretario de Ciencia y Técnica

Ing.Zoot. Fernando Noel Dulout

Secretario de Asuntos Estudiantiles

Méd.Vet. Fernando Marino

Secretaria de Gestión de Calidad

Dra. María Gabriela Echeverría

ANALECTA VETERINARIA

Director

Dr. Nestor Oscar Stanchi

Editor Responsable

Dr. Eduardo Marotta

Secretario de Redacción

Méd. Vet. Daniel O. Arias

Comité Editorial

(Facultad de Ciencias Veterinarias)

Dra. Liliana Lagrecca

Dr. Eduardo Gimeno

Bact. Carlos Gómez

Dr. Florestán Maliandi

Dr. Pablo E. Martino

Méd.Vet. Enrique Pennimpe

Dra. Pilar Peral García

Dr. Carlos Perfumo

ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol. 25 n° 2, 2005

Publicación de la

Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Plata

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

Consultores:

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

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

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

ISSN 1514259-0 Versión Electrónica

Registro Propiedad Intelectual 77383

Dirección postal: CC 296 (B1900AVW)

La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA

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

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

Acceso Electrónico a ANALECTA VETERINARIA

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

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

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

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

Revisión de estilo: Per. Eleonora Roller

Diseño

Prof.Dr. Nestor Oscar Stanchi

Diseño de Tapa

Andrea López Osornio (DCV)

ANALECTA VETERINARIA está indizada en el Índice Latinoamericano de Revistas Científicas LATINDEX (www.latindex.unam.mx), Ulrich's International Periodicals Directory (www.ulrichsweb.com) Zoological Records (www.biosis.org.uk/products_services/zrss.html) BIOSIS (<http://www.biosis.org>)

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

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

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

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

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

Impresión

ANALECTA

Pronunciación: «a-n&l-'ek-t&

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



Foto de tapa: Facultad de Veterinaria. Farmacia Principios de siglo XX.

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

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

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

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

Impreso en papel libre de ácido

Printed in acid-free paper

Impreso en Argentina

Printed in Argentina



Artículos de Investigación

Research articles

BLOOD AND URINE PHYSIOLOGICAL VALUES IN CAPTIVE BULLFROG, *Rana catesbeiana* (ANURA: RANIDAE).

Valores fisiológicos en sangre y orina de rana toro en cautiverio, *Rana catesbeiana* (Anura: Ranidae) JA Coppo, NB Mussart, SA Fioranelli, PA Zeinsteger

5-17

Comunicaciones breves

Short communications

APLICACIONES DE LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN EN EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Transmission electron microscopy applications for microbiological diagnosis. SB Jurado, MA Petruccelli

18-24

DESGARRO BILATERAL DEL MUSCULO SERRATO VENTRAL EN UN GATO.

Laceration of the muscle ventral serrato AM Dragonetti, FO Boccia, MM Luna, F Leone

25-28

NEOPLASIAS DEL FOLÍCULO PILOSO DEL CANINO: ESTUDIO RETROSPECTIVO (1981- 2003).

Canine Hair Follicle Tumors: Retrospective Study (1981- 2003). AR Massone, MA Quiroga, ME Diessler, MA Machuca, AN del Amo, JR Idiart

29-32

Revisiones

Review

PROSTATITIS EN EL PERRO.

Canine prostatitis. A Dragonetti, C Solis, A Giordano

33-39

MARCADORES GENÉTICOS PARA RESISTENCIA Y SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN ANIMALES DOMÉSTICOS. LOS LOCI DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC) COMO GENES CANDIDATOS.

Genetic Markers for Susceptibility and Resistance to Infectious Diseases in Farm Animals. Major Histocompatibility Complex (MHC). Loci as Candidate Genes. S Díaz, MV Ripoli, P. Peral-García, G Giovambattista

40-52

Comunicaciones breves

Short communications

UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE HISTERECTOMÍA PARA LA ELIMINACIÓN DE PATÓGENOS EN UNA COLONIA DE RATONES CF-1 DESTINADOS A LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA. The Use of Hysterectomy Technique as a Way to Eliminate Pathogens from an Experimental Mice Colony. M Ayala, S Milocco, F Maschi, C Galosi, M Cagliada, C Carbone

5-7

Revisiones

Review

LOS FACTORES DE CRECIMIENTO. ASPECTOS BÁSICOS Y POTENCIALIDADES TERAPÉUTICAS. Growth Factors. Basic Considerations and Potential Therapeutics. CG Barbeito, PF Andrés Laube

8-27

EFECTO DE LOS PROCESOS DE CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LA FERTILIDAD SEMINAL. Criopreservation Effect On Fertility. MC Stornelli, CM Tittarelli, CA Savignone, MA Stornelli

28-35

IMPLICANCIAS FISIO-FARMACOLÓGICAS DE LA GLICO-PROTEÍNA- P EN ANIMALES DOMÉSTICOS. Physio-pharmacological implications of P-glycoprotein in domestic animals. M Ballent, A Lifschitz, G Virkel, C Lanusse

36-47

UVEÍTIS EN EL FELINO. Feline Uveitis. Del Sole MJ, Sande PH, Rosenstein RE, Aba MA

48-61

LA TEORÍA DEL PRIÓN. Prion theory. CL Pidone

62-72

UTILIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE HISTERECTOMÍA PARA LA ELIMINACIÓN DE PATÓGENOS EN UNA COLONIA DE RATONES CF-1 DESTINADOS A LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

M Ayala¹, S Milocco¹, F Maschi¹, C Galosi^{2,3},
M Cagliada¹, C Carbone¹

¹Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio

²Cátedra de Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

³Investigador Adjunto CIC Pcia de Bs. As. Argentina.

Resumen: Muchos patógenos que afectan a los ratones interfieren en los resultados de las pruebas de diagnóstico, investigación y control de calidad. Para la eliminación de agentes infecciosos en colonias se utiliza la técnica de derivación por histerectomía. El objetivo de este trabajo fue eliminar mediante esta técnica los siguientes patógenos: el virus de la Hepatitis Murina (MHV), la bacteria *Corynebacterium kutscheri*, y los parásitos *Giardia muris*, *Spiroplasma muris*, y *Syphacia obvelata* de una colonia de ratones CF1:Cr1. Se utilizaron hembras nodrizas C57BL/6/J libres de patógenos específicos. Para verificar la descontaminación de la colonia se realizaron 4 controles microbiológicos. Los resultados fueron negativos en todos los casos. Se concluyó que esta técnica permite eliminar los patógenos citados de una colonia de ratones infectados.

Palabras claves: histerectomía, nodrizas, ratón, cabina aisladora.

THE USE OF HYSTERECTOMY TECHNIQUE AS A WAY TO ELIMINATE PATHOGENS FROM AN EXPERIMENTAL MICE COLONY

Abstract: A lot of pathogens which must be absent in experimental mice colonies, since they produce interference in the results. This study describes the derivation by hysterectomy as a mean of effective elimination of pathogens such as: Mouse hepatitis virus, *Corynebacterium kutscheri*, *Giardia muris*, *Spiroplasma muris* and *Syphacia obvelata* from a CF:1 Cr1 colony. Specific pathogen free females C57BL/6J were chosen to perform this study and later used as foster mothers. Four microbiological tests were carried out in order to verify the decontamination. The results were negative in all the cases. It was concluded that by using this techniques it is possible to eliminate pathogens from an infected mice colony.

Key words: Hysterectomy, foster mothers, mouse, clean bench.

Fecha de recepción: 10/09/99

Fecha de aprobación: 07/11/05

Dirección para correspondencia: M Ayala, Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de La Plata C.C. 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA. **E-mail:** mayala@fvc.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Durante muchos años, quienes trabajaron con animales de experimentación infectados subclínicamente, observaban que sus ensayos no prosperaban, esto se debía en ocasiones a que los animales morían prematuramente y frecuentemente los resultados no eran los esperados. Esto sucedía en gran parte porque la mayoría de los animales convencionales están infectados con patógenos incluyendo ecto y endoparásitos, hongos, protozoos, bacterias y virus, y estos agentes interfieren en las pruebas de diagnóstico, investigación y control de calidad en las que se utilizan como reactivo biológico.

En un principio se utilizó la quimioterapia para eliminar los microorganismos patógenos de una colonia, pero los resultados no fueron satisfactorios; como consecuencia de ello, surgieron nuevas técnicas como la remoción aséptica de los fetos de la madre por medio de la histerectomía en un ambiente controlado (1).

El fundamento se basa en que la placenta actúa como un filtro muy eficiente y protege a los fetos de la transmisión de casi todos los agentes bacterianos, micóticos, virales y parasitarios presentes en la madre infectada (2,3). Los patógenos comunes como el Virus de la Ectromelia, Virus de la hepatitis del ratón, protozoos, y otras bacterias de la flora normal de una colonia convencional no atraviesan la placenta. Sin embargo, hay algunos patógenos que la atraviesan como el virus de la Coriomeningitis linfocitaria, ciertas larvas de parásitos y algunas bacterias.

El objeto de este trabajo fue determinar la eficiencia de la técnica de histerectomía para la eliminación de los siguientes agentes patógenos: Virus de la Hepatitis Murina (MHV), *Corynebacterium kutscheri*, *Giardia muris*, *Spirochete muris*, y *Syphacia obvelata* que contaminaban a una colonia de ratones CF1:Crl de experimentación (1, 4).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales:

Grupo A: de nodrizas:

Se utilizaron 15 ratones hembras y 3 machos de la cepa C57BL/6J (libres de patógenos específicos) SPF de 6 semanas de edad, eligiéndose tal cepa por la capa de color, en este caso negro, para diferenciarla fácilmente de la cepa que interesa descontaminar.

Los animales se produjeron en el Biotorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de

la Universidad Nacional de La Plata, y se mantuvieron a una temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, doce horas luz / doce horas oscuridad, la humedad relativa ambiente del 40-60 % y una ventilación forzada con 12 recambios de aire totales por hora. Se alojaron 5 hembras con un macho en cada caja de policarbonato (de 25 cm de largo por 15 cm de ancho y 15 cm de alto, con una reja de acero inoxidable) con lecho de viruta estéril. Se administró *ad libitum* agua autoclavada en mamaderas de vidrio con pico de acero inoxidable y alimento balanceado (Cooperación rata- ratón), extrusado y esterilizado por medio de autoclave.

Grupo B: animales a descontaminar:

Este grupo estuvo compuesto por 15 ratones hembras (donantes) y 3 machos del stock CF1: Crl de 6 semanas de edad provenientes de una colonia convencional de una institución privada, infectada con los siguientes patógenos: Virus de la hepatitis murina (MHV), *Corynebacterium kutscheri*, *Giardia muris*, *Syphacia obvelata* y *Spirochete muris*.

Las hembras donantes se colocaron en grupos homosexuales con lo que se logró el anestro de las mismas y la posterior sincronización de los estros (efecto Whitten). Luego de una semana, se aparearon 5 hembras y 1 macho por caja, dos días más tarde que la fecha de apareamiento de las nodrizas y se confirmó la cubrición de las hembras mediante la presencia del tapón vaginal.

Estos animales fueron alojados en una habitación de cuarentena en las mismas condiciones de macro y microambiente que la de los animales SPF.

Técnica de histerectomía:

El primer paso de la operación fue la remoción del útero grávido de la madre en forma aséptica, para lo que se sacrificaron las hembras donantes por medio de tracción cervical. Posteriormente se depiló la superficie ventral y se las sumergió en solución antiséptica (cloruro de benzalconio al 0,5%) mantenida a 37°C , se las colocó de cúbito dorsal, se cubrió el abdomen con paños de campo y se les realizó una incisión sobre la línea media. Presionando suavemente sobre los flancos se extrajo el útero de la cavidad abdominal, se pinzaron los cuernos y el cuerpo para evitar hemorragias, se separaron los úteros grávidos de las hembras y se los colocó dentro de una cápsula de Petri con la solución antiséptica a 37°C , las placas fueron introducidas al área estéril (flujo laminar) a través de una trampa

germicida con solución desinfectante a 37 °C, donde fueron recibidas por dos operadores (1, 5, 6).

Dentro del área estéril se incidieron los úteros y se extrajeron los fetos, que fueron secados y resucitados, realizando masajes suavemente en la región torácica extrayéndose el líquido amniótico residual de las fosas nasales, hasta que la respiración fuera normal y los fetos tomaran un color rojo escarlata. Finalmente fueron colocados en las cajas con las nodrizas y alojados en una cabina aisladora.

Controles microbiológicos:

Para verificar la descontaminación de la colonia se realizaron 4 controles microbiológicos:

1° Control de las placentas: Se realizó un macerado de las mismas y se las sembró en agar sangre y caldo PPLO para diagnosticar la presencia o ausencia de *Pasteurella* sp. y *Mycoplasma* sp.

2° Control de las nodrizas: Se realizó luego del destete de los animales obtenidos por histerectomía. Se sangraron las hembras para diagnóstico del Virus Sendai, MHV, *Mycoplasma* sp., *Clostridium piliforme* y *Corynebacterium kutscheri*; se tomaron hisopados de la nariz y tráquea, y se sembraron en agar sangre y caldo PPLO para diagnosticar *Mycoplasma* sp. y *Pasteurella* sp. Las muestras de ciego se sembraron en agar Mc Conkey, agar Cetrimide y agar FNC para el diagnóstico de *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Corynebacterium kutscheri*.

3° Control de crías: Se realizó al 25% de las crías obtenidas por la operación cesárea. Se tomaron muestras de la misma manera que en el control anterior.

4° Control de primera generación (F1): Se realizó a la F1 nacida de los animales obtenidos por histerectomía. Las muestras se tomaron de la misma manera que en el segundo control.

Pruebas Parasitológicas: Se tomaron muestras de contenido duodenal y cecal para diagnosticar *Giardia muris* y *Spironucleus muris*; y se realizó un test de Graham para el diagnóstico de *Syphacia obvelata*.

Pruebas serológicas: Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para diagnóstico de MHV, virus Sendai, *Mycoplasma* sp. y *Clostridium piliforme*, y aglutinación en placa (AP) para diagnóstico de *Corynebacterium kutscheri* (4, 7). Para todos los casos se utilizaron sueros positivos de referencia cedidos por National

Institute of Health of Japan (NIH).

RESULTADOS

Se obtuvieron 86 animales, 14 murieron y se destetaron 72. Los 14 animales que murieron no fueron aceptados por la nodriza. Todos los controles microbiológicos resultaron negativos a los patógenos que se pretendieron eliminar de la colonia infectada.

DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluyó que la técnica de derivación por histerectomía es un método eficiente para la eliminación de los siguientes patógenos: Virus de la hepatitis murina, *Corynebacterium kutscheri*, *Giardia muris*, *Spironucleus muris*, *Syphacia obvelata*, confirmándose que la placenta actúa como filtro para la mayoría de los patógenos.

Recomendamos en caso de emplear este método mantener aislados los animales obtenidos por histerectomía, hasta completar todos los controles microbiológicos correspondientes, esto permitirá asegurar que los mismos estén libres de microorganismos patógenos para poder introducirlos dentro de un área de producción de animales SPF.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bleby J. Disease free (SPF) animals. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals. Fifth Edition. 1976.
2. Bohner H, Miller C. Studies on rearing the hamster germfree. In Germfree Research: Biological Effect of Gnotobiotic Environments (ed. J. B. Heneghan), pp.619-622. New York: Academic Press. 1973
3. Rouleau A, Kovacs H, Kunz W. Decontamination of rat embryos and transfer to specific pathogen-free recipients for the production of a breeding colony. Lab Anim Sci. 1993, 43: 611-615.
4. Coates M, Gustafsson B. The Germ Free Animal in Biomedical Research. Lab. Anim. Handbook 9. 1984.
5. Reyniers J, Trexler P, Ervin R. Rearing germfree albino rats. Lobound Report N° 1, pp. 1- 84. Notre Dame Univ. Press. 1946.
6. Reyniers J. Introduction to the general problem of isolation and elimination of contamination. In Micrurgical and Germfree Techniques, pp. 95-113. Springfield, Illinois, Charles C. Thomas. 1943.
7. Hill A, Stalley P. *Mycoplasma pulmonis* infection with regard to embryo freezing and hysterotomy derivation. Lab Anim Sci. 1991; 41: 563-566.

LOS FACTORES DE CRECIMIENTO. ASPECTOS BÁSICOS Y POTENCIALIDADES TERAPÉUTICAS.

CG Barbeito^{1, 2}, PF Andrés Laube²

¹Instituto de Patología. Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas). ²Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: Los factores de crecimiento forman un grupo de macromoléculas polipeptídicas, que presentan acciones específicas y potentes sobre la regulación de la proliferación, la muerte, la motilidad y la diferenciación de células competentes. Desde la perspectiva de la fisiología celular, los factores de crecimiento son primeros mensajeros que interactúan sobre receptores glicoproteicos de membrana que transducen la señal generando una cascada de reacciones que termina en la regulación de ciertos factores de transcripción y por lo tanto de la expresión génica. Su mecanismo de secreción más frecuente es paracrino o autocrino, y solo ocasionalmente es endocrino. Existen numerosas familias de factores de crecimiento que durante el último cuarto de siglo dominaron el paradigma sobre el control del crecimiento tisular. En la actualidad, el principal uso médico de los factores de crecimiento y sus receptores es la marcación mediante inmunohistoquímica de tejidos tumorales para realizar diagnósticos y, de ser posible, establecer pronósticos. Sin embargo sus potenciales aplicaciones terapéuticas son muy amplias y quizás en un futuro cercano sean sustancias indispensables en la industria farmacéutica. El principal objetivo de la presente revisión es presentar estas sustancias a profesionales y estudiantes del área biomédica no especialistas en biología celular.

Palabras Clave: Proliferación celular, Diferenciación celular, muerte celular, ontogenia

GROWTH FACTORS. BASIC CONSIDERATIONS AND POTENTIAL THERAPEUTICS

ABSTRACT: Growth factors are a group of polypeptidic molecules. In general, they have low MW and they show specific and powerful actions in the regulation of target cells proliferation, death and motility. From cellular physiology's point of view, the growth factors are first messengers that bind membrane receptors, which translate the sign causing a reactions' cascade. It finishes in the regulation of some kinds of transcription factors and therefore in the genetic expression. Usually, these receptors are tyrosine kinases. Their secretion mechanism is frequently paracrine or autocrine, and occasionally it is endocrine. There are a lot of growth factors families, where these substances are joined. During the last fifty years, the growth factors have taken the main role in the paradigm to explain the tissue growth. Nowadays, the main use of the growth factors and their receptors, in medicine, is the determination through immunohistochemistry of tumour tissues, in order to make diagnostics, and, if possible, prognostics. However, their potential therapeutic applications are very vast, and, in a near future, they will be essential substances in the pharmaceutical industry. The main aim of this review is to show growth factors to biomedical graduates and students who are not specialists in cell biology.

Key Words: Cell proliferation, cell differentiation, cell death, ontogeny.

Fecha de recepción: 25/06/05

Fecha de aprobación: 01/07/05

Dirección para correspondencia: CG Barbeito, Cátedra de Patología General. C.C. 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

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

INTRODUCCIÓN

Los factores de crecimiento (FC) son primeros mensajeros que se unen a receptores glicoproteicos de membrana para iniciar la transducción de una señal. Los FC alcanzan acciones fisiológicas a menor concentración que otros mensajeros como las hormonas, además poseen una variedad mayor de células blanco que estas y, al no requerir de un sistema circulatorio desarrollado para actuar, las preceden tanto en la ontogenia como en la filogenia. Hoy se sabe que procesos como la inducción embrionaria, la diferenciación, la muerte y la motilidad celular, están regulados por los citados péptidos. En los últimos años comenzaron a investigarse gran cantidad de usos terapéuticos potenciales para estos factores, por lo que en un futuro inmediato serán sustancias de gran importancia farmacológica. La presente revisión tiene como objetivo presentar al médico veterinario, y a otros profesionales no especialistas, estas sustancias.

ACCIONES Y PROPIEDADES GENERALES

Los FC poseen acciones múltiples, por ejemplo el TGF β que puede ser mitógeno para los fibroblastos, es el inhibidor más potente de la proliferación epitelial. Incluso factores como EGF, de importante actividad estimulante sobre la proliferación de numerosas poblaciones celulares, pueden ser inhibidores de la misma si se modifican las condiciones experimentales. Pese a que los FC se asocian con frecuencia a mecanismos locales de transmisión de mensajes celulares, algunos de ellos son transportados por sangre; por ejemplo IGF, PDGF y TGF β poseen formas latentes que se unen a algunas proteínas séricas y a los gránulos plaquetarios. Otros factores como los FGFs interaccionan con componentes de la matriz, lo que favorece la creación de un microambiente especial para su acción (1, 2, 3).

Algunos factores como el PDGF, se denominan "de competencia" porque actúan en el pasaje de la etapa G₀ a la G₁ del ciclo celular. Otros, como EGF e IGF son "de progresión" porque desencadenan la transición entre las etapas G₁ y S. Ningún factor de crecimiento actúa después que la célula paso el punto de restricción y comienza a sintetizar ADN (3). Como ya se mencionó, los efectos de los FC no se limitan a la regulación de la proliferación celular, algunos de ellos modifican la motilidad, la proliferación y la muerte celular (5).

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FC

Por lo general, los receptores de los FC son enzimas que catalizan la fosforilación de las proteínas en tirosina, por lo que se las denomina quinasas de tirosina (TK). Los receptores para la mayoría de los miembros de la superfamilia del TGF β , también son quinasas pero en serina y treonina (2, 3, 5). Las TK inician reacciones en cascada, que además son ramificadas. Por lo general, la unión entre receptor y ligando lleva a la autofosforilación y activación de la enzima receptora. El receptor activado se une a proteínas citoplasmáticas que inician una cascada, que culmina con la fosforilación de proteínas como las quinasas del grupo MAP, que a su vez fosforilan factores de transcripción cuya activación determina que se modifique la expresión de ciertos genes, última etapa de la serie de reacciones. En la figura 1 se representa el mecanismo de acción del EGF, que se utiliza como modelo. En algunos casos los FC actúan mediante otros mecanismos de señalización (1).

A continuación se describen algunas de las principales familias de factores de crecimiento, se excluyen la familia de los factores de necrosis tumoral, por tener más relación con las citoquinas que con los demás FC y la familia de las neurotrofinas, por la especificidad de sus funciones.

FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO

Esta familia incluye a EGF, TGF α , Int 2, *Vaccinia growth factor*, anfiregulina, beta regulina y la subfamilia de las neuregulinas (1). Recientemente se encontró un grupo de proteínas similares a estos factores, que están relacionadas con la diferenciación celular.

El EGF es una molécula de 53 aminoácidos con un PM de 6 KDa, que en un tiempo se llamo urogastrona. La homología entre el EGF y el TGF α es de un 55%, y sus acciones biológicas son semejantes, ya que se unen al mismo receptor. El EGF se aisló por primera vez de la glándula submaxilar y el primer efecto conocido fue el estimulante sobre la erupción dentaria y la apertura de los párpados (1, 6). La expresión del gen del receptor para EGF es abundante en los epitelios y varía con el sexo, la edad y la hora del día (7). Por lo general el EGF actúa mediante mecanismos paracrinos y el TGF α mediante señalización autocrina (8, 9). El receptor para EGF y TGF α es c-ErbB o EGFR, una TK transmembrana. c-ErbB es un

Tabla 1. Clasificación general.

Table 1. General classification.

CLASIFICACIÓN GENERAL DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO	
FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF):	*Factor de Crecimiento Epidérmico *Factor de Crecimiento Transformante Alfa (TGF α) *Factor de Crecimiento de Unión a Heparina Semejante a EGF (HB-EGF) *Anfiregulina *Cripto-1 *Betacelulina * <i>Vaccinia Growth Factor</i> SUBFAMILIA DE LAS NEUREGULINAS: *Factor de Diferenciación NEU (NDF) *Heregulina *Factor de Crecimiento Glial *Inductor de la actividad del receptor de acetilcolina
FAMILIA DE LAS SOMATOMEDINAS O FACTORES DE CRECIMIENTO SEMEJANTES A LA INSULINA (IGFs):	*Factor de Crecimiento Semejante a la Insulina I *Factor de Crecimiento Semejante a la Insulina II
FAMILIA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO DERIVADOS DE PLAQUETAS (PDGF):	*Factores de Crecimiento Derivados de Plaquetas A, B, AB, C y D *Factor de Crecimiento del Tejido Conectivo * <i>Steel</i> o Factor de Crecimiento para Mastocitos o Factor de Crecimiento para <i>stem cells</i> (SCF)
FAMILIA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO PARA FIBROBLASTOS (FGFs):	*Factor de Crecimiento para Fibroblastos 1 o Ácido *Factor de Crecimiento para Fibroblastos 2 o Básico *Factores de Crecimiento para Fibroblastos 3-6 y 8 a 23 *Factor de Crecimiento para Queratinocitos (KGF) o FGF7
FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO PARA HEPATOCITOS (HGF) O FACTOR SCATTER (SF):	*Factor de Crecimiento para Hepatocitos
FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF):	*Factores de Crecimiento del Endotelio Vascular A, B, C, D, E *Factor de Crecimiento Placentario (PlGF)
FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL DERIVADO DE GLÁNDULAS ENDOCRINAS (EG-VEGF)	* Factor de Crecimiento Endotelial Derivado de Glándulas Endocrinas
FAMILIA DE LAS ANGIOPOYETINAS	*Angiopoyetinas 1 y 2 (Ang 1 y Ang 2)
FAMILIA DE LAS EFRINAS	*Efrinas B2 y B4 (Eph B2 y B4)
SUPERFAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGFβ):	
FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGFβ)	*Factores de Crecimiento Transformante Beta 1-5
FAMILIA DE LAS ACTIVINAS E INHIBINAS:	*Activinas *Inhibinas
FAMILIA DE LA SUSTANCIA INHIBIDORA DE MÜLLER (MIS):	*Sustancia Inhibidora de Müller
FAMILIA DEL DECAPENTAPLÉGICO (DPP):	*Proteínas Morfogénicas de Hueso (BMPs) *Growth and Differentiation Factors (GDFs) *Decapentaplégico
FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE LA GLIA (GDNF):	*Factor de Crecimiento Derivado de la Glía
FAMILIA DE NODAL:	*Nodal

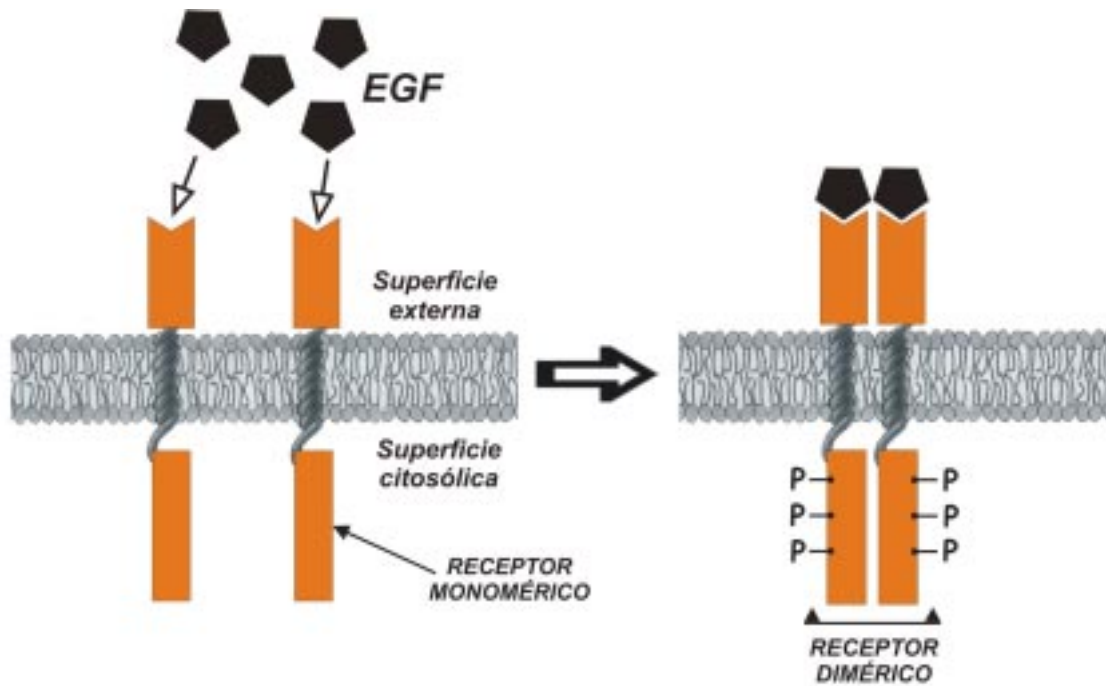


Figura 1. Mecanismo de acción del EGF. Al unirse al ligando, se dimeriza el receptor y cada una de las cadenas del mismo fosforila a la otra (transfosforilación).
 Figure 1. Mechanism of action of EGF. The receptor binds to EGF, it dimerizes and each one of the chains fosforilates the other (transfosforilation).

prooncogen semejante al v-ErbB, encontrado en el virus de la eritroblastosis aviar. La versión v-oncogénica del receptor carece del dominio de unión al ligando por lo que se activa en forma constitutiva (1).

In vitro EGF y TGF α estimulan la proliferación de poblaciones epiteliales tales como hepatocitos y células de los túbulos renales. *In vivo*, la administración de EGF a ratones incrementó la proliferación de: epitelio de las criptas intestinales y esófago, hígado, páncreas y riñón (8). El tratamiento de ratones y ratas con EGF produjo, un descenso significativo del peso corporal. En ratas, además, genera pelaje rugoso, hipoactividad, deshidratación y muerte (10). El tratamiento de ratones adultos con TGF α eleva la ADNs en los epitelios de lengua, pulmón, esófago, estómago glandular y aglandular; este efecto tiene dependencia de los ritmos circadianos (8). En ratones con el gen de TGF α sobre-expresado, se incrementa la proliferación de hepatocitos y queratinocitos (11). En ratas, que recibieron durante 14 días el factor en forma endovenosa, se observó hiperplasia de la mucosa gástrica, epitelio del intestino delgado y grueso, conductos de las glándulas salivales, epitelio lingual, esmalte dentario, epitelio traqueal, epitelio del conducto nasolagrimal, urotelio de la vejiga, próstata y pelvis, epitelio de la mucosa nasal, epitelio de los tubos colectores, células del tejido conjuntivo de las válvulas cardíacas. Además,

se encontraron alteraciones como incremento del número de cuerpos lúteos, hipertrofia hepatocelular, descenso de la hematopoyesis esplénica, hiper celularidad perineural en el nervio ciático, edema y fibrosis de mucosa gástrica e hipertrofia hepatocelular. Estos efectos fueron dosis dependiente y también presentaron dimorfismo sexual, ya que en los machos fueron más marcados (10). Sobre la epidermis los ligandos de EGFR (EGF, TGF α y anfiregulina), estimulan la proliferación queratinocítica. El uso de anticuerpos contra EGFR inhibe las mitosis epidérmicas. Algunos experimentos demostraron que un exceso de estos factores puede llevar a una diferenciación aberrante de los queratinocitos. Los animales transgénicos nulos para el gen del EGFR murieron poco tiempo después del nacimiento, presentando una gran variedad de alteraciones cutáneas. Cuando se utilizaron ratones transgénicos con un receptor mutante, que no es capaz de ligar a EGF pero si de homodimerizarse e incluso heterodimerizarse, la epidermis se tornó hiperplásica con gran intensidad de proliferación y de respuesta a la inflamación. Estos últimos resultados concuerdan con el hallazgo de que el gen de TGF α esté sobre-expresado en la psoriasis humana. (12).

Durante el desarrollo, estos factores son fundamentales desde las etapas iniciales. El EGF de origen materno es necesario para la

formación del saco vitelino y el TGF α embrionario es indispensable para el desarrollo del metanefros (13). El EGF también interviene en la neurogénesis temprana (14). La administración de anticuerpos anti-EGF incrementó el número de abortos. Al inicio de la vida postnatal, el factor que llega al neonato por la leche materna es necesario para eventos tales como la erupción dentaria y la apertura de los párpados.

En la regeneración hepática post-hepatectomía, intervienen tanto el TGF α , que actúa por vía autocrina, como el EGF que es producido por las glándulas de Brunner y llega al órgano a través de la vena porta (15). En lesiones gástricas, estos factores estimulan primero una reepitelización rápida promoviendo los movimientos y los cambios de forma en las células y posteriormente una lenta, estimulando la proliferación celular del epitelio gástrico. La aplicación local en heridas cortantes cutáneas de EGF recombinante humano mejora la reepitelización (12).

El EGF es mitógeno para la mama normal y está involucrado en la oncogénesis mamaria. Los animales que sobre-expresan EGF en la glándula submaxilar (y por lo tanto tienen un elevado nivel plasmático del factor) desarrollan tumores mamarios. Esta observación coincide con aquella encontrada en neoplasias mamarias humanas, en las que la sobre-expresión del EGFR se asocia con un pronóstico poco alentador (1).

Las neuregulinas constituyen un grupo de sustancias de la familia del EGF, que se forman por procesamiento alternativo de un único gen ubicado en el hombre en el cromosoma 8. Este grupo incluye al factor de diferenciación NEU (NDF), a la heregulina, al factor de crecimiento glial y al inductor de la actividad del receptor de acetilcolina. Estos factores se unen al receptor Her-2/Neu e inducen su fosforilación en tirosina y consecuente activación (1). Las neuregulinas intervienen en el desarrollo nervioso y cardíaco. Los ratones nulos para los genes de estos factores o sus receptores mueren durante el desarrollo prenatal con graves anomalías en el corazón (16). La sobre-expresión de sus receptores en tumores mamarios, también se asocia con mal pronóstico (1). El tratamiento con NDFa2 de heridas cutáneas favorece la reepitelización y engrosa la epidermis, sin incrementar la ADN, pero estimulando la expresión de algunos marcadores epiteliales como filagrina, citoqueratinas e integrinas (17).

FAMILIA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SEMEJANTES A INSULINA

Estas sustancias actúan como mediadores de las acciones de la hormona del crecimiento (GH), por lo que durante años se las denominó somatomedinas. Posteriormente se las incluyó dentro de los FC y, por sus semejanzas estructurales y funcionales con la insulina, se les otorgó la denominación de IGFs. Hoy se conocen dos IGFs (I y II) cuyas moléculas son semejantes a la de insulina, pero de tamaño algo mayor (7.5 KDa) (18, 19).

Los niveles séricos de los IGFs se originan por la producción hepática; los tisulares obedecen a la sumatoria de factores liberados por mecanismos paracrinos y autocrinos, además de aquellos derivados de la síntesis hepática. Por ejemplo, en el hueso el IGF-I es producido tanto por los osteoblastos como por el estroma de la médula ósea. La producción hepática es regulada por la hormona de crecimiento, pero la de otros órganos es coordinada mediante señales múltiples. Existen dos receptores para IGFs; el primero de ellos (IGFR-I) es una TK heterodimérica muy semejante al receptor de insulina. El IGFR-II es el receptor de manosa 6P, típico de los lisosomas, y se une con mayor afinidad a IGF-II. La función de este último como receptor para los IGFs es exclusiva de los vertebrados y sólo sería indispensable durante el desarrollo prenatal. IGFR-II no posee acción TK. Las IGFbps, de las cuales la más importante es la IGFbp-3, son proteínas que se unen a los IGFs y los regulan. Además, las IGFbps poseen acciones independientes de los IGFs (18, 19). En la figura 2 se representan las relaciones del IGF-I con su receptor y con las IGFbps.

In vitro se demostró que los IGFs son factores de progresión, que para ejercer efectos mitogénicos requieren de la acción previa de factores de competencia como PDGF que eleva la concentración del IGFR-I en las células. En cultivos celulares, estos factores incrementan la proliferación de condrocitos, osteoblastos, miocitos lisos, células del epitelio de túbulos contorneados proximales, queratinocitos, astrocitos, etc. Además, impiden la entrada en apoptosis de células hematopoyéticas y estimulan la diferenciación de mioblastos y osteoblastos (18, 19).

In vivo los IGFs son los mediadores de muchas de las acciones de la GH y reemplazan la mayoría de los efectos de la hormona cuando se los administra en ratas hipofisectomizadas. En el hueso, estimulan tanto la

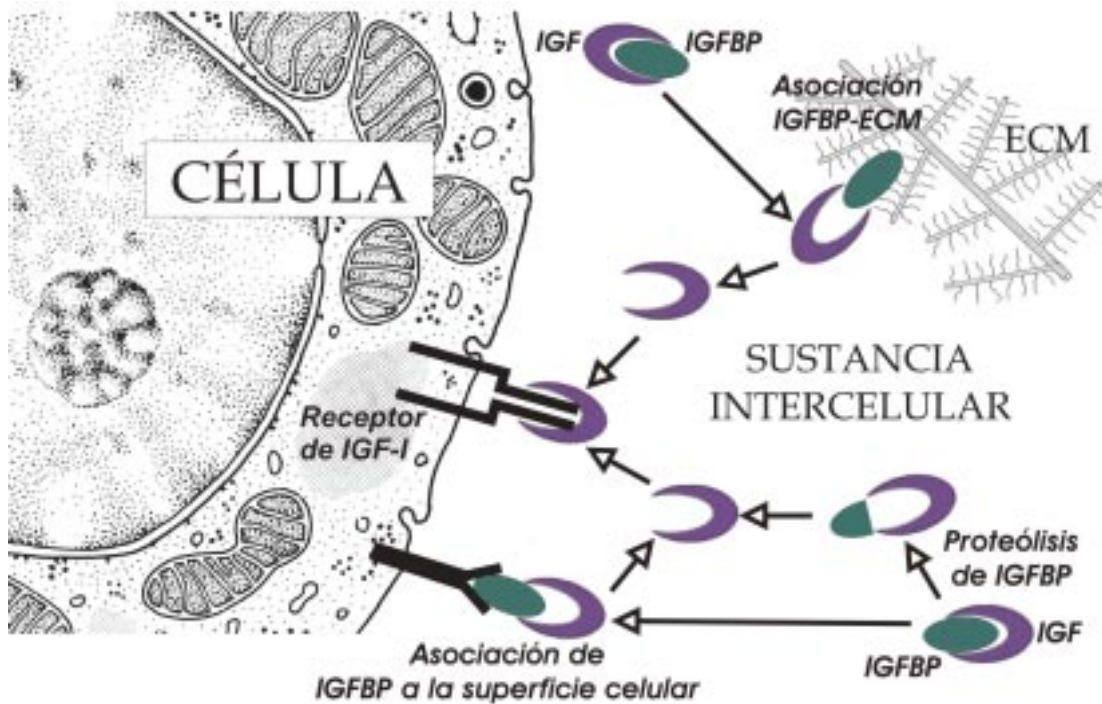


Figura 2. Asociación entre las proteínas de unión a IGF (IGFBP), la matriz extracelular (ECM) y la superficie celular.

Figure 2. IGF Binding Protein (IGFBP) association with cell surface and extracellular matrix (ECM).

resorción, como la síntesis de matriz y la proliferación osteoblástica. El IGF-I produce hipoglucemia por estimular la captación periférica de glucosa e inhibir la liberación hepática de la misma. El factor también posee efectos anabólicos en modelos de caquexia por hiponutrición, por falla renal, o por tratamiento con corticoides (18, 19). Los IGFs y las IGFBP sintetizados por la placenta y el endometrio intervienen en diversos procesos incluida la implantación (20).

El tratamiento con IGFs, en especial con IGF-II, estimula el crecimiento de casi todos los órganos embrionarios. En el desarrollo del paladar los IGFs serían inductores paracrinos producidos por el mesénquima. Los IGFs estimularían la fusión del epitelio de los esbozos palatinos y la osificación intramembranosa de los huesos palatinos (18, 19). También son importantes para la formación del epitelio de los esbozos de los miembros y en la morfogénesis renal (21). En el intestino delgado, IGF-II mantiene el estado indiferenciado de las células troncales o *stem cells*, mediante un mecanismo autocrino (18).

Los IGFs tienen diversas acciones tróficas sobre el sistema nervioso, por ejemplo, limitan la pérdida neuronal que sigue a la isquemia. El descenso en la producción de hormona del crecimiento y en la concentración de IGFR-I se asocia con los cambios en la cir-

culación encefálica y en la actividad cerebral que ocurren durante el envejecimiento. El tratamiento con IGF-I en el ventrículo lateral de animales viejos, mejora la memoria, posiblemente por prevenir las alteraciones seniles en la expresión de receptores glutaminérgicos (22). En el riñón las acciones de estos factores son variadas, intervendrían tanto en los procesos regenerativos como en la organogénesis. En algunos modelos de lesión renal, el uso del factor mejora la recuperación (13).

En cuanto a su relación con el origen y la progresión de tumores, se sabe que en el estroma de tumores mamarios se incrementa la producción de IGF-II. Pese a que estos factores no son oncogénicos, la sobre-expresión de IGF-II es necesaria para la hepatocarcinogénesis que ocurre en los animales transgénicos que sobre-expresan $TGF\alpha$ (11). También se relaciona IGF-II con el desarrollo de carcinomas tiroideos y del tumor de Willms del hombre (19).

El uso terapéutico de IGF-I está indicado, en el hombre, en ciertas formas de diabetes resistente a la insulina y en el síndrome de Laron, una forma extraña de enanismo hipofisiario (18, 19). Además se están realizando ensayos clínicos para evaluar su posible aplicación para impedir cambios neurodegenerativos durante el envejecimiento (22).

FAMILIA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO DERIVADOS DE PLAQUETAS

El PDGF fue aislado en 1974, a partir de los gránulos alfa de las plaquetas sanguíneas. En la actualidad la familia incluye a los 5 isotipos de PDGF (AA, BB, AB, C y D) y al factor de crecimiento para *stem cells* (SCF) o *steel*. Además, este grupo está estructuralmente relacionado con la familia del VEGF. Los receptores para PDGF (PDGFR) son TK diméricas que poseen cadenas α y β . La unión ligando-receptor inicia una cascada de reacciones que culmina con la activación de factores de transcripción como c-fos y c-myc (22, 23).

In vitro, el tratamiento con PDGF estimula la proliferación y detiene la diferenciación de células tan diversas como miocitos del músculo liso y células de Ito. Entre las acciones del factor *in vivo* se destaca su intervención en procesos de regeneración y reparación. El PDGF interviene en la regeneración que sigue a la distrofia muscular. En ratones adultos las fibras musculares regenerantes contienen mucho más PDGFR que las normales. También podría intervenir en la regeneración y reparación cutánea, ya que el tratamiento local de heridas cortantes con este factor estimula la proliferación celular dérmica y la síntesis de tejido de granulación. En un modelo de cerdos con quemaduras, la aplicación local de PDGF-BB incrementó la aparición de tejido de granulación y el desarrollo de matriz extracelular, no actuando en cambio sobre el epitelio. Cuando se administró a los cerdos PDGF junto a KGF, ambos factores manifestaron una acción sinérgica. Se considera que en la cicatrización de heridas el factor actúa en múltiples etapas. Su acción incluye efectos mitogénicos y quimiotácticos sobre fibroblastos y músculo liso, quimiotaxis de macrófagos y neutrófilos, inducción de la síntesis de otros FC por parte de los macrófagos y estimulación de la síntesis de moléculas de matriz como colágeno, ácido hialurónico, fibronectina y proteoglicanos. Además, el PDGF estimula la producción de colagenasa, enzima que intervendría en la remodelación tisular. En las heridas el factor es producido por macrófagos, queratinocitos, fibroblastos, músculo liso arterial y endotelio (23, 24).

En el riñón el factor está implicado en el incremento de células intersticiales, miofibroblastos, fibroblastos y mesangio, y en el aumento de la actividad fibrogénica en el órgano. En el hígado, también podría intervenir en la patogenia de las alteraciones crónicas como la cirrosis, ya que activa la transformación de

los lipocitos en miofibroblastos productores de colágeno. En la cirrosis, se determinó que existe una relación directa entre el grado de la lesión fibrótica (expresado como concentración de colágeno III) y los niveles del receptor de PDGF (25). También interviene en la patogenia de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis humana y la filariasis canina. El factor liberado por las plaquetas determina un incremento en la proliferación de células musculares lisas, especialmente en la íntima del vaso (26).

Sus acciones en el sistema nervioso parecen ser múltiples, se cree que el PDGF producido por las neuronas actuaría en forma paracrina sobre la supervivencia y proliferación de células de la glía y de Schwann, pues la glía posee PDGFR y el PDGF-A se expresa en las neuronas poco antes del comienzo de la migración y proliferación glial. La migración de astrocitos a través del nervio óptico del primer día de vida postnatal en roedores se inhibe cuando se trata a los animales con anticuerpos anti-PDGFR α . Se observó, además, que los ratones que sobre-expresan el factor presentan hiperplasia de astrocitos en los ganglios vertebrales (23).

Los PDGFs están relacionados con la regulación del crecimiento de algunos tumores. Deben destacarse en especial sus acciones como estimulantes autocrinos en neoplasias de músculo liso. Además, estos factores estimulan la angiogénesis tumoral (25).

Los animales nulos para PDGF-B o PDGFR β padecen severas anormalidades cardiovasculares y hemorragias en distintos órganos, además de un desarrollo glomerular anormal, con pérdida del mesangio. Estos mutantes negativos para PDGF-B por lo general mueren en estadios avanzados de la gestación, aunque ocasionalmente pueden nacer. La importancia de este factor en el desarrollo parece limitarse a vasos y megacariocitos, siendo alta la expresión del mismo en el endotelio de los capilares inmaduros y de las arterias en crecimiento. Los animales noqueados o nulos para el factor carecen de pericitos. Aparentemente TGF α induce que las células mesenquimáticas se transformen en precursores de pericitos, sobre los que PDGF-BB estimularía la actividad mitótica. El mesangio es una diferenciación especial de los pericitos, por lo tanto su desarrollo también se ve afectado en los ratones *knock-out* para el factor. Como el mesangio induce la ramificación típica de los vasos glomerulares, los noqueados para PDGF o su receptor no desarrollan glo-

mérulos típicos y el espacio de Bowman está ocupado por un solo capilar dilatado. Una lesión semejante ocurre en la placenta laberíntica del ratón al modificarse los pericitos placentarios. Existen diferencias entre los mutantes para PDGFR α y PDGF-A. Mientras que la mayoría de los animales nulos para el receptor mueren entre los días 8 y 16, con lesiones como espina bífida y fallas cardíacas; los nulos para PDGF-A no poseen estas alteraciones y si bien pueden morir durante el desarrollo, por lo general sobreviven algunas semanas. Los animales nulos para el receptor poseen defectos en la metamerización por presentar alteraciones en las somitas. Los animales nulos para el factor poseen anomalías en los folículos pilosos, pérdida de músculo liso en pulmón con enfisema alveolar, anomalías de vellosidades intestinales, pérdida de células de Leydig y de oligodendrocitos cerebrales. PDGF-C liga al receptor α por eso los noqueados para este isotipo son semejantes a los deficientes en PDGF-A (24).

STEEL O FACTOR DE CRECIMIENTO PARA MASTOCITOS O FACTOR DE CRECIMIENTO PARA STEM CELLS (SCF)

El factor de crecimiento para *stem cells* es necesario para el mantenimiento de células primordiales germinativas *in vitro* y de melanocitos *in vivo*. El factor es producido por células epiteliales, glóbulos blancos y fibroblastos (en especial miofibroblastos). Su receptor es el producto del protooncogen c-Kit, una proteína de membrana con un dominio TK, semejante a PDGFR, que se dimeriza para su activación. Los animales homocigotas con c-Kit noqueado mueren en el útero, los heterocigotas manifiestan anomalías en la motilidad intestinal. Los mutantes dobles negativos para *steel*, también mueren *in utero*, pero con anemia. Ciertos mutantes con el factor anormal desarrollan trastornos de la contractilidad intestinal. La aplicación de anticuerpos anti-Kit genera anomalías de la pigmentación. El factor también es necesario para la migración de las células primordiales germinativas. En la hematopoyesis, *steel* tiene un rol estimulante, sobre el precursor eritroide con un efecto sinérgico al de la eritropoyetina. En roedores, se demostró la importancia de este factor en la espermatogénesis, ya que el tratamiento con anticuerpos anti-*steel* disminuye la proliferación de las espermatogonias A e incrementa la entrada en apoptosis de espermatogonias y espermatocitos primarios. A diferencia de lo observado en roedores, en el hombre son más importantes las funciones del factor en la melanogénesis y en la

hematopoyesis que las relacionadas con la fertilidad (27).

c-Kit se expresa en una variedad especial de miofibroblastos del tracto gastrointestinal: las células intersticiales de Cajal, que conectan las fibras nerviosas y el músculo liso, y funcionan como marcapaso del músculo intestinal para la regulación de las ondas lentas (28). El tratamiento con anticuerpos contra Kit, en los primeros días de la vida, determina la pérdida de la red normal de células intersticiales de Cajal (29). Actualmente Kit se utiliza como marcador específico para tumores de estas células y permite diferenciarlos de otras neoplasias no epiteliales del aparato digestivo (30). Se demostró que las células de Cajal y algunos miocitos del tubo gastrointestinal tienen un origen común, si el factor que interviene es *steel* la diferenciación es hacia el primer tipo celular y si es PDGF es hacia el segundo (29).

FAMILIA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICOS

Pese a que la existencia de estos mitógenos se demostró experimentalmente en la década de 1940, el aislamiento de los mismos recién se produjo en 1984 a partir de extractos de hipófisis bovina que demostraron ser mitógenos para fibroblastos primarios en cultivo. FGF-1 o FGFa (ácido) y FGF-2 o FGFb (básico) fueron los primeros miembros de la familia caracterizados. Posteriormente se reconocieron otros miembros de la familia, de los cuales únicamente el FGF7 o KGF se encontró en los tejidos de mamíferos adultos. Los factores restantes fueron identificados a partir de oncogenes y su aparición normal solo se limitaría a ciertos momentos del desarrollo embrionario. Actualmente se considera que la familia comprende en vertebrados al menos 23 factores distintos. El prototipo de la familia es FGF-2 o bFGF. En su forma activa el FGF-2 es una proteína de 146 aác. y 16-18 KDa, aunque existen isoformas de mayor PM que penetran en la célula y llegan al núcleo (31, 32). En el suero humano el FGF-2 es detectable y su concentración presenta un evidente ritmo circadiano (33). También se detecta el factor en orina. Tanto en suero como en orina, la concentración de FGF-2 aumenta en ciertas neoplasias malignas (32).

Este péptido, a diferencia de la mayor parte de los FC, puede actuar no solo mediante la unión a receptores TK, sino también de forma directa sobre el núcleo, por internalización de complejos FGFR-FGF, que actuarían como factores de transcripción. Además, la li-

beración de FGF-2 se produce por un mecanismo diferente al demostrado para otros factores; la célula no lo secreta por exocitosis, sino que lo libera al ser destruida o cuando presenta alteraciones. En el medio extracelular, estos factores se unen a proteoglicanos ricos en heparán sulfato. Se han identificado 4 receptores de alta afinidad para los miembros de la familia, ellos son: FGFR-1, FGFR-2 (bek), FGFR-3, FGFR-4. Todas estas proteínas constan de un dominio de unión al ligando, un dominio transmembrana y un dominio TK intracitoplasmático (32).

In vitro se ha comprobado que estas sustancias poseen efectos mitogénicos, quimiotácticos y que ejercen acciones sobre la diferenciación celular que alcanzan a condrocitos, hepatocitos, osteoblastos, mioblastos, melanocitos, células indiferenciadas del SNC, epitelio esofágico, etc (32). *In vivo*, los FGFs estimulan la proliferación queratinocítica. Los ratones transgénicos negativos para FGFR en la capa suprabasal de la epidermis, poseen alteraciones en la organización de esta capa, su espesor se adelgaza y se altera la expresión de queratina 6, por lo que se cree que son esenciales para la morfogénesis de la epidermis. El tratamiento con FGF-2 o FGF-1 estimula el depósito de matriz extracelular durante la curación de las heridas cutáneas. En el caso de FGF-1 el proceso se observa tanto con la aplicación local del factor, como con el uso de plásmidos que expresan su gen (12). En conejos, FGF-2 acelera la curación de retinas injuriadas con rayos láser y de lesiones corneales. Los efectos sobre las úlceras corneales también se comprobaron en gatos, postulándose un potencial uso terapéutico para este tipo de heridas. La inoculación intravitreal de FGFs, inhibe la degeneración de fotorreceptores en la distrofia retiniana, mientras que FGF-2 induce la regeneración de la retina neural extirpada en el ojo de embrión de pollo. En un modelo experimental de infarto de miocardio canino, la inyección intracardiaca de FGF-2 estimula la función sistólica y reduce el tamaño de las áreas de infarto. El factor también mejora la funcionalidad del miocardio en porcinos con isquemia cardíaca crónica. En úlceras gastroduodenales, FGF-2 induce la neovascularización y la persistencia de matriz provisional sin formación de escara de colágeno, por lo que acelera la curación de úlceras duodenales. El sucralfato, una droga antiulcerosa, liga al FGF-2 protegiéndolo de la degradación. Estos resultados generan grandes expectativas sobre el uso futuro del factor en las gastropatías y enteropatías. La aplicación de FGF-2 en ratones, previene la neumonitis le-

tal inducida por radiación, esta observación coincide con que en lesiones intraalveolares agudas, los macrófagos alveolares incrementan la producción del factor (32).

Respecto al tejido óseo, cuando el factor se administra por vía parenteral estimula la proliferación osteoblástica y genera descenso del depósito de matriz. Diversas anomalías esqueléticas humanas como la acondroplasia y la craneostosis obedecen a mutaciones que interfieren con la función de algunos receptores para este factor, en especial el FGFR -3 (34).

En la carcinogénesis, el efecto más importante de los FGFs parece estar relacionado con la angiogénesis, antes que con la proliferación de las propias células tumorales. Esta función angiogénica también se observa en los tejidos normales. El mecanismo de secreción en este caso sería paracrino; el factor formado por los macrófagos estimularía la proliferación endotelial (32).

Los distintos miembros de la familia intervienen en la implantación y el desarrollo embrionario temprano. El FGFR-2 es necesario para que se produzca la fusión entre corion y alantoides, proceso indispensable para la nutrición embrionaria. Los ratones nulos para FGF-4 mueren en el momento de la implantación, este factor además mantendría indiferenciadas a las *stem cells* trofoblásticas. Tanto FGF-2 como FGF-4 y FGF-8 son necesarios para la formación de los miembros en el embrión. Los transgénicos con FGF-2 sobre-expresado tienen una mayor supervivencia de las neuronas sometidos a daño isquémico, algo semejante ocurre cuando se administra el factor a ratones neonatos con ligadura carotídea unilateral.

Los cambios en la concentración del factor y sus receptores se asociaron a numerosas alteraciones del sistema nervioso; por ejemplo en las placas seniles de la enfermedad de Alzheimer se acumula FGF-2 que atenúa los efectos neurodegenerativos del β -amiloide. En la enfermedad de Parkinson hay una baja cantidad de FGF-2 en la sustancia negra y en la enfermedad de Huntington se incrementa su expresión en forma proporcional a la severidad de la enfermedad. Estos datos sumados al efecto de FGF-2 sobre cultivos neuronales, en los que mejora la supervivencia, llevaron a especular que existe un efecto protector de FGF-2 sobre la degeneración neuronal (32).

EL KGF o FGF-7 es producido por las células estromales, actuando por vía paracrina sobre epitelios tales como epidermis, neumocitos tipo II, alvéolos mamarios y recubrimiento del tracto gastrointestinal. Tiene un peso molecular de 18 KDa. Su receptor se forma por el procesamiento alternativo del ARNm del FGFR-2 (35). *In vivo*, el tratamiento con KGF desencadena hiperplasia de neumocitos tipo II, conductos pancreáticos, epitelio gastrointestinal y glándula mamaria de rata, tanto hembras como machos. Los cambios producidos en la glándula mamaria recuerdan por su morfología a la hiperplasia intraductal atípica del humano (36). A diferencia de lo que ocurre con otros mitógenos epidérmicos como FGF-2 y EGF, KGF también estimula la proliferación celular en folículos pilosos y glándulas sebáceas. La expresión del ARNm de KGF se incrementa 160 veces en la piel del ratón con heridas de escisión. El efecto promotor de la proliferación no es tan marcado en ratones diabéticos (12). KGF induce la reepitelización que sigue a las injurias (35). El KGF también estimula la diferenciación epitelial elevando la expresión de ARNm de citoqueratinas. Para probar los efectos del factor en piel se realizó un experimento en cerdos con quemaduras, en este caso el tratamiento local con el factor incrementa la proliferación epidérmica sin actuar sobre el tejido de granulación (35). El tratamiento con KGF disminuye la mortalidad y la intensidad de las lesiones gastrointestinales en ratones con trasplante medular. El factor disminuye la generación de algunas citoquinas (por ejemplo TNF α) que intervienen en la patogenia de la enfermedad que ocurre en el animal transplantado. El KGF también protege al epitelio intestinal de los efectos nocivos de la quimioterapia (37).

SUPERFAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA

En 1978 De Larco y Todaro, aislaron una sustancia a la que denominaron factor de crecimiento del sarcoma murino. En los primeros ensayos este factor mostró capacidad para generar cambios fenotípicos reversibles en los cultivos celulares. Pocos años después se encontraron distintos isotipos del factor y se demostró que estas sustancias inhiben la proliferación celular y promueven la transformación de fibroblastos y la diferenciación de condrocitos, por entonces se las llamó TGF β . Por la misma época Moses y Holley demostraron que el TGF β es idéntico al inhibidor del crecimiento celular epitelial, aislado del mono verde africano. En 1987 se reunió a este péptido

con otros de un PM semejante, 25 KDa, como la inhibina, la activina y la sustancia inhibitoria de Müller (MIS), en la superfamilia del TGF β . Años después se agregaron otras sustancias como los BMPs, nodal, etc. Posteriormente se ha revisado la taxonomía del grupo hablando de una familia de TGF β dividida luego en subfamilias. Los miembros de la familia, excepto el GDNF y las inhibinas, poseen tres tipos de receptores. Los de tipo I: son quinasas de serina y treonina, encargadas de iniciar las cascadas de reacciones dentro de las células. Los receptores tipo II: se unen al ligando y activan al receptor tipo I. Los de tipo III: no participan de las reacciones pero facilitan la unión a los otros receptores, son ejemplos de este grupo las endoglinas y los betaglicanos, que son proteoglicanos de anclaje a la membrana (2, 3) (Fig. 3).

La familia de los TGF α incluye los isotipos 1,2,3,4,5 del TGF β de los cuales el prototipo es TGF β 1, un homodímero que posee muy alta conservación filogenética, existiendo un 98% de homología entre hombre y ratón. El TGF β se secreta en forma latente y su activación depende de proteasas liberadas tras el contacto célula-célula que clivan a la proteína precursora en el TGF β y el péptido asociado a latencia (38). Los TGF β s 1, 2 y 3 se localizan en diferentes tejidos de mamíferos, los gránulos alfa de las plaquetas y el hueso son las localizaciones en donde estos factores son más abundantes. Los TGF β 4 y 5 no se aislaron en mamíferos. Estos factores poseen receptores de los tres tipos mencionados. El de tipo I se denomina TGF β R I, el de tipo II se conoce como TGF β R II, dentro de los de tipo III el betaglicano es el más importante. Cuando el receptor tipo II se une al ligando, activa al receptor tipo I (por fosforilación), y éste último inicia la cascada de reacciones celulares originadas por el factor. En esta cascada, es fundamental la activación por fosforilación de las proteínas MAD (SMAD de *Drosophila*) que inician una serie de pasos que culmina con la regulación de la expresión de genes relacionados con el ciclo celular como Myc, Rb y p53 (3).

Los TGF β son los inhibidores de la proliferación celular más importantes. *In vitro* actúan sobre epitelios, endotelios y fibroblastos, entre otros tipos de células. Los TGF β , también estimulan la diferenciación y la síntesis de colágeno, fibronectinas y proteoglicanos en cultivos celulares (2). La mayoría de los ratones nulos para TGF β 1 mueren durante la vida prenatal, sin embargo algunos animales llegan a nacer y al cumplir tres semanas presen-

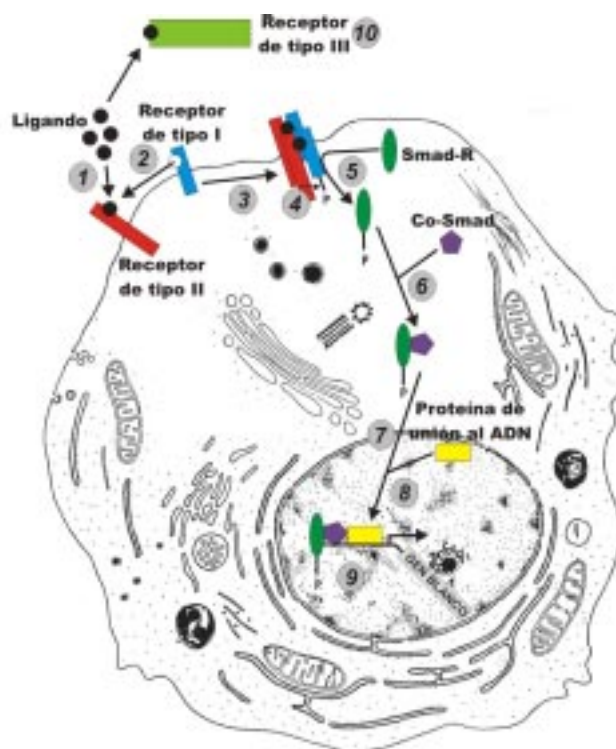


Figura 3. El ligando, un miembro de la superfamilia de los TGFβ, se une al receptor de tipo II (1). El complejo formado se une al receptor de tipo I (2-3), que se fosforila (4) y a su vez el complejo formado fosforila a la proteína Smad (5). Smad se une a una proteína Co-Smad (6) e ingresa al núcleo (7) en donde se liga a una proteína de unión al ADN (8) que modifica la expresión de genes específicos (gen blanco) (9). Los receptores de tipo III son componentes de la matriz extracelular que mantienen al ligando en la zona (10).

Figure 3. A member of TGFβ superfamily binds to type II receptor (1). The complex generated binds to type I receptor (2-3), that fosforilates itself (4) and the new complex formed fosforilates a Smad protein (5). Smad will bind to a Co-Smad protein (6) and ingress to nucleus (7) where it attach to DNA binding protein (8) modifying the expression of specific genes (target gen) (9). Type III receptors are components of the extracellular matrix that maintain TGFβ members around the zone (10).

tan inflamaciones de distintos órganos y mueren, lo que demuestra que estos factores también intervienen en los procesos inflamatorios. Los animales nulos para el TGFβ3 nacieron, pero mueren horas después con hendidura palatina e inmadurez pulmonar (39).

Durante la implantación y la preñez temprana, el TGFβ es producido por las células deciduales para inducir la síntesis de inhibidores de la metaloproteasas; por lo tanto su rol principal consiste en impedir una invasión excesiva por parte del trofoblasto. En estadios posteriores, el factor inhibe la proliferación del citotrofoblasto.

Los TGFβ son reguladores paracrinos y autocrinos negativos de la proliferación de diversas poblaciones celulares epiteliales como la epidermis, los enterocitos y los hepatocitos (2).

Los TGFβ intervendrían en la detención de la proliferación hepatocítica desencadenada después de la hiperplasia hepática que si-

gue a la hepatectomía y en el mantenimiento de la baja actividad mitótica del hígado intacto. El mecanismo sería paracrino, ya que el ARNm del factor se detectó en las células de Ito y en el endotelio pero no en los hepatocitos y células ductales (15). Los TGFβ son potentes inhibidores de la proliferación de las células ductales de la mama del ratón. Luego del desarrollo, la producción mamaria del factor decrece, pero aumenta en los tumores mamarios, en los que puede intervenir en la angiogénesis, o en la transformación de las células epiteliales hacia un fenotipo mesenquimático (Dickson and Lippman 1995). Las células de las criptas intestinales contienen más TGFβ a medida que se desplazan hacia la luz y disminuye su potencial proliferativo (2). En los enterocitos neoplásicos, a diferencia de lo que ocurre en su contraparte normal, el efecto de TGFβ puede ser mitogénico (40).

La administración de TGFβ1 induce la formación de tejido óseo en los huesos largos de rata. En heridas realizadas en orejas de co-

nejos, la aplicación de TGF β 1 recombinante no solo acelera la cicatrización de los tejidos blandos, sino que también incrementa la formación de hueso en la región por inducir la diferenciación osteoblástica de las células del pericondrio. Coincidiendo con estas observaciones, el TGF β 1 se detectó en sitios de osificación endocondral e intramembranosa y de reparación de fracturas (41).

Las plaquetas son el primer sitio de síntesis del factor durante los procesos de inflamación y reparación, luego es producido por las propias células inflamatorias. Actualmente se sabe que el TGF β es parte de la red de citoquinas inflamatorias, sus funciones en este proceso son complejas y exceden los objetivos de este trabajo. Se considera que en forma general es un factor que estimula la diferenciación de las células de la inflamación, pero cuando estas maduran las inhibe, favoreciendo la resolución. (38). En las heridas el TGF β 1 es liberado por las plaquetas y los macrófagos e induce quimiotaxis, proliferación y síntesis de colágeno en los fibroblastos dérmicos, colaborando en la reparación. La administración *in situ* del factor estimula la formación de tejido de granulación (42). Pese a inhibir la proliferación celular en la epidermis, el TGF β también favorecería la reepitelización por modificar las proteínas β de unión a matriz y en consecuencia los movimientos de los queratinocitos epidérmicos que ocurren en la fase migratoria de la reepitelización de heridas. La sobreexpresión de TGF β se asoció a esclerodermia, escaras hipertróficas y queloide (12, 42). En el hígado, TGF β induce a las células de Ito para que produzcan factores fibrogénicos, lo que genera así un círculo vicioso que culmina en la cirrosis (15). El TGF β interviene en la patogenia de las nefritis intersticiales, las injurias repetidas o un exceso de glucosa estimulan la producción de TGF β que produce un aumento de la síntesis de proteínas de matriz extracelular. Un modelo generado para explicar los procesos de regeneración y fibrosis renal, propone que ante una injuria única se libera HGF que induce regeneración tubular, pero ante injurias repetidas descende la concentración de HGF y se eleva la de TGF α lo que determina disminución de la proliferación y aumento de la apoptosis en epitelio y endotelio, además de aumento en el número de miofibroblastos y de componentes de matriz extracelular (43). La relación entre el TGF β y las neoplasias es compleja, ya que aunque en general el tratamiento con el factor inhibe el crecimiento tumoral, también genera un incremento de la malignidad y de la aparición de metástasis. El aumento de la

malignidad podría relacionarse con el efecto angiogénico y con el incremento de la motilidad. En el hombre, en el 80% de las formas de cáncer de colon y en la totalidad de los de páncreas hay modificaciones en la expresión de los genes relacionados con el patrón de señales de TGF β (40).

La familia de las inhibinas está constituida por péptidos diméricos, aislados del liquor folicular que poseen capacidad para regular la producción de FSH hipofisiaria. En la presente revisión no se consideran sus acciones sobre la reproducción, tan complejas que merecerían por sí solas un artículo. Las inhibinas, además de disminuir la síntesis hipofisiaria de FSH, inhiben la producción de esteroides gonadales y de hormonas placentarias (2). Las activinas son semejantes a las inhibinas, pero estimulan la síntesis de FSH. Estas sustancias actúan como mediadores simpáticos, modulan las funciones gonadales, intervienen en el metabolismo de la glucosa, regulan la proliferación y diferenciación de diversas poblaciones celulares e inducen la formación del mesodermo. Las activinas envían su señal a partir de un complejo receptor multimérico semejante al descrito para TGF β (39). En los embriones de algunos vertebrados la activina induce la formación de mesodermo dorsal e inhibe la inducción neural. La activina participa en los procesos de cicatrización. La inducción de la expresión de activina ya ocurre 15 horas después de producida una injuria cutánea. Los factores liberados por las plaquetas tales como PDGF, TGF β , EGF y las citoquinas inflamatorias IL-1 y TNF α producidas por los neutrófilos y los macrófagos inducen la elaboración de activina por parte de los fibroblastos, los queratinocitos y los macrófagos. En algunas enfermedades crónicas, como la cirrosis, se sintetizan grandes cantidades de activina que inducirían a los miofibroblastos a producir matriz extracelular. La activina también actuaría como mitógeno de miocitos lisos, por lo que se postula un rol de este factor en la patogenia de la aterosclerosis. En las lesiones del sistema nervioso la activina podría actuar como neuroprotector (44).

La familia del DPP está representada por unas veinte sustancias que intervienen en el desarrollo embrionario de los metazoarios, habiéndose encontrado representantes en organismos que van desde la *Drosophila* hasta el hombre. Sus funciones incluyen la participación en la supervivencia y proliferación celular, morfogénesis, diferenciación y apoptosis. Dentro del grupo encontramos a los BMP,

péptidos que en conjunto inducen respuestas de quimiotaxis, proliferación y diferenciación que culminan con la transformación de un molde cartilaginoso en hueso con médula ósea (2, 45). La función de los BMPs en la morfogénesis parece ser muy amplia. Estos factores intervendrían en la formación y evolución del mesodermo de la región caudal del cuerpo en aves y mamíferos. También parecen ser los BMP-2, 4 y 7 los responsables de la apoptosis de las células de las membranas interdigitales en la morfogénesis de los miembros de aves y mamíferos (46). Los BMPs-2, 4 y 7 actúan durante la odontogénesis del ratón en el nudo del esmalte inhibiendo la proliferación epitelial. Este efecto antiproliferativo también ocurre en el pulmón embrionario; en cambio en riñón, ojo y ectodermo embrionario, los BMP son necesarios para la proliferación celular epitelial.

En el ectodermo BMP-4 es un inductor de diferenciación epidérmica, por lo que debe ser anulado, por la unión a proteínas como la cordina, para que se desarrolle el sistema nervioso y ocurra la dorsalización del embrión; además este factor determina que el mesodermo formado sea de tipo dorsal. En *Drosophila* la expresión de los inhibidores de DPP (el homólogo de BMP), es inversa a lo que ocurre en vertebrados, según algunos autores esto explicaría las diferencias en el eje corporal entre los cordados y otros animales (3, 45) (Fig. 4).

Trabajos recientes involucran a estos factores en los procesos de diferenciación que ocurren en los tumores mixtos de la mama canina. EL BMP-6 se detecta en las células mioepiteliales de los tumores mixtos de la mama de perra e induce la diferenciación de

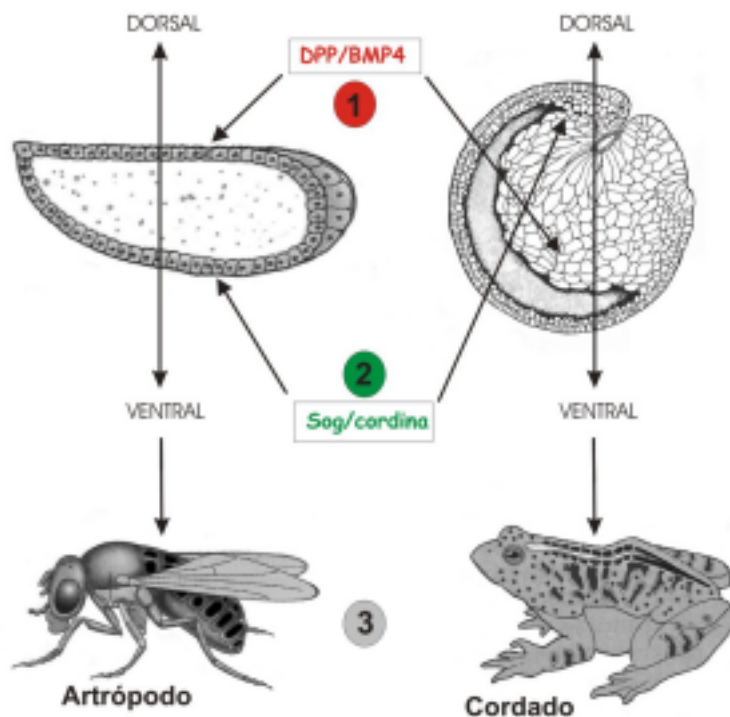


Figura 4. Acciones de los miembros de la familia DPP y sus proteínas inhibidoras en la formación del eje dorsal de artrópodos y cordados.

- (1) A. En artrópodos, la expresión del gen DPP determina la formación de estructuras dorsales. B. La expresión del homólogo de este gen en cordados, BMP4, determina la formación de estructuras ventrales.
- (2) Sog/cordina son proteínas que anulan los efectos de los productos de DPP y BMP4 respectivamente, por lo que determinan la formación de estructuras opuestas.
- (3) La diferencia en la expresión de estos cuatro genes genera una inversión entre los planes corporales de invertebrados y cordados.

Figure 4. Actions of DPP family members and its inhibits proteins in the formation of arthropods and chordates dorsal axis.

- (1) A. In arthropods, DPP gen expression determinates the formation of dorsal structures. B. In chordates, the expression of BMP4 determinates the formation of ventral structures.
- (2) Sog/cordina are proteins that cancel the effects of DPP and BMP4 products respectively determinating the formation of opposite structures.
- (3) The difference in the expression of this four genes generates an inversion between invertebrates and chordates corporal planes.

estas hacia tejido condroide y óseo. Sin embargo cuando los tumores se malignizan no expresarían el factor, ya que el mismo activa la diferenciación e inhibe la proliferación celular (47). EL BMP-7, por sus efectos fibrogénicos, esta involucrado en la patogenia de la nefritis intersticial crónica (48).

La familia también incluye algunos de los denominados GDFs que entre otras funciones son inhibidores específicos del crecimiento de algunos tejidos (49).

MIS es el único representante de su familia. Esta sustancia induce la regresión de los conductos de Müller en el embrión masculino. La expresión de MIS se restringe a las células de Sertoli fetales y adultas y a la granulosa del ovario postnatal. La síntesis de MIS comienza en el momento en que se inicia la formación de los tubos seminíferos, siendo máxima la secreción durante el período de regresión de los conductos y descendiendo abruptamente en la pubertad. En las hembras, MIS se detecta en folículos preantrales y antrales, especialmente en las células cercanas al ovocito e inhibe el crecimiento inicial de los folículos primordiales (50).

La familia del GDNF también contiene un solo representante, que posee una homología del 20% con TGF β . El GDNF es un factor de supervivencia para neuronas dopaminérgicas del cerebro medio. Pese a que está relacionado con el TGF β , uno de los receptores de GDNF es una TK, específicamente este receptor es el producto del protooncogen Ret. Antes del aislamiento de GDNF, se conocía a Ret como oncogen, ya que su sobre-expresión predispone la aparición de neoplasias endocrinas, especialmente carcinomas tiroideos, mientras que la pérdida de su función, origina algunas formas familiares de enfermedad de Hirschsprung, un desorden en el desarrollo de la cresta neural que incluye defectos de la inervación intestinal (Massagué 1998). Al analizar mutantes de este receptor en hombre y ratón se demostró que Ret es necesario para el desarrollo del aparato digestivo y el riñón. En el riñón embrionario se encontró que en el mesénquima del futuro metanefros se expresa GDNF, mientras que en el epitelio del brote ureteral se expresa c-Ret (Figura 5). Ret también se expresa en las neuronas entéricas. En general los homocigotas deficientes del factor nacen vivos pero mueren a los 2 días, el 100% de estos animales poseen agenesia o disgenesia bilateral del riñón, con ausencia o anomalías del brote ureteral (13).

Nodal es un miembro de la superfamilia que se expresa de forma asimétrica en el embrión de ratón y pollo e intervendría en la formación del eje derecho-izquierdo. Su ausencia determina falta de formación de la línea primitiva y defectos en la dorsalización del embrión (3).

FACTOR DE CRECIMIENTO PARA HEPATOCITOS

En la década de 1980 se aislaron una serie de sustancias de PM semejante, pero con acciones muy diversas, entre ellos se pueden mencionar la hepatopoyetina A, el factor scatter, el factor citotóxico tumoral y el factor mitógeno epitelial derivado de fibroblastos. Posteriormente se demostró que todas estas eran en realidad un único factor de localización y acciones múltiples, al que se denominó HGF. El HGF es un modulador pleiotrópico de la proliferación, morfogénesis y desplazamiento epitelial. Actúa con frecuencia por mecanismos endocrinos y paracrinos; en el hígado es sintetizado por las células de Ito y en el riñón por las endoteliales y mesangiales. La molécula del HGF, de 100 KDa, es más pesada que la de otros FC. Está constituida por dos cadenas polipeptídicas de 463 y 234 aminoácidos, que poseen más homología con ciertas proteasas que con otros FC. El receptor, HGFR, es una TK, producto del protooncogen c-Met. Por lo general el HGFR se encuentra en epitelios y melanocitos y liga al factor producido por células del estroma (15, 43).

In vitro, HGF es el mitógeno más potente para hepatocitos, estimulando también la proliferación de células de túbulos colectores y proximales renales, y de líneas celulares de melanomas y de carcinomas mamarios. El HGF también modifica la motilidad de las células de diversos cultivos primarios y de numerosas líneas celulares (43). Este factor interviene en la regeneración hepática que sigue a una hepatectomía subtotal en roedores. En el inicio de la respuesta, actúa mediante un mecanismo endocrino ya que lo producen las células del estroma del bazo, riñón y pulmón. Posteriormente, el factor es sintetizado por las células de Ito y actúa en forma paracrina. Las investigaciones más recientes demostraron que para la manifestación plena de las acciones de HGF se necesita que los hepatocitos hayan salido del estadio G0 del ciclo celular, pasaje que estaría regulado por TNF α e IL6. Dentro de los pacientes humanos con hepatopatías, los que padecen falla hepática fulminante tienen un valor máximo de HGF sérico, lo que se asocia con un mayor índice de su-

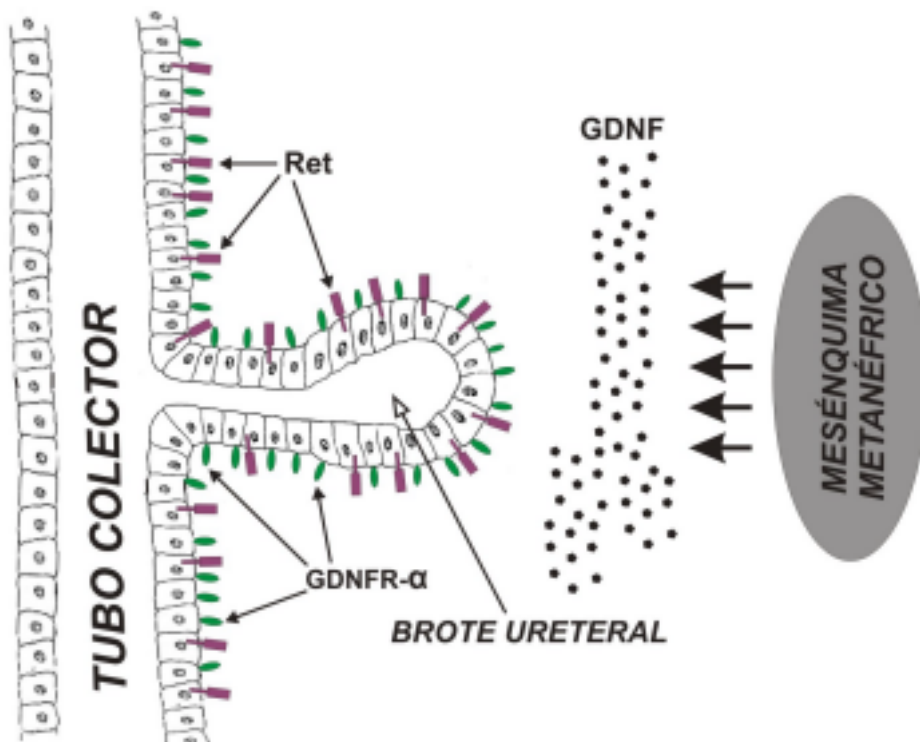


Figura 5a. Producción de GDNF por parte del mesénquima del blastema metanéfrico. Este factor se une a los GDNFR- α existentes en el brote ureteral, para inducir la formación de los tubos colectores.
 Figure 5a. Expression patterns. GDNF production from the mesenchyme of metanephric blastema. This factor binds to the GDNFR- α ureteral germ receptors for induce collector tubes formation.

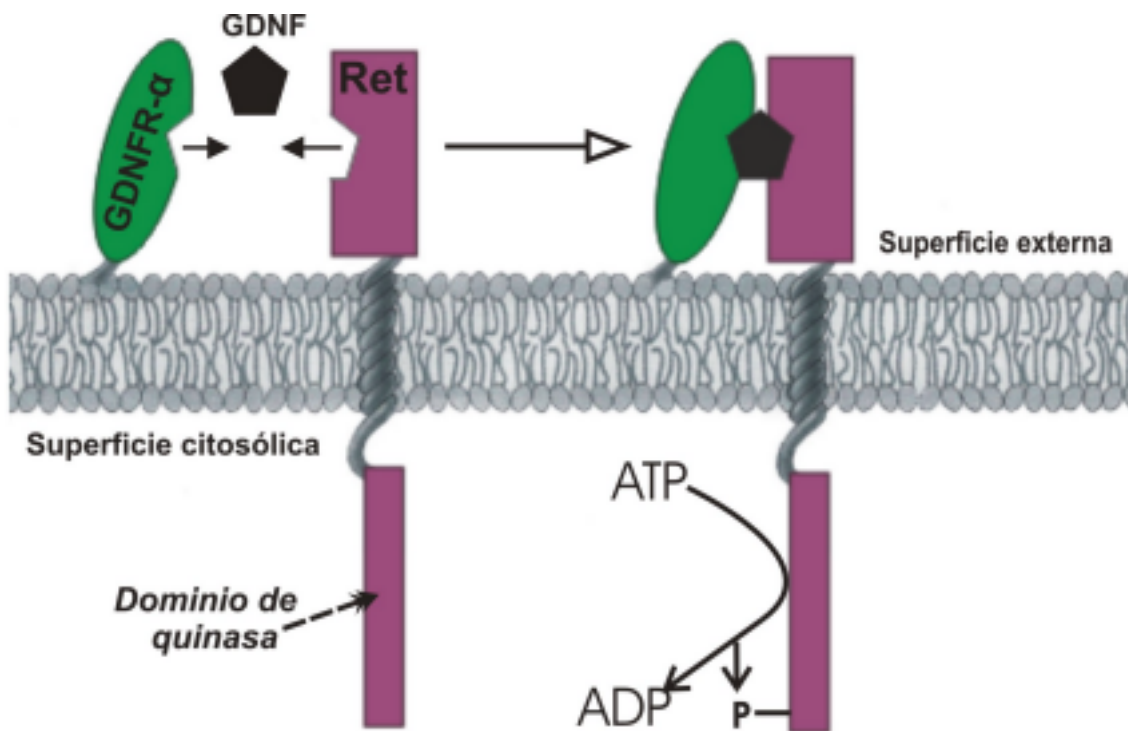


Figura 5b. Activación de ret. Pese a ser un miembro de la superfamilia del TGF β , GDNF se une a un receptor (Ret), que es una quinasa de tirosina.
 Figure 5b. Ret activation. Although it is a member of the TGF β superfamily, GDNF binds to a Ret receptor which is a tyrosin kinase.

pervivencia, por lo que la concentración sérica del factor adquiere valor en el pronóstico de algunas enfermedades hepáticas graves (15, 51). En la regeneración renal parece ocurrir una secuencia semejante, actuando primero HGF en forma endocrina y luego mediante mecanismos paracrin. HGF corresponde a la sustancia denominada a mediados del siglo XX renotropina. Tanto en el riñón como en el hígado, el rol de HGF sobre el desarrollo del estroma que sigue al daño crónico es opuesto al de TGF β . Matsumoto y Nakamura desarrollaron un modelo para explicar el efecto de estos factores. Al principio del proceso regenerativo la concentración de HGF es alta, este factor es antiapoptótico y mitogénico sobre el parénquima y el endotelio, e inhibe la formación de miofibroblastos y el desarrollo de matriz extracelular. Posteriormente comienza a desaparecer HGF y se incrementa la concentración de TGF β que tiene las acciones opuestas. Cada uno de estos factores inhibe la transcripción de los genes que codifican al otro. La administración de HGF previene la esclerosis renal por disminuir los niveles de TGF β . El tratamiento directo con este factor o la terapia génica con el ADN que lo codifica, podrían ser útiles en enfermedades en que está alterada la reparación (43).

Se ha relacionado a HGF con ciertas enfermedades placentarias y se le atribuye una participación importante en la formación de estructuras epiteliales con luz y en la morfogénesis de las criptas intestinales. En los tumores sus acciones son complejas. Sobre los carcinomas mamarios ductales que poseen células de aspecto mesenquimático, y carecen de la proteína de adhesión E-cadherina, el factor favorece la aparición de metástasis, ya que incrementa las uniones a la sustancia intercelular y la motilidad celular. En cambio, sobre los tumores con células de aspecto epitelial (que poseen E-cadherina) el factor induce formación de estructuras con luz, con reducción de la malignidad (1, 52).

Los ratones nulos para el factor mueren con trastornos en las células del trofoblasto y en la formación del hígado y del dermomiótomo. El HGF y su receptor se expresan en el metanefros ya inducido por la yema ureteral, ratón y poseen efectos importantes en la nefrogénesis. Aunque sobre el metanefros el mecanismo sería autocrino, también actuaría en forma paracrina sobre la formación y crecimiento de las ramas del brote ureteral. El tratamiento con anticuerpos anti-HGF genera anomalías en el desarrollo de la yema ureteral y de las neuronas (13).

FAMILIA DEL VEGF

El VEGF, o VEGF-A, es un factor que liga a dos TK: Flt1 (VEGFR1) y KDR (VEGFR2). Fue el primer miembro de su familia detectado, pero posteriormente se secuenciaron sustancias semejantes como PlGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y E. Este factor actúa en forma paracrina, siendo el angiogénico más potente conocido. La expresión de su gen se estimula por la hipoxia, aumentando en la mayor parte de las neoplasias. En las heridas se produce VEGF en los queratinocitos, lo que es menos manifiesto en ratas diabéticas (53, 54).

La formación de nuevos vasos en la vida post-natal es un proceso muy complejo; la expresión del gen de VEGF es inducida de forma indirecta por la hipoxia que estimula la expresión de factores de transcripción del grupo HIF que inducen la expresión de distintos genes relacionados con la angiogénesis tales como VEGF, NOS, PDGF y Ang 2. La acción de VEGF determina la formación de vasos inmaduros y altamente permeables, posteriormente Ang 1, E-cadherina y PECAM, generan la maduración de los vasos formados (54, 55).

Los mutantes negativos para los receptores del factor mueren *in utero* con defectos en la formación de vasos y sangre. Los transgénicos que carecen del receptor VEGFR1 mueren sin desarrollar el brote hepático, lo que se debería a los efectos inductores del endotelio sobre el endodermo, necesarios para la formación del hígado. VEGF también incrementa la permeabilidad vascular, posee algunas acciones sobre células del sistema inmune y tendría roles relevantes en la patogenia de ciertas enfermedades como la artritis reumatoidea y la retinopatía diabéticas. En un modelo de conejos operados en la arteria femoral, para simular los cambios que genera la aterosclerosis en miembros, se evidencia una mejoría clínica al inyectar el factor en la arteria, con neovascularización de los miembros. Un resultado semejante se observó en modelos experimentales de perro y cerdo con hipoxia miocárdica, en los que la administración del factor redujo el área de infarto por aumento de la circulación colateral.

Mientras algunos especialistas consideran que el empleo de anticuerpos específicos contra VEGF y su receptor constituyen tratamientos potenciales para las neoplasias, otros expertos creen que la complejidad de los procesos que intervienen en la angiogénesis hace difícil su aplicación terapéutica. En cuanto al uso terapéutico de VEGF debemos considerar que si bien generaría efectos beneficiosos, tam-

bién puede desencadenar hipotensión y edemas (53, 55).

A diferencia de VEGF-A, B y E que son angiogénicos, VEGF C y D están implicados en la linfangiogénesis. Los tumores que sobre-expresan VEGF-D y C poseen mayor cantidad de vasos linfáticos peri e intratumorales. Además, el tratamiento con anticuerpos contra VEGF-D, disminuye el número de metástasis linfáticas de los tumores de estos animales. La linfangiogénesis en carcinomas mamarios transplantables puede bloquearse utilizando una forma soluble del VEGFR3. Los tumores humanos con alta concentración de estos factores poseen abundante cantidad de vasos linfáticos. No se conoce el mecanismo que induce la expresión de los genes de VEGF-C y D, pero no interviene la hipoxia como ocurre con otros miembros de la familia (56).

Los receptores de VEGF pueden utilizarse como marcadores de células endoteliales o de ciertos tumores, por ejemplo VEGFR3 es un marcador del sarcoma de Kaposi humano y VEGFR2 se utiliza como marcador de angioblastos (54, 55).

FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL DERIVADO DE GLANDULAS ENDOCRINAS

Este factor no está relacionado con los otros VEGF. Tiene un PM de 8.6 KDa. Su ARNm se encuentra en las glándulas endocrinas esteroideogénicas como ovario, testículo, corteza adrenal y placenta. La hipoxia induce su producción. El tratamiento con este factor genera proliferación, migración y formación de fenestras en las células endoteliales. Sin embargo, sus efectos se limitan a las células endoteliales de las glándulas productoras de hormonas esteroides, en las que complementa la acción de VEGF. Los animales que sobre-expresan el factor poseen una elevada frecuencia de quistes ováricos (53, 57).

ANGIOPOYETINAS

Las angiopoyetinas constituyen una familia de factores formada por 4 miembros, de los cuales los más importantes son Ang-1 y Ang-2. Los receptores de estos factores son las TK del grupo Tie. Los ratones nulos para Ang-1 o su receptor desarrollan una vasculatura primaria normal, pero al proseguir el desarrollo manifiestan defectos en la remodelación tisular y en el desarrollo cardíaco. La sobre-expresión de Ang-1 en la piel origina hipervascularización, con aumento del tamaño pero no del número de vasos. La terapia

génica con el factor disminuye la permeabilidad vascular, lo que podría ser importante para el tratamiento de la retinopatía diabética y el edema cerebral. Mientras que Ang-1 actúa mediante mecanismos paracrinos, Ang-2 es autocrino. Ang-2 es producido por el endotelio actuando como un antagonista de Ang-1. Ang-2 también interviene en la linfangiogénesis (55).

EFRINAS

Las efrinas son FC atípicos que para unirse a sus receptores deben adherirse a la membrana celular. Existen diversas efrinas, las más importantes son la B2 y la B4. Los ratones noqueados para los genes que codifican estas sustancias presentan defectos fatales en la vasculogénesis (formación de los vasos que ocurre en la vida prenatal). Durante la vida prenatal, la efrina B2 se localiza en el endotelio arterial y la B4 en el venoso, por lo que se cree que podrían intervenir en la determinación del tipo de vaso a formar. En el adulto la expresión no es endotelial como en el feto, si no que ocurre en músculo liso y pericitos. Sin embargo las efrinas vuelven a expresarse en el endotelio cuando existen cambios patológicos como presencia de neoplasias, o fisiológicos como los que ocurren en los ciclos sexuales femeninos. Estas sustancias también actúan como inductores durante el desarrollo embrionario (58).

CONCLUSIONES GENERALES. UN NUEVO PARADIGMA PARA LA BIOLOGÍA Y LA PATOLOGÍA DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO

En el último cuarto de siglo numerosos trabajos mostraron las relaciones entre distintos FC en procesos biológicos complejos como la regeneración de órganos, la cicatrización de heridas y la carcinogénesis. Por ejemplo, en la cicatrización de heridas las plaquetas producen TGF β 1 y PDGF que activan a los fibroblastos para la formación de tejido de granulación, debido a que inducen a estas células a formar metaloproteasas de matriz que degradan a la sustancia intercelular, favoreciendo la formación de nuevos vasos. Por otra parte estos fibroblastos activados producen FC como FGF-2 que estimula la angiogénesis. Entre las células neoplásicas y las células normales del estroma tumoral también se observa un mecanismo de activación recíproca mediado por FC; las células tumorales producen FC que estimulan a los fibroblastos y macrófagos a producir metaloproteasas y otros factores como PDGF, TGF β 1 y FGF-2 que posibilitan la progresión tumoral (42).

Los FC son sustancias de aparición muy temprana en la evolución filogenética de los animales. Al actuar en forma autocrina y paracrina, pueden ser mensajeros que anteceden a la formación de un sistema circulatorio bien desarrollado, esto ocurre tanto en la ontogenia como en la filogenia. Muchos FC de mamíferos tienen sus homólogos no solo en otros vertebrados, sino también en artrópodos y nematodos. La conservación evolutiva se manifiesta tanto en la estructura como en la función. Muchas de las sustancias inductoras, cuya naturaleza fue desconocida hasta fines de la década de 1980, se reconocen hoy como FC, tal es el caso de los miembros de la familia del FGF, de los IGFs, de las activinas, de los BMP y de algunos factores angiogénicos (21).

Como las acciones de los FC son múltiples, también lo son sus potenciales usos. Muchas de las aplicaciones de éstas moléculas se señalaron a lo largo de la presente revisión, por lo que mencionaremos aquí solo unas pocas a modo de ejemplo. Para TGF β se proponen usos en la cicatrización de heridas, también en la resolución de fracturas y en enfermedades autoinmunes. Además se especula sobre el uso de inhibidores del factor en trastornos de la matriz extracelular y de la cicatrización (59). El uso de TGF β como antineoplásico puede ser importante en ciertas leucemias. Pero el uso sistémico del factor parece imposible porque produce caquexia y fibrosis generalizada (40). El tamoxifeno, una droga antiestrogénica, que estimula a los fibroblastos uterinos a producir TGF β , previene la aparición de lesiones precancerosas. Con respecto a otras familias de factores, se determinó el valor pronóstico de c-erb B2 en adenocarcinomas de mama, estómago y endometrio; se propuso además bloquear dicha proteína como tratamiento antitumoral. En cuanto al uso terapéutico de la inhibición de los FC, un mecanismo podría ser el empleo de anticuerpos contra el factor o el tratamiento con drogas que inhiban a las TK. Se han encontrado resultados prometedores en distintos tumores con diversas sustancias, como las tirfostinas un grupo de drogas sintéticas de bajo PM, que bloquean la actividad TK de los receptores de FC. Para el caso del EGFR se han realizado numerosos ensayos en animales de experimentación y en pacientes humanos con distintos anticuerpos e inhibidores y se ha propuesto el uso de los mismos combinados con otros agentes quimioterápicos (6).

Debe considerarse para cualquier uso terapéutico de los FC, la vía de administra-

ción. Al respecto sirve de ejemplo el experimento realizado por Shah *et al.*, estos autores observaron que el tratamiento tópico de ratones con TGF β 1 acelera la cicatrización cutánea con mayor depósito de sustancia extracelular. Sin embargo los ratones transgénicos que sobreexpresan TGF β 1, tienen peor cicatrización que los controles. Se comprobó que en los transgénicos aumenta la concentración sérica del factor, pero disminuye la local. En este caso un tratamiento sistémico con TGF β sería negativo para la cicatrización, a diferencia de lo que ocurre con la aplicación *in situ* del péptido. Tampoco deben olvidarse las variaciones de especie, por ejemplo a diferencia de lo observado en ratón, en la rata la administración sistémica de TGF β -1 mejora la cicatrización de las heridas (59).

Podría ser importante regular la concentración de HGF, en ciertos tumores, así se han estudiado receptores del factor que no desencadenan respuestas biológicas (ej. NK4); inhibidores no específicos (ácidos grasos poliinsaturados, IL 4 y 2, ácido retinoico); inhibidores del receptor met; ARN antisentido contra el ARN de met o de HGF y antibióticos de la familia de la geldanamicina que activan a la plasmina inhibiendo a HGF (60). Los efectos colaterales del tratamiento con FC podrán ser una de las grandes limitaciones para su uso. Por ejemplo el empleo de IGF-I podría mejorar el deterioro neuronal que ocurre con la edad (22), pero niveles altos de este mismo factor incrementan el riesgo a tumores de mama, próstata y pulmón.

Otro uso potencial de mucho interés es la generación, *in vitro*, de células humanas para su posterior implantación en el organismo, lo que permitiría, por ejemplo, el reemplazo de neuronas dañadas. Es interesante el descubrimiento de dos líneas celulares multipotentes en el sistema nervioso central, una dependiente de FGF, la otra de EGF, que pueden originar neuronas (14).

Para culminar se puede aseverar que estamos frente a sustancias cuyo estudio interesa a ciencias tan distintas como la oncología clínica y la taxonomía, como la producción animal y la paleontología. Este interés múltiple hizo que en pocos lustros, los FC pasaran de ser una rareza de los laboratorios a constituir uno de los pilares sobre los que se sustentan la biología y la patología del crecimiento y desarrollo animal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dickson RB, Lippman ME. Growth factor in breast

C. Barbeito y col.

- cancer. *Endocrine Rev* 1995; 16: 559-589.
2. Massagué J. The Transforming Growth Factor β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 597-641.
 3. Massagué J. TGF- β -signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-791.
 4. Jones SM, Kazlauskas A. Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. *FEBS Letters* 2001; 490:110-116.
 5. Cross M, Dexter M. Growth factors in development transformation and tumorigenesis. *Cell* 1991; 64:271-280.
 6. Herbst RS. Review of Epidermal Growth Factor Receptor Biology. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2004; 59 (2):21-26.
 7. Stern LE, Falcone RA, Kemp CJ, Braun MC, Erwin CR, Warner B. Salivary Epidermal Growth Factor and intestinal adaptation in male and female mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278:G871-G877.
 8. Scheving LA, Tsai TH, Scheving LE. Circadian-dependent response in DNA synthesis to Epidermal Growth Factor in spleen, bone marrow, and lung and in mitotic index of corneal epithelium in ad-libitum-fed and fasted CD2F1 mice. *Prog Clin Biol Res* 1987; 227: 181-191.
 9. Scheving LA, Tsai TH, Cornet LE, Fexers RJ, Scheving LE. Circadian variation of EGFR in mouse liver. *Anat Rec* 1989; 224: 459-465.
 10. Breider MA, Bleavins MR, Reindel JF, Gough AW, De La Iglesia FA. Cellular hyperplasia in rats following continuous intravenous infusion of recombinant human Epidermal Growth Factor. *Vet Pathol* 1996; 33: 184-194.
 11. Wu JC, Merlino G, Cvelovka K, Mosinger B, Fausto N. Autonomous growth in serum-free medium and production of hepatocellular carcinomas by differentiated hepatocytes lines that overexpress Transforming Growth Factor alfa. *Cancer Res* 1994; 54: 5964-5973.
 12. Suter M, Cramer FM, Olivry T, Mueller E, Von Tschanner C, Jensen PJ. Keratinocyte biology and pathology. *Vet Dermatol* 1997; 117 (8): 67-100.
 13. Hammerman MR. Growth factors in renal development. *Seminars Nephrol* 1995; 15:292-299.
 14. Wing R, Wong C, Guillaud L. The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2004; 15: 147-156.
 15. Michalopoulos GK, De Frances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276: 60-66.
 16. Marchionni MA. Neu tack on neuregulin. *Nature* 1995; 378: 334-335.
 17. Danilenko DM, Ring BD, Tarpley JE, Morris B, Van GY, Morlawieck A, Callahan W, Goldemberg M, Hershenson S, Pierce GI. Neu Differentiation Factor upregulates epidermal migration and integrin expression in excisional wounds. *Am J Pathol* 1995; 147: 1261-1277.
 18. Jones J, Clemmons DR. Insuline-Like Growth Factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Rev* 1995; 16: 3-34.
 19. Rosen CJ, Donahue LR, Hunter SJ. Insuline-like Growth Factor and bone: the osteoporosis connection. *P.S.E.B.M.* 1994; 206: 83-102.
 20. Nayak NR, Giudice LC. Comparative biology of the IGF system in endometrium, decidua and placenta, and clinical implications for foetal growth and implantation disorders. *Placenta* 2003; 24: 281-296.
 21. Teruel M, Smith R, Catalano R. Growth factors and embryo development. *Biocell* 2000; 24: 107-122.
 22. Van Dam PS, Aleman A. Insulin-like Growth Factor-I, cognition and brain aging. *European Journal of Pharmacology* 2004; 490: 87-95.
 23. Valenzuela CF, Kazlauskas A, Weiner JL. Roles of Platelet Derived Growth Factor in the developing and mature nervous systems. *Brain Res Rev* 1997; 24: 77-89.
 24. Betsholtz C, Karlsson L, Lindahl P. Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays* 2001; 23: 494-507.
 25. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999; 79: 1283-1313.
 26. Annex BH, Simons M. Growth factor-induced therapeutic angiogenesis in the heart: protein therapy. *Cardiovasc Res* 2005; 65 (3): 649-55.
 27. Loveland KL, Schlatt S. Stem Cell Factor and C-kit in the mammalian testis: Lessons originating from mother nature's gene knockouts. *J Endocrinol* 1997; 153: 337-344.
 28. Márquez S, Galotta J, Portiansky EL, Barbeito CG. Characterisation of interstitial cells of Cajal in the bowel of the cattle (*Bos taurus*). Aceptado para ser publicado en *Veterinary Research Communication* 2005; Vol 25.
 29. Ward SM, Sanders KM. Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: from bench to bedside I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G602-G611.
 30. Casco F, Praderia L, Fanjul M, Pianzola H, Ottino A, Barbeito C, Corrons F, Pianzola M, Vogel J. Tumores estromales gastrointestinales. *Revista Médica de La Plata* 2003; 37: 16-20.
 31. Wiedlocha A, Sorensen V. Signaling, internalization, and intracellular activity of fibroblast growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004; 286: 45-79.
 32. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological rol of Fibroblast Growth Factor-2. *Endocrine Rev* 1997; 18:26-45
 33. Haus E, Dimitriu L, Nicolau GY, Bologa S, Sackett-Lundeen L. Circadian rhythms of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth

- factor 1 (IGF-I), insulin like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3), cortisol and melatonin in women with breast cancer. *Chronobiol Int* 2001; 18: 709-717.
34. De Moerlooze L, Dickson C. Skeletal disorders associated with Fibroblast Growth Factor Receptor mutations. *Current Op Gen Develop* 1997; 7: 378-385.
35. Sato C, Tsubo R, Shi C, Rubin JS, Ogawa H. Comparative study of Hepatocyte Growth Factor/ Scatter Factor and Keratynocyte Growth Factor effects on human keratynocytes. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 958-963.
36. Yi ES, Bedoya AA, Lee H, Kim S, Housley RM, Aukerman SL, Tarpley JE, Starnes C, Yin S, Pierce GF, Ulich TR. Keratinocyte growth factor causes cystic dilation of the mammary glands of mice. Interactions of keratinocyte growth factor, estrogen, and progesterone *in vivo*. *Am J Pathol* 1994; 145: 1015-1022.
37. Finch PW, Rubin JS. Keratinocyte Growth Factor/Fibroblast Growth Factor 7, a homeostatic factor with therapeutic potential for epithelial protection and repair. *Adv Cancer Res.* 2004; 91: 69-136.
38. Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. What is Transforming Growth Factor Beta (TGF- β)?. *The British Association of Plastic Surgeons* 2004; 57: 215-221.
39. Lau AL, Shou W, Guo Q, Matzuk MM. Transgenic approaches study the functions if the Transforming Growth Factor- β superfamily members. En: Aono T, Sugino H, Vale W. *Inhibin Activin and Follistatin. Regulatory functions in system and cell biology.* Ed. Springer-Verlag. New York (USA), 1997; p. 22-43.
40. Pasche B. Role of Transforming Growth Factor β in cancer. *J Cell Physiol* 2001; 186: 153-168.
41. Beck LE, Amman AJ, Aufdemorte TB, Deguzman L, Xu Y, Lee WP, McFatrige LA, Chen TL. *In vivo* induction of bone by recombinant human Transforming Growth Factor β 1. *J Bone Min Res* 1991; 6: 961-967.
42. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience* 2004; 9 (1): 283-289.
43. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte Growth Factor: Renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney int* 2001; 59: 2023-2038.
44. Hubner G, Alzheimer C, Werner S. Activin: a novel player in tissue repair processes. *Histol Histopathol* 1999; 14: 295-304.
45. Hogan BLM. Bone morphogenetic proteins in development. *Cur Op Gen Develop* 1996; 6: 432-438.
46. Zou H, Niswander L. Requirement of BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science* 1996; 272: 738-741.
47. Tateyama S, Uchida K, Hidaka T, Hirao M, Yamaguchi R. Expression of Bone Morphogenetic Protein-6 (BMP-6) in myoepithelial cells in canine mammary gland tumors. *Vet Pathol* 2001; 38: 703-709.
48. Kalluri R, Zeisberg M. Exploring the connection between chronic renal fibrosis and bone morphogenic protein-7. *Histol Histopathol* 2003; 18: 217-224.
49. Gamer LW, Nove J, Rosen V. Return of the Chalcones. *Developmental Cell* 2003; 4: 143-151.
50. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002; 143: 1076-1084.
51. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2001; 32 (1): 19-31.
52. Martin TA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. Hepatocyte growth factor disrupts tight junctions in human breast cancer cells. *Cell Biology International* 2004; 28: 361-371.
53. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocrine Reviews* 2004; 25: 581-611.
54. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1011-1027.
55. Carmeliet P. Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Med* 2000; 6: 389-395.
56. Plate KH. From angiogenesis to lymphangiogenesis. *Nature Med* 2001; 7: 151-152.
57. Lecouter J, Kowaiski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz J, Rangell L, Deguzman L, Keller G, Peale F, Gurney A, Hillan K, Ferrara N. Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *412:877-884. Nature* 2001; 412: 877-884.
58. Kullander K, Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 475-486.
59. Shah M, Revis D, Herrick S, Baillie R, Thorgeirson S, Ferguson M, Roberts A. Role of elevated plasma Transforming Growth Factor β -1 levels in wound healing. *Am J Pathol* 1999; 154: 1115-1124.
60. Jiang GW, Martina TA, Parr C, Davies G, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2005; 53: 35-69.

EFFECTO DE LOS PROCESOS DE CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LA FERTILIDAD SEMINAL

MC Stornelli¹, CM Tittarelli², CA Savignone³, MA Stornelli¹

¹Cátedra de Reproducción Animal. ²Cátedra de Fisiología. ³Cátedra de Histología.
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

Resumen: *La fertilidad del semen criopreservado es inferior a la del semen fresco. Este hecho está relacionado con los daños subletales instaurados en la población espermática que sobrevive al proceso de congelación. Diversos factores (shock de frío, velocidad de enfriamiento, composición de los diluyentes y estrés osmótico) que ocurren durante el proceso de congelación, son responsables de la disminución de la fertilidad en el semen congelado. En este trabajo se discuten los factores que afectan la calidad de los espermatozoides sobrevivientes al proceso de criopreservación.*

Palabras claves: semen, criopreservación, fertilidad.

CRIOPRESERVATION EFFECT ON FERTILITY

ABSTRACT: *Cryopreserved semen has impaired fertility compare to fresh semen. The lower post-thaw viability and fertility is related with the spermatozoa sub lethal dysfunction establishes in part of the survival population. These facts are relations with many factors (e.g. cold shock, cooling rate, extender composition, and osmotic stress) during the cryopreservation process. In this paper factor affecting the quality or survival spermatozoa are reviewed.*

KEY WORDS: semen, cryopreservation, fertility.

Fecha de recepción: 27/01/05

Fecha de aprobación: 16/08/05

Dirección para correspondencia: Alejandra Stornelli, Cátedra de Reproducción. Facultad de Ciencias Veterinaria. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

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

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de semen y la utilización del semen congelado mediante inseminación artificial ha causado un gran impacto sobre la reproducción animal y humana. Innumerables crías de diferentes especies han nacido a partir del uso de semen congelado. Sin embargo constantemente se modifican los protocolos de congelación a fin de obtener mejores resultados en relación a la supervivencia espermática y fertilidad del semen al descongelado. Para lograr estos objetivos es necesario comprender a que tipo de estrés se ven sometidos los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación así como la manera en que las células responden a las agresiones fisicoquímicas medioambientales.

Mediante la criopreservación es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo en el tiempo potencialmente fértil (1). Crister (2) observó que los espermatozoides descongelados móviles, con membranas intactas no mantenían su viabilidad y capacidad fecundante durante tanto tiempo como los espermatozoides del semen fresco. Estas observaciones se relacionan con los cambios semejantes a la capacitación, inducidos por los procesos de congelación en la célula espermática. Durante la congelación y descongelación se producen alteraciones celulares que causan reducción de la fertilidad del semen criopreservado en comparación con el semen fresco. Esta reducción de la fertilidad se relaciona tanto con la muerte de las células que no soportan la injuria del proceso de congelación y descongelación, como con la disfunción no letal instaurada en una parte de la población sobreviviente. (3). Un aumento de las tasas de concepción puede lograrse mejorando los métodos de criopreservación tratando de prevenir o minimizar la ocurrencia de los eventos que desestabilizan las membranas y mejorando la calidad de los espermatozoides sobrevivientes (1, 3).

Diversos factores están implicados en la bajas tasas de concepción logradas mediante el uso de semen congelado en comparación con el semen fresco. Un factor de suma importancia es la calidad de semen obtenida al descongelado. Múltiples factores afectan la sobrevivencia de los espermatozoides al descongelado: la metodología de congelación y descongelación, la concentración espermática en el diluyente, el envasado, la composición del diluyente empleado.

Durante el proceso de congelación-descongelación se pierde aproximadamente el 50% de la población inicial de espermatozoides debido a los efectos de la criopreservación sobre las membranas, citoesqueleto, aparato motor y núcleo del espermatozoide (1, 4, 5). Se considera que el principal sitio de daño asociado a los cambios de temperatura son las membranas espermáticas (1). La reducción de la fertilidad asociada al semen congelado es atribuida en gran parte a la alteración de la estructura y función de las membranas durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación (4, 6). Para poder interactuar con el oocito, los espermatozoides deben estar vivos, móviles y poseer la membrana plasmática y acrosomal intactas y funcionales.

La pérdida espermática ocurrida durante la criopreservación puede compensarse en parte mediante la inseminación artificial (IA) de un gran número de espermatozoides, o mediante la colocación del semen en la porción craneal del tracto reproductivo. En el primer caso, al colocar un número mayor de espermatozoides totales contaríamos con un mayor número de espermatozoides que han sobrevivido viables luego de soportar las injurias ocurridas durante la congelación-descongelación (6). Así mismo si no aumentamos la dosis inseminante pero colocamos mediante IA quirúrgica el semen en la porción proximal del tracto reproductivo podremos lograr un aumento de la fertilidad. Esta mejora de la fertilidad puede entenderse si recordamos los eventos necesarios para la fecundación. Debe haber un número suficiente de espermatozoides competentes capaces de realizar la fertilización en el periodo de tiempo en el cual existen óvulos fértiles capaces de ser fecundados. El isthmus del oviducto actúa como un reservorio funcional de espermatozoides brindando una fuente de potenciales espermatozoides fertilizadores durante este periodo (7). Sólo una pequeña parte de los espermatozoides depositados en el tracto genital distal de la hembra llega al reservorio oviductal, la mayoría es expulsado a través de la vulva o fagocitado en el aparato genital femenino. En la ampolla oviductal, en el momento de la fertilización, el radio espermatozoide-oocito es aproximadamente 1(8). La competencia numérica y temporal de estos espermatozoides depende tanto del número como de la calidad de espermatozoides introducidos en el tracto genital distal. Cuando la calidad o el número de espermatozoides inseminados no es óptima, la disponibilidad de espermatozoides poten-

cialmente fértiles es escasa y la fertilidad se ve reducida (9, 10).

Si el número total de espermatozoides funcionales en una IA con semen congelado cae por debajo del número necesario para lograr una alta probabilidad de fertilización, entonces la fertilidad se ve afectada. Cuando la AI es realizada en la región proximal del tracto genital se requieren pocos espermatozoides para lograr altas probabilidades de fertilidad ya que muchos sobrevivirán para alcanzar el oviducto. Este hecho fue evidenciado por Maxwell (11) quien demostró que solo 20×10^6 espermatozoides móviles criopreservados son necesarios para lograr un porcentaje de fertilidad mayor al 50% realizando IA intrauterina en ovejas mientras que se necesita una dosis muy superior al utilizar la IA cervical. Si la IA fue hecha dentro del oviducto se requieren menos de 1×10^6 espermatozoides (12).

Un factor importante a considerar es la diferente sensibilidad a los procesos de congelación que poseen los espermatozoides de diferentes machos (13, 14). Muchos estudios experimentales se han realizado utilizando un pool de semen de varios machos, en estos trabajos quedan enmascaradas las diferencias individuales (15, 16, 17). Estas diferencias son un factor importante en la elección del protocolo de congelación seleccionado para obtener buenos resultados a la descongelación.

La optimización del protocolo de congelación debe contemplar no solo la obtención de un alto número de espermatozoides sobrevivientes sino también la habilidad funcional de esta población.

FACTORES QUE AFECTAN LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN

Cuando los espermatozoides son congelados y descongelados se ven sometidos a varios ciclos de deshidratación e hidratación lo que resulta en cambios significativos de volumen. El primer cambio de volumen ocurre cuando la célula es colocada dentro de un diluyente, el cual contiene sustancias crioprotectoras como glicerol, y posteriormente cuando la solución es congelada. Mas tarde ocurren cambios de volumen cuando la solución es descongelada. Estos cambios de volumen están asociados a cambios de la concentración de iones y electrólitos en las soluciones intra y extra celular. La forma en que ocurren estas modificaciones determinan la mayor o menor capacidad de la célula para soportar la

injuria a la que se ve sometida. Los cambios de volumen son solo uno de los factores de estrés a los que la célula se ve sometida durante el proceso de criopreservación. Otros factores de estrés están representados por los cambios de temperatura, el estrés tóxico producido por la exposición a crioprotectores, la formación y disolución de hielo así como los cambios de osmolalidad en el ambiente extracelular (18).

Shock de frío

Es bien conocido que el enfriamiento rápido del semen entre 30 °C y 0 °C induce un estrés letal en algunas células, el cual es proporcional a la tasa de enfriamiento. Es así que el enfriamiento en este rango de temperaturas debe ser realizado cuidadosamente (1, 19). Este fenómeno es conocido como shock de frío y puede apreciarse durante el enfriamiento de espermatozoides de cualquier especie. En el porcino este fenómeno se manifiesta inmediatamente después de la eyaculación haciéndose las células cada vez menos sensibles al mismo en las horas siguientes (20).

Sin embargo, un lento enfriamiento induce estrés sobre la membrana del espermatozoide. Este hecho se relacionaría con un cambio de fase lipídica y alteraría el estado funcional de la membrana. Este fenómeno se relacionaría en parte con el efecto crioprotector observado al agregar trealosa al diluyente utilizado para congelación, ya que la trealosa posee la propiedad de interaccionar con los lípidos de membrana (21), aumentando su estabilidad y limitando la fase de transición (22), ejerciendo así un efecto estabilizador de la membrana, lo cual explicaría su acción crioprotectora (23). El shock de frío es visto como el estado extremo de un stress continuo influenciado por la velocidad con que este fenómeno se inicia. (24).

El hecho de que el shock de frío es causado por un cambio de fase de los lípidos de la membrana fue propuesto por Dobrins en 1993 (25). Así mismo Holt obtuvo evidencias de que el cambio de fase podría ser el responsable de las manifestaciones de crioinjuria observadas durante el calentamiento celular luego de la descongelación. Estas evidencias fueron obtenidas a partir del estudio de la integridad de membrana de espermatozoides de carnero durante los procesos de enfriamiento (entre 5 y -20 °C) y posterior calentamiento hasta 30°C. En este experimento se observó que los mayores daños de membrana ocurrían durante el proceso de calentamiento luego de la descongelación (24).

El estrés de membrana puede continuar por debajo de 0 °C sin que el cambio de fase sea completo a 0 °C, sin embargo es bien conocido que los cambios de fase ocurren, en su mayoría, entre los 5 °C y 15 °C (25). Se ha demostrado la importancia de la composición lipídica del medio ambiente donde se encuentra la membrana plasmática durante el enfriamiento, esto relaciona al componente lipídico en el mecanismo de injuria (19, 26). El agregado de preparaciones lipídicas purificadas a los espermatozoides reduce significativamente el shock de frío y el daño producido por la congelación-descongelación (27, 28, 29). Usualmente se incluye yema de huevo en la preparación de los diluyentes debido a que los fosfolípidos (30) y las lipoproteínas de baja densidad (31) poseen un efecto protector contra el shock de frío. El SDS es un detergente aniónico soluble en agua que se utiliza para solubilizar proteínas. Se ha observado que este detergente posee un efecto benéfico sobre la motilidad e integridad acrosómica relacionado con su acción sobre la yema de huevo (20). Sin embargo no deben pasarse por alto los otros componentes de membrana que pueden alterarse por este stress. Las proteínas integrales de membrana se encuentran asociadas a la bicapa lipídica y es esperable que alteren su función, sobre todo aquellas que cumplen funciones de transporte como las que conforman los canales de calcio. De hecho es bien conocido que la permeabilidad aumenta con el enfriamiento, por lo tanto la regulación del calcio se ve afectada (32, 33). Estos hechos tienen serias consecuencias sobre la funcionalidad celular (34) y muchas veces los cambios ocurridos pueden ser incompatibles con la viabilidad espermática. La absorción de calcio durante el enfriamiento posibilita que ocurran cambios relacionados con el proceso de capacitación como la fusión entre membrana plasmática y la capa externa de la membrana acrosomal. Existe gran similitud entre los cambios ocurridos durante el enfriamiento y la reacción acrosómica, es así que la primera comienza como una versión desorganizada de la segunda. Así mismo, los elementos del citoesqueleto son sensibles a la temperatura. Se ha postulado que la despolimerización de los filamentos de actina del citoesqueleto es un prerrequisito para la aproximación de la membrana plasmática a la membrana acrosomal externa en el camino hacia la exocitosis acrosomal (35).

Crioprotectores y estrés celular

Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas y en consecuencia una menor

concentración de electrólitos posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación. Sin embargo, estos compuestos, incorporados a los diluyentes producen un estrés transitorio pero importante sobre la membrana plasmática de los espermatozoides. La magnitud de este hecho está íntimamente relacionada con la capacidad penetrante de los crioprotectores (36). El crioprotector de elección es el glicerol, el cual produce estrés osmótico. Se ha observado que la hiperosmolaridad producida por este compuesto posee un efecto estimulador de la reacción acrosómica (37). Gao (36) ha demostrado que este estrés puede reducirse mediante la incorporación en etapas de glicerol en el proceso de criopreservación. Este procedimiento permite aumentar considerablemente la proporción de espermatozoides sobrevivientes al descongelado. Además del glicerol existen otros compuestos que poseen propiedades crioprotectoras como por ejemplo el etilenglicol (38). Los espermatozoides son también sensibles a los efectos tóxicos de los crioprotectores, es así que los compuestos utilizados habitualmente para criopreservar otras células (ej. Dimetilsulfóxido (DMSO) resultan menos satisfactorios para la criopreservación espermática (39). Se ha observado que el dimetilsulfóxido es más tóxico para los espermatozoides humanos que el glicerol, recuperándose un menor porcentaje de espermatozoides motiles al descongelado cuando se utiliza DMSO como crioprotector. (40).

Estrés osmótico

Mazur estableció que cada tipo celular posee una velocidad óptima de congelación que garantiza su supervivencia luego de la criopreservación. Si la velocidad de congelación es demasiado rápida o demasiado lenta el estrés producido por el proceso de criopreservación aumenta (41). El estrés inducido por la formación de cristales de hielo está asociado a los cambios en la presión osmótica de la fracción no congelada (42). Cuando una solución es enfriada por debajo del punto de congelación los cristales de hielo se nuclean y el agua pura cristaliza formando hielo. Los solutos permanecen disueltos en la fracción de agua líquida y por lo tanto la presión osmótica de la solución aumenta. La proporción de agua cristalizada como hielo y por lo tanto la presión osmótica de la solución restante depende de: la temperatura, la velocidad de descenso de la misma y el volumen de la fracción no congelada.

En general se reconoce que la duración de la exposición a estos eventos debería mini-

mizarse para lograr una óptima sobrevivencia, implicando entonces que el enfriamiento celular debería ser rápido. Sin embargo la tasa de enfriamiento debe ser suficientemente lenta como para permitir la salida de agua intracelular gracias a la presión osmótica extracelular, y prevenir la formación de cristales de hielo intracelular, lo cual es letal para la célula. Las células espermáticas son congeladas a tasas bastante rápidas, en el rango de 15-60 °C/min, lo cual ha sido empíricamente calculado como la velocidad de congelación que permite mayor probabilidad de obtener una mejor tasa de sobrevivencia celular. Conociendo la permeabilidad hídrica celular y su activación energética podría predecirse la máxima tasa de enfriamiento compatible con el equilibrio osmótico y entonces determinar protocolos óptimos de criopreservación. Se ha demostrado que estas consideraciones son importantes para otros tipos celulares (43). La célula espermática de muchas especies posee una mayor permeabilidad al agua que otros tipos celulares (38, 44, 45).

Es importante considerar que la población espermática, tanto en diferentes especies como en un individuo en particular es muy heterogénea. Un eyaculado posee una diversa población de células con diferentes estados de maduración. Las diferencias entre poblaciones espermáticas entre especies y en un eyaculado simple se relacionan con la composición y fluidez de la membrana celular, características que influyen su permeabilidad al agua y a solutos así como su susceptibilidad a la injuria por frío (46).

Holt y North (24) han demostrado que los signos de estrés manifestado por los espermatozoides luego de la descongelación no se relacionan solo con el estrés osmótico sufrido en el descongelado sino también con el estrés sufrido durante el congelado.

El porcentaje de células que sobrevive a un proceso de congelación está determinado por la sensibilidad al estrés osmótico durante la adición y remoción de crioprotectores y durante el enfriamiento y el calentamiento. Si bien puede haber diferencias entre especies en la sensibilidad espermática a la criopreservación, el eyaculado es heterogéneo con una resistencia variable al estrés osmótico entre las células. El hecho de que los individuos puedan ser clasificados como "buenos congeladores" o "malos congeladores" implica que ciertas características de estructura de membrana, las cuales pueden estar genéticamente determinadas, predisponen a la superviven-

cia bajo el estrés de criopreservación (18).

A pesar de que optimicemos el proceso de criopreservación y minimicemos el riesgo de muerte celular, una parte de la población celular no es capaz de sobrevivir. Por lo tanto es necesario concentrarse en la funcionalidad de la población superviviente (39).

ALTERACIONES OBSERVADAS EN LOS ESPERMATOZOIDES SOBREVIVIENTES A LOS PROCESOS DE CRIOPRESERVACIÓN

Se ha comprobado que la motilidad espermática disminuye luego de la criopreservación.

En tanto que una pequeña parte de la población celular exhibe un movimiento progresivo vigoroso, la mayoría de las células muestran un variable grado de alteración de la motilidad en comparación con la motilidad del semen fresco. Este hecho puede estar íntimamente relacionado con la pobre capacidad fecundante del semen congelado. En un estudio de FIV con semen criopreservado realizado en humanos se encontró que tanto motilidad progresiva como vigor eran factores relacionados estrechamente con la fertilidad (47).

Los cambios de temperatura inducen a que los espermatozoides se comporten como si se capacitaran (1). Los espermatozoides enfriados muestran un aumento del calcio libre intracelular así como coloración con clortetraciclina, cambios típicos de la capacitación, sin embargo los patrones de fosforilación de tiro-sina son diferentes en espermatozoides enfriados y recalentados (1). Estos hechos marcan que si bien los cambios inducidos por la criopreservación en la célula espermática son similares a la capacitación los procesos difieren en algunos aspectos.

Se ha demostrado que los procesos de criopreservación inducen a la formación de especies reactivas de oxígeno las cuales poseen efectos tóxicos sobre las células y comprometen su funcionalidad (48, 49). Diferentes antioxidantes han sido usados como parte de variados diluyentes en distintas especies y se ha verificado el efecto benéfico de los mismos (50). Sin embargo no debe olvidarse que el daño oxidativo es solo un de los diferentes factores de estrés al que es sometido el espermatozoide durante el proceso de congelación (48).

Recientemente se ha estudiado la capacidad de la población celular superviviente para

interactuar con el epitelio del oviducto (51). Se ha demostrado que en la interacción de receptores celulares se combinan mecanismos intracelulares de transmisión de señales. Un tipo de interacción similar ocurre entre óvulo y espermatozoide (52). Estudios del efecto de la congelación sobre la membrana celular sugieren que la agrupación de las proteínas durante la fase de separación lipídica inducida por el enfriamiento no es enteramente reversible, esto podría tener implicancias sobre la estructura de los receptores y por lo tanto sobre la interacción de gametas. Si bien estudios de fertilización *in vitro* han demostrado que los espermatozoides criopreservados son capaces de fertilizar (51), sólo algunos acceden al proceso pero muchos otros podrían estar estructuralmente afectados y ser incapaces de fertilizar.

Si bien no ha sido estudiada extensamente la relación entre semen criopreservado y sobrevida embrionaria, se sugirió la asociación entre espermatozoides congelados y aumento en la incidencia de mortalidad embrionaria temprana (12). La ocurrencia de daños a nivel del DNA luego del proceso de criopreservación, podrían relacionarse con daños funcionales nucleares (52).

CONCLUSIONES

Para que sea posible la interacción óvulo-espermatozoide y el comienzo de una nueva vida, el espermatozoide debe ser capaz de expresar su capacidad funcional a través de la ocurrencia de variados procesos con una adecuada secuencia temporal. Es así que un número suficiente de espermatozoides fértiles debe arribar a la ampolla para encontrarse con los oocitos y que ocurra así la secuencia de eventos necesarios para la fertilización.

Durante el proceso de criopreservación los espermatozoides se ven sometidos a variados y diversos tipos de estrés, lo cual puede inducir, en la célula espermática, daños letales o sub-letales los cuales comprometen su funcionalidad.

La identificación de la población espermática intacta así como el descarte de la población viva pero con daños sub-letales, permitiría optimizar el uso del semen criopreservado y evitar la ocurrencia de potenciales errores genéticos con aumento de pérdidas embrionarias. El estudio funcional de las células y de los diferentes tipos de reacción celular en relación al estrés medio-ambiental y a las diferencias individuales (celulares interespecie e interindividuo) son dos puntos

claves en el entendimiento y posibilidad de manejo del tipo y grado de daño celular.

Durante los últimos 50 años los avances obtenidos en la criopreservación de semen han tenido un profundo impacto sobre la biotecnología reproductiva humana y animal. Sin embargo muchos tópicos sobre la criopreservación de semen permanecen oscuros. Futuras investigaciones sobre este tema permitirán obtener nuevos avances en el área.

BIBLIOGRAFÍA

1. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev.* 1995; 7: 781-791.
2. Crister JK, Huse-Benda AR, Aaker DD, Arneson BW, Ball GD. (1987). Criopreservación de human spermatozoa. Post-thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertil Steril.* 1987; 47: 980-984.
3. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science.* 2000; 60-61: 481-492.
4. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological system. *Science.* 1970; 168: 939-949.
5. Parks JE, Grahan JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology.* 1992; 38:209-222.
6. Mazur P, Leivo S P, Chu E H Y. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Experimental cell research.* 1972; 71: 345-355.
7. Hunter RHF, Preovulatory arrest and periovulatory redistribution of competent spermatozoa in the asthmus of the pig oviduct. *J. Reprod. Fertil* 1984, 72: 203-211.
8. Hunter RHF, Ovarian control of very low sperm / egg ratios at the commencement of fertilization to avoid polyspermy. *Mol. Reprod. Dev.* 44: 417-422. 1996
9. Amann RP, Hammersted R H. *In vitro* evaluation of sperm quality. An opinion. *J Androl.* 1993; 14: 397-406.
10. Dumbar BS O'Rand M G. eds, A comparative overview of mammalian fertilization. New York Press. 1983; 139-175.
11. Maxwell WMC. Artificial insemination of ewes whit frozen thawed semen at a synchronized oestrus: II. Effect of dose of spermatozoa and site of intrauterine insemination on fertility. *Anim Reprod Sci.* 1986, 10: 309-316.
12. Maxwell Evans WMC, Evans G, Rhodes SL, Hillard M A, Bindon BM. Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviductal insemination with low number of fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Repro Fertil Dev.* 1993, 5: 57-63.
13. Chen Y, Foote RH, Tobback C, Zhang L, Hough S. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen

- at different rates in egg yolk-tris and whole milk extenders. *J Dairy Sci.* 1993; 76: 1028-1034.
14. Dhama AJ, Sahni KN, Mohan G. Effect of various cooling rates (from 30 °C to 5 °C) and thawing temperatures on the deep freezing of *Bos Taurus* and *Bos bubalis* semen. *Theriogenology.* 1992 38: 565-574.
15. Glaub JC, Mills RN, Katz DF. Improved motility recovery of human spermatozoa after freeze preservation via a new approach. *Fertil Steril.* 1976; 27: 1283-1291.
16. Cohen J, Felten P, Zeilmaker GH. *In vitro* fertilizing capacity of fresh and cryopreserved human spermatozoa: a comparative study of freezing and thawing procedures. *Fertil Steril.* 1981; 36: 356-362.
17. Blach EL, Amann RP, Bowen RA, Frantz D. Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membranes integrity and motion characteristics. *Theriogenology.* 1989; 3: 283-298.
18. Leivo SP, Bradley L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa in Gagnon, C. (Eds) *The male gamete.* McGill University. 1999; 46: 502-517
19. Watson PF. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg-yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fert.* 1981; 62: 483-492.
20. Pursel VG, Shulman LL, Jonshon LA. Effect of Orvus ES paste on acrosomal morphology, motility and fertilizing capacity of frozen thawed boar sperm. *J Anim Sci.* 1978; 47: 198-202.
21. Crowe J, Carpenter J, Crowe L, Anchoroguy T J. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. Symposium on cryosensitizing and cryoprotective agents. 26 th Annual meeting of the society for cryobiology, Charleston, South Carolina. 1989; 219-224.
22. Chen T, Fowler A, Torner, M. Literature Review: Supplemented phase diagram of the trehalose – water binary mixture. *Cryobiology* 2000; 40: 277-282.
23. Bakás LS; Disalvo EA. Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective activity of trehalose. *Cryobiology.* 1991; 28: 347-353.
24. Holt WV, North RD. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 1991; 91: 451-461.
25. Dobrins EZ, Crowe LM, Berger T, Anchoroguy T, Oversteet JW, Crowe JH. Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membranes: a demonstration using sperm as a model *J Exp Zool.* 1993, 265: 432-437.
26. Pettit MJ, Bhur MM. Extender components and surfactants after boar sperm function and membrane behavior during criopreservation. *J Androl.* 1998, 19: 736-746.
27. Butler WJ, Roberts TK. Effects of some phosphatidyl compounds on boar spermatozoa following cold shock or slow cooling. *J Reprod Fertil.* 1975, 43: 183-187.
28. Parks JE, Meacham TN, Saacke RG. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. Effect of liposomes prepared from egg phosphatidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids and viability at 4 °C and 37 °C. *Biol Reprod.* 1981; 24: 399-404.
29. Graham JK, Foote RH. Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull. *Cryobiol.* 1987, 24: 42-52.
30. Quinn PJ, Chow PYW, White IG. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at plasma membrane site. *J Reprod Fertil* 1980; 60:403-407.
31. Foulkes JA. The separation of lipoproteins from eggs yolk and their effect on motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod. Fertil* 1977; 49: 277-284.
32. Robertson L, Watson PF. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *J Reprod Fertil.* 1986, 77: 117-185.
33. Robertson L, Watson PF, Plunner JM. Prior incubation reduces calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subjected to cold shock. *Cryo-Lett.* 1988, 9: 286-293.
34. Bailey J L, Bhur M.M. Cryopreservation alters the Ca⁺⁺ flux of bovine spermatozoa *Can. J. Anim. Sci.* 1994, 74: 45-51.
35. Spungin B, Maregalit I, Britbart, H. Sperm exocytosis reconstructed in a cell free system. Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *J Cell Sci.* 1995; 108: 2525-2535
36. Gao GY , Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Crister JK. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod.* 49: 112-123. 1993
37. Aitken RJ, Wang YF, Liu J, Best F, Richardson DW. The influence of medium composition osmolarity and albumin on acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa development of an improved zona-free hamster egg penetration test. *Int J Androl.* 1983, 6: 180-193.
38. Gilmore JA, Liu J, Gao DY, Crister JK. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human sperm spermatozoa. *Hum Reprod.* 1997; 12: 112-118.
39. Katkov II, Katkova N, Crister JK, Mazur P. Mouse spermatozoa in high concentration of glycerol: chemical toxicity vs. osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology.* 1998, 37: 325-338.
40. Chong AP. Artificial insemination and sperm banking: clinical and laboratory considerations. *Semin Reprod Endocrinol.* 1985; 3: 193-200
41. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol.* 1984; 247:125-142.

42. Watson PF, Duncan AE. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology*. 1988, 25: 131-142.
43. Mazur P. Freezing of living cells. Mechanism and implications. *Am J Physiol*. 1984, 147: 125-142.
44. Noiles EE, Mazur P, Watson PF, Kleinhans FW, Crister JK. Determination of water permeability coefficient for human spermatozoa and its activation energy. *Biol Reprod*. 1993, 48: 99-109.
45. Noiles EE, Thompson KA, Storey BT. Water permeability, L_p , of mouse sperm plasma sperm cytoskeleton. *Cryobiology*. 1997, 35:79-92
46. Hammerstedt RH, Parks JE. Changes in sperm surfaces associated with epididymal transit. *J Reprod Fert*. 1987; 34: 133-149.
47. Kelly MP, Corson SD, Social B, Batzer FR, Gutman JN. Discontinuous Percoll gradient preparation for donor insemination: determinants for success. *Human Reprod*. 1997, 12: 2682-2686.
48. Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl*. 1992, 13: 232-241.
49. Bell M, Wang R, Hellestron WJ, Sikka, SK. Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. *J Androl*. 1993, 14: 472-478.
50. Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A. Effect of antioxidant tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Arch Androl*. 1994, 33: 11-15
51. Ellinton JE, Samper JC, Jones AE, Oliver SA, Brunett KM, Wright RW. *In vitro* interaction of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct (uterine tube) epithelial cells or their secretory products *Anim Reprod*. 1999, 56: 51-65.
52. Ellinton JE, Evenson DP, Fleming JE, Brisbois RS, Hiss GA, Broder SJ, Wright RW. Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. *Fertil Steril*. 1998, 69: 643-649.

IMPLICANCIAS FISIO-FARMACOLÓGICAS DE LA GLICOPROTEÍNA- P EN ANIMALES DOMÉSTICOS

M Ballent, A Lifschitz, G Virkel, C Lanusse

Laboratorio de Farmacología, Departamento de Fisiopatología
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Resumen: La glicoproteína-P (*gp-P*) es una proteína transportadora de membrana asociada al fenómeno de resistencia a múltiples drogas (MDR). Inicialmente descrita por su sobreexpresión en líneas celulares tumorales resistentes a fármacos antineoplásicos, la *gp-P* también se localiza en tejidos normales como hígado, intestino, barrera hematoencefálica, riñones, entre otros, en los que actúa secretando una gran variedad de sustancias endógenas y xenobióticos desde el interior de la célula hacia el espacio extracelular a través de un mecanismo dependiente de ATP. La localización específica en estos tejidos sugiere que la *gp-P* cumple un importante rol en la regulación del transporte de fármacos a través de las membranas celulares. De esta manera, *gp-P* participa en los procesos de absorción, distribución y excreción de diferentes xenobióticos. Teniendo en cuenta que las co-administraciones de fármacos son frecuentes en medicina veterinaria, implicancias farmacocinéticas y toxicológicas pueden ocurrir cuando dos sustratos de la *gp-P* son usados en la terapéutica de animales domésticos. La presente revisión describe la actividad fisiológica de la *gp-P* y examina las consecuencias farmacológicas obtenidas tras la co-administración de sustratos de la *gp-P* en medicina veterinaria. Los datos reportados en el presente trabajo marcan la necesidad de estudiar diferencias en la función de la *gp-P* entre las diferentes especies y razas de animales domésticos.

Palabras clave: glicoproteína-P, secreción intestinal, farmacocinética

PHYSIO-PHARMACOLOGICAL IMPLICATIONS OF P-GLYCOPROTEIN IN DOMESTIC ANIMALS

Abstract: P-glycoprotein (*P-gp*) is a transporter protein associated with multidrug resistance to certain anticancer drugs (MDR). Initially *P-gp* was identified by its overexpression in multidrug resistant tumor cells. *P-gp* is also expressed in a wide range of normal tissues including liver, intestines, blood-brain barrier and kidneys. *P-gp* secretes a large number of endogenous and xenobiotic compounds from the intracellular to the extracellular domain by an ATP-dependent process. The specific distribution of this protein suggests that *P-gp* plays an important role in the regulation of drugs transport across membrane cells. Therefore *P-gp* participates in the process of absorption, distribution and excretion of different xenobiotics. As the co-administration of drugs is a common procedure in the veterinary medicine, pharmacokinetic and toxicologic implications may occur when two *P-gp* substrates are used in the therapeutic of domestic animals. The current review describes the physiological activity of *P-gp* and examine the pharmacological consequences obtained after the co-administration of *P-gp* substrates used in veterinary medicine. The data presented in the current work highlight the need to study differences in the function of the *P-gp* between species and breeds of domestic animals.

Key Word: P-glycoprotein; intestinal secretion, pharmacokinetic

Fecha de recepción: 25/04/05

Fecha de aprobación: 22/09/05

Dirección para correspondencia: Mariana Ballent, Laboratorio de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (7000) Tandil ARGENTINA. **E-mail:** mballent@vet.unicen.edu.ar

INTRODUCCIÓN

El efecto farmacológico obtenido tras la administración de una droga depende de la interacción de ésta con su receptor (fase farmacodinámica). Para obtener un efecto farmacológico óptimo son necesarias concentraciones efectivas del fármaco en el sitio de acción (biofase) durante un cierto periodo (1). De esta manera, los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (fase farmacocinética) influyen directamente en las concentraciones de droga que alcanzan el sitio de acción y, por lo tanto, en su efecto farmacológico. Mientras que los procesos de absorción y distribución determinan el pasaje del fármaco desde su sitio de administración hacia la circulación sistémica y su llegada a la biofase, los procesos de biotransformación (metabolismo) y excreción determinan la finalización de la acción del fármaco en el organismo (2).

En los últimos años, se ha estudiado la participación de diferentes transportadores celulares de membrana en los procesos de distribución tisular y excreción de compuestos farmacológicamente activos y/o sus metabolitos (3). De todos los transportadores celulares identificados, la glicoproteína-P (gp-P) ha sido la más estudiada. Si bien la gp-P fue inicialmente descrita por su sobreexpresión en células tumorales resistentes a múltiples drogas anticancerígenas, también se localiza en células normales de tejidos involucrados en los procesos de absorción, distribución, y excreción de fármacos (4). La localización específica en estos tejidos sugiere que la gp-P cumpliría un importante rol en la regulación del transporte de fármacos, modificando de este modo el comportamiento cinético y la biodisponibilidad de los mismos (5). Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la gp-P funciona como una bomba de eflujo que secreta en forma activa una gran cantidad de compuestos no relacionados, desde el interior de la célula hacia el espacio extracelular. A nivel intestinal, la gp-P limita la absorción y difusión transepitelial provocando modificaciones en la biodisponibilidad de fármacos administrados por vía oral (6). Debido a que la gp-P presenta una amplia especificidad de sustratos, es posible que ocurran interacciones entre fármacos reconocidos como sustratos (inhibidores o inductores) de la misma cuando éstos son co-administrados (7). La comprensión de este tipo de interacciones podría convertirse en una herramienta farmacológica útil para incrementar la disponibilidad sistémica de diversos fármacos, contribuyendo a mejorar su actividad farmacológica.

El objetivo de este trabajo fue recopilar y discutir la información disponible sobre el rol de la gp-P y su influencia en el comportamiento farmacocinético de fármacos de uso en terapéutica veterinaria.

CARACTERIZACIÓN DE LA GLICO-PROTEÍNA-P

Estructura y función de la glicoproteína-P

La gp-P fue inicialmente descrita por su sobreexpresión en células tumorales resistentes a múltiples drogas y posteriormente caracterizada como una proteína de membrana encargada de secretar drogas y diversos compuestos fuera de la célula a través de un mecanismo ATP-dependiente (8). La gp-P pertenece a la superfamilia de las «ATP-binding cassette» (ABC), y es codificada por una subfamilia de genes de los que se reconocen tres isoformas: MDR I, II y III. Mientras que en humanos sólo se expresan las clases I y III (MDR1 y MDR3, respectivamente), en roedores han sido identificadas las tres clases (*mdr1a*, *mdr1b* y *mdr2*, respectivamente) (9). Las clases I y II codifican a proteínas transportadoras y confieren resistencia a múltiples drogas; sin embargo, la clase III (*mdr2* de roedores y MDR3 de humanos) no está asociada al transporte de drogas sino que codifica a una traslocasa de la fosfatidilcolina localizada en la membrana de los canalículos biliares (10).

La gp-P es un complejo glicoproteico de membrana de 1280 aminoácidos con un peso molecular de 170 kDa. Está compuesta por dos mitades simétricas y homólogas que actúan en forma coordinada como una unidad. Cada mitad consta de seis dominios transmembrana y de un dominio de unión al ATP localizado en la superficie citosólica (11). Si bien se ha determinado que ambos sitios de unión al ATP son necesarios para que la actividad de la gp-P se produzca eficientemente, la interacción entre los sitios de unión al ATP y los dominios de unión a drogas son esenciales para que se produzca la hidrólisis del ATP estimulada por el sustrato y el transporte del mismo (Fig. 1). Mediante este mecanismo de transporte activo, los sustratos son secretados sin modificar fuera de la célula contra un gradiente de concentración, lo que provoca una disminución de su concentración intracelular (12).

Varios modelos han sido propuestos para explicar el mecanismo de excreción de fármacos mediado por gp-P. El modelo del poro, el modelo de flipasa y el modelo de aspirador de moléculas hidrofóbicas han sido los principa-

les modelos descriptos. Este último ha sido el más aceptado y se caracteriza por el reconocimiento de sustratos localizados en la superficie interna y externa de la membrana plasmática y su transporte a través de canales proteicos (13).

Los sustratos de la gp-P compartirían ciertas propiedades físico-químicas incluyendo el coeficiente de partición octanol/agua y el tamaño molecular. Diversos estudios sobre las relaciones estructurales entre sustratos y su grado de afinidad por la gp-P han demostrado que el principal determinante de la efectividad como moduladores reside en su relativa hidrofobicidad, con coeficientes de partición (octanol/agua) de aproximadamente +1 ó mayor (14). La cantidad de compuestos que tienen la capacidad de interactuar con la gp-P, ya sea como sustratos inhibidores o inductores es muy amplia e incluye antiarrítmicos (lidocaína), antibióticos (eritromicina), antifúngicos (itraconazole), bloqueantes de los canales de calcio (verapamilo), antineoplásicos (vinblastina) y hormonas (progesterona) (15). Los mecanismos de interacción entre la gp-P y sus sustratos se muestran en la Figura 1.

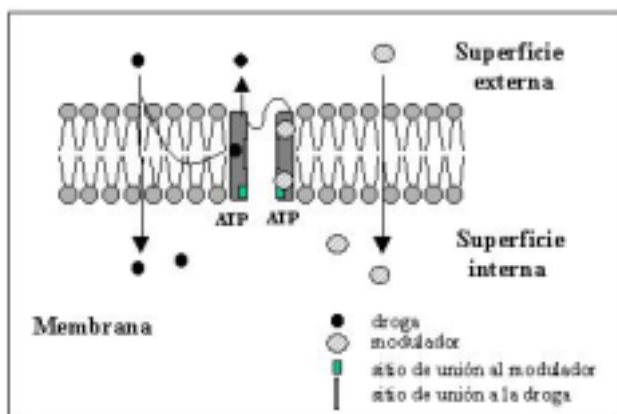


Figura I. Función de la gp-P. El modelo ilustra la actividad de la gp-P, la que utiliza ATP para el transporte de sustratos a través de la membrana celular. Los moduladores pueden actuar como un inhibidor competitivo, ocupando los sitios de unión a drogas ó como un inhibidor no competitivo, ocupando los sitios de unión al modificador. Adaptado de Ford, (16)

Figure I. Function of the P-gp. The model illustrates P-gp activity, which uses ATP to transport substrates across the plasma membrane. Modulators may act as a competitive inhibitors binding to the sites of substrate or as a non-competitive inhibitor binding to the specific modulator sites. Adapted from Ford, (16).

LOCALIZACIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA-P EN TEJIDOS NORMALES

Mediante la utilización de anticuerpos monoclonales y moléculas específicas para gp-P en roedores y humanos se demostró que la gp-P también se expresa en tejidos normales. La gp-P se localiza en tejidos involucrados en los procesos de absorción (ej. células epiteliales de intestino), distribución (ej. barrera hematoencefálica) y eliminación de fármacos (ej. superficie canalicular de los hepatocitos, superficie apical de las células epiteliales del túbulo renal y superficie apical de los enterocitos). También se encuentra en la superficie luminal de las células endoteliales del cerebro, células del sistema hematopoyético y corteza y médula adrenal (6). La localización en glándulas secretoras de esteroides sugiere que la gp-P podría estar relacionada con la secreción o con la protección de la membrana plasmática de las células que los secretan frente a los efectos tóxicos producidos por altas concentraciones de esteroides. Una observación consistente con esta hipótesis es que la progesterona es un sustrato/inhibidor de la gp-P (16) y que otros esteroides, específicamente corticosterona, son transportados por células epiteliales que expresan gp-P (17). Por otra parte, a través del uso de anticuerpos monoclonales anti-gp-P se ha determinado la expresión del gen *mdr1a* en útero grávido y placenta (18). La inducción de altos niveles de expresión se produciría en un momento específico de la gestación, sugiriendo que dicha expresión podría estar asociada a la actividad fisiológica en la interfase materno-fetal (19). La distribución anatómica de los transportadores tipo ABC sugiere que éstos podrían llevar a cabo diversas funciones; entre ellas, limitar la absorción intestinal de fármacos, excretar diversos compuestos hacia el exterior celular, regulando los niveles celulares y tisulares de los mismos, e impidiendo su ingreso al sistema nervioso central. De esta manera, es posible que los transportadores celulares actúen modificando el comportamiento cinético y la biodisponibilidad de diversos fármacos.

Rol de la glicoproteína-p en la disposición de fármacos

Aunque muchos son los mecanismos encargados de facilitar el movimiento de solutos a través del intestino, este tejido constituye una compleja y selectiva barrera de la que forman parte tanto enzimas metabólicas (ej. citocromo P450) como proteínas transportadoras (ej. gp-P entre otras). La capacidad de la gp-P para interactuar con un amplio rango de

compuestos, tanto naturales como sintéticos, sugiere que la habilidad para limitar la absorción oral de fármacos es parte de su rol como regulador de la permeabilidad intestinal (20). Para establecer la función fisiológica y farmacológica de esta proteína, especialmente en aquellos aspectos directamente relacionados al transporte de fármacos, se requiere una mayor comprensión de la forma en la cual estos compuestos interactúan con la gp-P, como así también de la localización de la gp-P a lo largo del tracto gastrointestinal; esto dependerá de cómo varíe la actividad de la gp-P a lo largo del intestino y si otros transportadores contribuyen con los procesos de excreción intestinal (20).

La forma en la que la actividad de la gp-P y otros transportadores celulares varía a lo largo del intestino ha sido escasamente definida. La distribución de la gp-P en el tracto gastrointestinal se incrementaría desde el duodeno hacia el colon, con picos de expresión en íleon y colon distal (21). Estos resultados concuerdan con estudios *in vitro* realizados en intestino de rata donde la mayor actividad de gp-P se observó en íleon, con menores niveles de actividad en el resto de los segmentos intestinales (15). Estudios más recientes (22), en los que se utilizó intestino de ratones knockout para el gen *mdr1a* (-/-), han demostrado variaciones región-dependiente en la actividad de los transportadores celulares tanto en intestino delgado como grueso, con picos de actividad en intestino delgado distal y colon distal.

Se han descrito una gran cantidad de métodos *in vitro* que permiten caracterizar la actividad de la gp-P en el transporte intestinal de fármacos. La línea celular Caco-2, derivada de adenocarcinoma de colon humano, ha sido ampliamente utilizada para caracterizar el modelo de barrera epitelial en la absorción intestinal de fármacos. El impacto de la gp-P sobre la absorción de fármacos en monocultivos de Caco-2 ha sido demostrado mediante la determinación de la tasa de permeabilidad de un sustrato mediada por la gp-P, donde la tasa de pasaje es mayor en dirección basolateral-apical (correspondientes a la superficie serosa y lumen intestinal, respectivamente). En presencia de inhibidores, esta tasa de pasaje unidireccional tiende a igualarse (23).

El uso de la técnica de saco intestinal evertido de rata ha sido reportado como un buen modelo predictivo de la biodisponibilidad de drogas anticancerígenas administradas por vía oral y que son sustratos de la gp-P

(24). La actividad de los transportadores celulares en el proceso de absorción de fármacos influye sobre la biodisponibilidad sistémica de los mismos y, por lo tanto, es determinante en la resultante eficacia clínica tras la administración oral de drogas.

La actividad de gp-P en la distribución de diferentes compuestos juega un rol importante en el comportamiento farmacológico/toxicológico de los mismos. La presencia de gp-P en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica limita la entrada al sistema nervioso central de numerosos fármacos como ivermectina, loperamida, dexametasona, digoxina, entre otros (3). La presencia de gp-P en placenta constituye una importante barrera para el acceso de xenobióticos al feto (6). Cuando ratas preñadas deficientes en gp-P fueron tratadas con el antiparasitario ivermectina, graves efectos teratogénicos fueron observados debido a la exposición fetal al antiparasitario (25).

Si bien la gp-P no parece tener actividad metabólica intrínseca, el reconocimiento de interacciones entre la isoenzima citocromo P450 3A (CYP3A) y la gp-P ha desarrollado un nuevo concepto en el mecanismo de secreción/eliminación de fármacos. La CYP3A es una enzima de fase I que participa en el metabolismo de numerosos fármacos. La CYP3A se distribuye en hígado e intestino delgado, donde representa el 30 y 70% del total de la actividad metabólica mediada por P450, respectivamente. Debido a que muchos sustratos de la CYP3A han sido reconocidos como sustratos o moduladores de la gp-P, se ha propuesto que dichas proteínas actúan sinérgicamente limitando la biodisponibilidad oral de fármacos (6). Cuando una droga se encuentra en el tracto gastrointestinal y es absorbida por difusión pasiva en el enterocito puede ser metabolizada por la CYP3A, pasar a circulación sistémica o ser expulsada por la gp-P nuevamente a la luz intestinal donde podrá ingresar a otro enterocito teniendo nuevamente contacto con la CYP3A. Así las drogas sustratos de gp-P tendrán repetidos accesos a la CYP3A aumentando la posibilidad de ser metabolizadas (4). La expresión de gp-P en las células del túbulo contorneado proximal en riñón así como en las células de los canalículos biliares en hígado sugiere una activa participación de este transportador en los procesos de excreción de diferentes compuestos (6). De esta manera el clearance renal o biliar de drogas sustratos de gp-P puede ser disminuido sustancialmente cuando son co-administrados con compuestos moduladores de gp-P. Las con-

secuencias de estas interacciones pueden ser beneficiosas desde el punto de vista terapéutico pero también pueden involuntariamente producirse cuadros de toxicidad según sea el margen de seguridad de los fármacos interviniendo. La participación de la gp-P en los diferentes procesos farmacocinéticos y la influencia que tiene sobre los mismos la utilización de fármacos moduladores de gp-P se resumen en el Esquema I.

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y/O ACTIVIDAD DE LA GLICOPROTEÍNA-P

Debido a que la gp-P presenta una amplia especificidad de sustratos, es posible que ocurran interacciones entre drogas reconocidas como sustratos (inhibidores o inductores) cuando éstas son co-administradas (6). En este contexto, la reducción de la biodisponibilidad

de un fármaco administrado por vía oral podría ocurrir como consecuencia de la inducción de la actividad de las proteínas transportadoras a nivel intestinal, mientras que un incremento de la biodisponibilidad se debería principalmente a la co-administración de un fármaco inhibidor con un sustrato de la gp-P. La inhibición del transporte de fármacos a través del uso de un modulador puede ser el resultado de la inhibición del reconocimiento específico de un sustrato (26), de la inhibición de la unión al ATP, de la inhibición de la hidrólisis del ATP (27) o la asociación de la hidrólisis de ATP a la traslocación de un sustrato. Muchos moduladores inhiben el transporte a través de mecanismos de inhibición competitiva y no competitiva (28). Ejemplos de esto son el verapamilo, que se une a los sitios de unión de la gp-P inhibiendo el transporte de otros sustratos en forma competitiva, y la ciclosporina A, que interfiere tanto en el reconocimiento de sustratos como en la actividad cíclica (hidrólisis de ATP) de la gp-P. Mediante el proceso de quimiomodulación, el cual involucra la co-administración de un inhibidor (modulador) con un fármaco sustrato de la gp-P, es posible observar alteraciones de la actividad de la gp-P producidas por uno de los componentes de la asociación. Numerosos compuestos han demostrado ser inhibidores de la actividad de la gp-P y, en consecuencia, de revertir el fenómeno de resistencia a múltiples drogas (MDR). Los moduladores directos de la gp-P pertenecen a una amplia variedad de clases químicas, incluyendo bloqueantes de los canales de calcio, digitálicos, quinolonas, ciclosporinas, surfactantes, hormonas y anticuerpos. De acuerdo a su potencia y grado de citotoxicidad, los moduladores se clasifican en moduladores de primera, segunda y tercera generación. Los moduladores de primera generación son fármacos que se utilizan normalmente en terapéutica y que han demostrado tener un efecto inhibitorio sobre la actividad de gp-P. Entre ellos, el verapamilo fue el primer fármaco descrito con capacidad para revertir el fenómeno de MDR (29). Más tarde, otros estudios revelaron que esta propiedad es compartida por otros bloqueantes de los canales de calcio como diltiazem y nifedipina (30). La principal desventaja de estos moduladores es que su efecto inhibitorio sobre la actividad de gp-P se produce a concentraciones superiores a las terapéuticas, en un rango de 5 a 50 mM, provocando un incremento de la citotoxicidad en tejidos normales (31). Ciclosporina A, un agente con actividad inmunosupresora, es uno de los moduladores anti-MDR de primera generación más efectivo (32). La búsqueda de una segunda generación de mo-



Esquema I. Participación de la glicoproteína-P (gp-P) en los diferentes procesos farmacocinéticos. Las modificaciones obtenidas en cada uno de estos procesos por la acción de un compuesto modulador de este transportador, están resumidas en los óvalos negros.

BHE: barrera hematoencefálica; MD: compuesto modulador; SNC: sistema nervioso central. Scheme I. Influence of p-glycoprotein on different pharmacokinetic processes. The pharmacokinetic changes obtained after the co-administration of a gp-P substrate with a modulator compound are summarised in the black ovals. BHE: blood-brain barrier; MD: modulator compound; SNC: central nervous system

duladores no tóxicos, resultó en nuevos compuestos, análogos de los moduladores de primera generación, que demostraron ser más potentes y considerablemente menos tóxicos. Análogos estructurales del verapamilo como el dexverapamilo, emopamilo, han demostrado, *in vitro*, actividad anti-MDR en un grado equivalente al verapamilo, pero con escasos efectos de toxicidad (33). Por otra parte, el PSC 833, un análogo sintético de la ciclosporina A, que no posee actividad inmunosupresora, demostró una eficacia superior a la ciclosporina A en numerosos estudios (34). Más recientemente, nuevos moduladores han sido desarrollados tomando como modelo las características estructurales y funcionales de otros moduladores, y combinaciones químicas que les confieren la capacidad de actuar contra mecanismos específicos del MDR. Dichos agentes, que aún no están disponibles comercialmente, son efectivos en el rango de concentración entre 20-100 nM, requiriéndose bajas dosis para alcanzar concentraciones efectivas *in vivo*. También se ha descrito que la expresión o la actividad de la gp-P podría ser modulada en condiciones patológicas (procesos inflamatorios o infecciosos, etc). Fernandez, *et al.* (35) demostró que diversas citoquinas pro-inflamatorias (TNF α ; IL-1b; IL-6; IL-2; IFN γ) ejercerían un efecto inhibitorio sobre la expresión y/o funcionalidad de la gp-P en hígado, intestino y barrera hematoencefálica.

La regulación de la expresión de los transportadores celulares por fármacos inductores ha sido extensamente estudiada. Existen, a su vez, numerosos factores ambientales que pueden afectar la expresión de la gp-P. *In vitro*, se ha demostrado que la gp-P puede ser inducida por una variedad de drogas y hormonas (36). Sin embargo, el mecanismo molecular de la inducción no ha sido completamente establecido. Recientemente se ha descrito que la rifampicina induce la expresión de gp-P en el intestino humano (36). En este estudio también se ha determinado que la inducción podría estar restringida a algunos tipos celulares; sin embargo, existe muy poca información acerca de los mecanismos de inducción de la gp-P en otros tejidos. El pretratamiento con dexametasona en ratas resultó en un incremento 2 a 3 veces superior de los niveles hepáticos e intestinales de gp-P (37). Estos resultados coinciden con otro estudio sobre inducción por medio de la dexametasona en ratas, donde luego de la administración intraperitoneal de este glucocorticoide se incrementó el nivel hepático de la gp-P (38). Estos resultados sugieren que la inducción de la

expresión de la gp-P es un proceso dosis-dependiente y, que a su vez, la respuesta a la inducción por fármacos inductores es tejido-dependiente, ya que se han observado diferentes niveles de expresión en diversos tejidos en respuesta a la administración de ciclosporina A en ratas (39). Para determinar si existe una expresión diferencial de gp-P entre especies de interés veterinario, Laffont *et al.* (40), utilizó extendidos de linfocitos de sangre periférica en los cuales, mediante la determinación de la tasa de pasaje de rodanima-123 y la inhibición de su transporte por medio del uso de fármacos inhibidores (verapamilo y ciclosporina A), se observaron diferencias inter e intraespecies, identificándose tres grupos con alto (cabra), intermedio (bovino, ovino, cerdo) y bajo (rata y equino) nivel de actividad de la gp-P. Sin embargo, es necesario determinar si la actividad de la gp-P en linfocitos de sangre periférica refleja la función de este transportador en otros tejidos y si estos resultados se correlacionan con los procesos farmacocinéticos de absorción y eliminación de drogas reconocidas como sustratos de la gp-P. El efecto inductor sobre gp-P que produce la administración prolongada de ciertos fármacos, así como también componentes presentes en la dieta de las diferentes especies de animales potenciarían la aparición de interacciones farmacocinéticas afectando las concentraciones terapéuticas obtenidas tras el tratamiento con drogas sustratos de la gp-P.

INTERACCIONES FARMACOCINÉTICAS ENTRE GLICOPROTEÍNA-P Y FÁRMACOS UTILIZADOS EN MEDICINA VETERINARIA

Existen numerosos fármacos de uso en medicina veterinaria que son sustratos y/o inhibidores de diferentes transportadores celulares. En este contexto las modificaciones en la farmacocinética de estos sustratos de gp-P que han sido documentadas en los animales *mdr* (-/-) (knockout) pueden ser reproducidas cuando un efectivo inhibidor de gp-P es co-administrado con un sustrato de dicho transportador. Dentro de las drogas antiparasitarias, que son ampliamente utilizadas en la terapéutica veterinaria, se presentan ejemplos muy interesantes de interacción farmacológica con transportadores celulares. La interacción entre drogas pertenecientes al grupo de las lactonas macrocíclicas (ivermectina, moxidectin) y la gp-P ha sido documentada. Estudios *in vivo* utilizando ratones knockout para el gen *mdr1* revelaron una sensibilidad aumentada a ivermectina que se manifestó con signos de neurotoxicidad y

muerte (5). A su vez, la ivermectina ha sido descrita como un potente inhibidor de la gp-P *in vitro* (41). Teniendo en cuenta estos antecedentes, y con los recientes avances de la biología molecular, pudo demostrarse la causa de la intolerancia de los perros de raza collie a este tipo de fármacos. Existen subpoblaciones de collies que desarrollan una sensibilidad a ivermectina comparable a la que se produce en ratones knockout para el gen *mdr1*. (42). La causa de esta sensibilidad se relaciona con una mutación (delección) del gen MDR1, que da como resultado una proteína no funcional (43, 44). Los perros homocigotas para la delección (mutación/mutación) experimentan efectos neurológicos adversos luego de una dosis única de ivermectina (100 µg/Kg). A su vez, se ha demostrado que collies sensibles pueden tener incrementada su susceptibilidad a otros fármacos endectocidas como milbemicina y moxidectin (45). La aparición de otras razas o especies susceptibles a la acción de diferentes drogas, en donde estén implicados transportadores de tipo celular como gp-P, abre un campo futuro de investigación en medicina veterinaria.

Además de las implicancias toxicológicas, importantes modificaciones farmacocinéticas fueron descritas para las lactonas macrocíclicas tras su co-administración con compuestos moduladores de gp-P. Alvinieri *et al.* (46) demostró el efecto de la actividad de gp-P sobre la farmacocinética de una formulación pour-on de ivermectina (IVM) en ratas, utilizando verapamilo (VRP) como agente modulador. La concentración plasmática máxima (C_{max}) y el tiempo requerido para alcanzar la C_{max} (T_{max}) en los grupos tratados con IVM fue menor a la obtenida en los grupos tratados con IVM-VRP. Por otra parte, Lifschitz *et al.* (47) evaluó en bovinos la influencia de loperamida (LPM) sobre el patrón de excreción fecal y disposición plasmática de moxidectin (MXD) administrado por vía intravenosa y subcutánea. Concentraciones significativamente mayores de MXD fueron obtenidas luego de la administración de MXD-LPM, comparado con MXD solo, para ambas vías de administración, obteniéndose una reducción del clearance corporal de MXD tras la co-administración con el antidiarreico. La coadministración de VRP con IVM administrada por vía oral en ovinos, incrementó significativamente la absorción del antiparasitario (48). En corderos la coadministración de quercetina, un derivado flavonoide presente en vegetales, junto con MXD produjo un incremento en las concentraciones plasmáticas del antiparasitario (49). Si bien se ha descrito que los fármacos

endectocidas son excretados en una alta proporción como droga activa a través del tracto biliar/fecal (50, 51), el rol de los transportadores celulares en el proceso de eliminación de estos fármacos ha sido escasamente definido. Laffont *et al.* (52) estudió la secreción intestinal de IVM utilizando un modelo de perfusión intestinal (loop cerrado) *in situ* en ratas, obteniendo el mayor porcentaje de IVM secretada en el yeyuno. Una mayor disponibilidad de IVM fue obtenida en el plasma, el hígado y la pared del intestino delgado tras su co-administración con LPM en ratas (53), lo que refleja la importancia de estos transportadores en la secreción biliar e intestinal de los endectocidas. La influencia de la co-administración de fármacos endectocidas con moduladores de la gp-P sobre la farmacocinética de estas importantes drogas dentro de la terapéutica antiparasitaria en medicina veterinaria se muestra en la Figura II.

Recientemente ha despertado gran interés el estudio de los posibles mecanismos mediados por transportadores celulares relacionados al fenómeno de resistencia antihelmíntica. La primera gp-P de helmintos fue descrita a partir del nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* (54), del que se han identificado al menos 14 gp-P homólogas, y posteriormente en otros como *Onchocerca valvulus* (55) y *Haemonchus contortus* (56). Smith y Prichard (56) demostraron la asociación entre gp-P de *H. contortus* y la resistencia a ivermectina y moxidectin. La transcripción del gen que codifica a la gp-P estaría alterada en nematodos resistentes a fármacos endectocidas. Por otra parte, Xu, *et al.* (57) demostró que el ARNm de la gp-P está presente en mayores cantidades en *H. contortus* resistentes a IVM comparado con los susceptibles, lo que estaría indicando una sobreexpresión de gp-P en nematodos resistentes. La co-administración de drogas endectocidas como IVM y MXD junto con verapamilo incrementó el porcentaje de eficacia contra *Haemonchus contortus* resistente a estas drogas en animales de laboratorio (58). Si bien la interacción de los antihelmínticos benzimidazoles con estos transportadores celulares proteicos no está del todo aclarada (59, 60), la posible participación de la gp-P en los mecanismos de resistencia a estos fármacos ha sido sugerida (61).

Numerosos estudios presentan interacciones entre fármacos utilizados en la terapéutica veterinaria y la gp-P. En el caso del glicósido cardíaco digoxina, su interacción con moduladores de la gp-P genera cambios en su

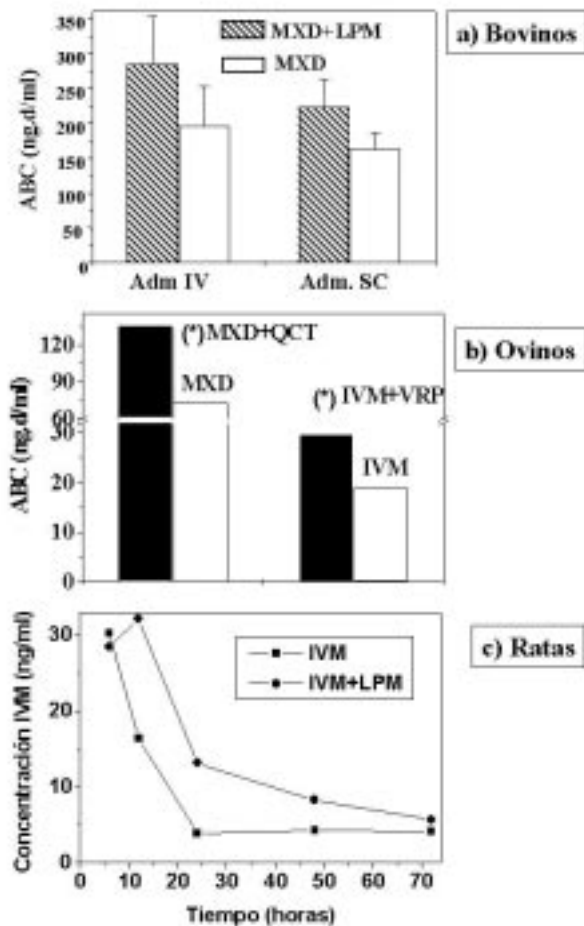


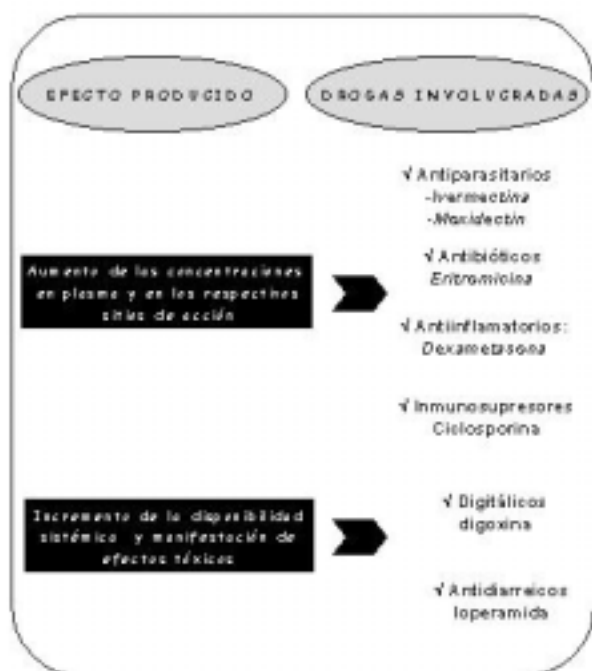
Figura II. Influencia de la glicoproteína-P (gp-P) en el comportamiento farmacocinético de las drogas antiparasitarias endectocidas en diferentes especies. a) Comparación de la disponibilidad sistémica (plasma) expresada como área bajo la curva concentración vs tiempo (ABC) de moxidectin (MXD) tras su administración por vía endovenosa (IV) o subcutánea (SC) sola o co-administrada con loperamida (LPM) en bovinos (adaptado de Lifschitz et al. (47); b) Comparación de la disponibilidad de MXD e ivermectina (IVM) administradas solas o junto a quercentina (QCT) (adaptado de Dupuy et al. (49)) y verapamilo (adaptado de Molento et al. (48)), respectivamente en ovinos y c) concentraciones plasmáticas de ivermectina (IVM) tras su administración SC sola o junto a LPM en ratas (adaptado de Lifschitz et al. (53)). (*) Valores estadísticamente diferentes a los obtenidos tras la administración del fármaco endectocida solo $P < (0.05)$.

Figure II. Influence of P-glycoprotein (P-gp) on the pharmacokinetic behaviour of endectocides drugs in different species. a) Comparison of the systemic availability expressed as area under the curve vs. time (AUC) of moxidectin (MXD) after its intravenous (IV) or subcutaneous (SC) administration alone or co-administered with loperamide (LPM) in cattle (adapted from Lifschitz et al. (47)); b) AUC comparison of the MXD and ivermectin (IVM) administered alone or with quercetin (QCT) (adapted from Dupuy et al. (49)) and verapamil (adapted from Molento et al. (48)), respectively c) IVM plasma concentration after subcutaneous administration alone or co-administered with LPM in rats (adapted from Lifschitz et al. (53)). (*) Values are statistically different from those obtained after endectocide drug treatment alone $P < (0.05)$.

comportamiento farmacocinético. Estos cambios han sido descritos con la interacción digoxina-claritromicina (62), digoxina-verapamilo (63) y digoxina-itraconazole (64). En todos los casos, el principal efecto sobre la biodisponibilidad de digoxina, como consecuencia del uso de moduladores fue la disminución del clearance renal, con incrementos del nivel plasmático y de la vida media del digitálico. La co-administración de digoxina junto a quercetina en cerdos resultó en un cuadro de toxicidad con mortandad debido al notorio aumento de las concentraciones plasmáticas de digoxina (65).

Dentro de los fármacos antimicrobianos, las tetraciclinas, los macrólidos y las quinolonas han mostrado diferentes tipos de interacciones con los transportadores celulares proteicos. La presencia de inhibidores de la gp-P incrementó la permeabilidad de algunas fluorquinolonas en células Caco-2 (66). La rifampicina es un potente inductor de gp-P (36) lo que puede determinar substanciales modificaciones en el comportamiento farmacocinético de otros sustratos que sean administrados tras el uso prolongado del compuesto inductor. Las drogas antifúngicas ketoconazole e itraconazole se comportan como sustratos/inhibidores tanto de la gp-P como también de la citocromo P450. Estas drogas pueden alterar la farmacocinética de otros compuestos sustratos de la gp-P como digoxina (38) o que su propio comportamiento farmacológico se vea modificado cuando son co-administrados con drogas inductoras de la gp-P como la rifampicina (67). Los cuadros de toxicidad producidos por el antidiarreico loperamida en perros Collies (68) demuestran el rol de la gp-P como regulador del ingreso de este compuesto en concentraciones elevadas al SNC. La co-administración de esta droga junto al inhibidor de gp-P quinidina produjo un aumento de los efectos colaterales de loperamida (69). Derivados esteroides (dexametasona, progesterona) y drogas inmunosupresoras como la ciclosporina pueden producir complejas interacciones farmacológicas mediadas por gp-P cuando son administradas con otros sustratos de este transportador proteico (70, 71, 72). El Esquema II resume los efectos producidos tras la co-administración de drogas de uso veterinario con fármacos moduladores de gp-P.

Diversos estudios han demostrado la participación de gp-P en los procesos de absorción y excreción de fármacos. El avance en el estudio del rol de este transportador ha permitido individualizar el origen de la toxicidad de ciertas drogas en algunas especies, así como



Esquema II: Resumen de los principales efectos producidos tras la co-administración de drogas de uso veterinario junto a moduladores de la glicoproteína-P.

Scheme II: Summary of most important effects obtained after the co-administration of different drugs used in veterinary medicine and P-glycoprotein modulators.

también las causas del fracaso terapéutico tras la administración de drogas por vía oral. La co-administración de drogas es una práctica frecuente en medicina veterinaria y dadas las amplias y complejas interacciones que se producen entre fármacos sustratos de la gp-P, se deben evaluar cuidadosamente las consecuencias fármaco/toxicológicas de las mismas. A nivel intestinal, una inhibición de la secreción mediada por gp-P podría conducir a importantes incrementos en la biodisponibilidad, principalmente de aquellos fármacos administrados por vía oral. Esto puede convertirse en una herramienta farmacológica de utilidad para mejorar la disponibilidad sistémica y la eficacia clínica de ciertos compuestos. Por otra parte, es importante tener en cuenta el peligro de toxicidad que puede ocurrir tras este tipo de interacciones cuando se ven aumentadas las concentraciones de drogas de bajo índice terapéutico. La participación de los transportadores celulares proteicos en diferentes especies de animales domésticos y su rol fisiofarmacológico necesita ser abordado. La valoración de los procesos que regulan la disposición de fármacos en las diferentes especies, así como las consecuencias potenciales de las interacciones farmacológicas produci-

das entre fármacos sustratos de estos transportadores, podría generar alternativas terapéuticas para el control de enfermedades, mejorando la eficacia clínica de los tratamientos farmacológicos y retardar, en el caso de los fármacos antihelmínticos, el desarrollo de resistencia. La información contenida y discutida en este trabajo deja en evidencia la necesidad de investigar sobre el comportamiento fisiofarmacológico de la gp-P en las diferentes especies y razas de animales domésticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lanusse CE, Prichard R. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet Parasitol* 1993; 49: 123-158.
2. Riviere J. Comparative pharmacokinetics: principles techniques and applications. Iowa State University Press, 2121 South State Avenue, Ames, Iowa, (USA), 1999. Alvinerie M, Dupuy J, Eeckhoutte C, Sutra JF. Enhanced absorption of pour-on ivermectin formulation in rats by co-administration of the multidrug-resistant-reversing agent verapamil. *Parasitology Res* 1999; 85:920-922.
3. Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol C, Borst P. Absence of the mdr-1aP-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin and cyclosporin A. *J Clin Invest* 1995; 96: 1698-1705.
4. Mealey KL. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *J Vet Pharmacol Therap* 2004; 27:257-264.
5. Schinkel AH. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 1997; 8: 161-170.
6. Lin JH. Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 53-81.
7. Levêque D, Jehl F. P-glycoprotein and pharmacokinetics. *Anticancer Res* 1995; 15: 331-336.
8. Ling V, Thompson LH. Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J. Cell Physiol* 1974; 83: 103-116.
9. Lee CH, Bradley G, Zhang J-T, Ling V. Differential expression of P-glycoprotein genes in primary rat hepatocyte culture. *J Cell Physiol* 1993; 157: 392-402.
10. Smith JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RPJ, Groen AK, Wagenaar L, van Deemter L, Mol CAAM, Ottendorf R, van der Lugt NMT, van Roon MA, van der Walk MA, Offerhaus GJA, Berns AJM, Borst P. Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and the liver disease. *Cell* 1993; 75: 451-462.
11. Fardel O, Lecureur V, Guillouzo A. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Gen Pharmacol*

- 1996; 27: 1283-1291.
12. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramanchandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 361-398.
13. Higgings CF, Gottesman MM. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci* 1992; 17: 18-21.
14. Ford JM, Hait WN. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharmacol Rev* 1990; 42: 155-199.
15. Hunter J, Hirst BH. Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; 25: 129-157.
16. Ford JM. Modulators of multidrug resistance. Preclinical studies. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995; 9: 337-361.
17. Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T. Human P-glycoprotein transports cotisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem* 1992; 267: 24248-52.
18. Yang C-PH, DePinho SG, Greenberger LM, Arceci RJ, Horwitz SB. Progesterone interacts with P-glycoprotein in multidrug resistant cells and in the endometrium of gravid uterus. *J Biol Chem* 1989; 264: 782-788.
19. Arceci RJ, Croop JM, Horwitz SVB, Housman D. The gene encoding multidrug resistance is induced and expressed at high levels during pregnancy in the secretory epithelium of the uterus. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 4350-4354.
20. Dantzig AH, Alwis DP, Burgess M. Considerations in the design and development of transport inhibitors as adjuncts to drug therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 133-150.
21. Stephens RH, Tanianis-Hughes N, Higgs NB, Humphrey M, Warhust G. Region-dependent modulation of intestinal permeability by drug efflux transporters: in vitro studies in *mdr1a*(-/-) mouse intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303:1095-1101.
22. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of the multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 265-269.
23. Fricker G, Drewe J, Huwyler J, Gutmann H, Beglinger C. Relevance of P-glycoprotein for the enteral absorption of cyclosporin A: in vitro-in vivo correlation. *Brit J Pharmacol* 1996;118: 1841-1847.
24. Carreño-Gómez B, Duncan R. Everted rat intestinal sacs: a new model for the quantification of glycoprotein mediated-efflux of anticancer agents. *Anticancer Res* 2000; 20: 3157-3162.
25. Lankas GR, Wise LD, Cartwright ME, Pippert T, Umbenhauer DR. Placenta P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reproduc Toxicol* 12, 1998; 457-463.
26. Tamai I, Safa, AR. Azidopine noncompetitively interacts with vinblastine and cyclosporin A binding to P-glycoprotein in multidrug resistance cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 16796-800.
27. Ramanchandra M, Ambudkar SV, Chen D, Hrycina CA, Dey S. Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state. *Biochemistry* 1998; 37: 5010-19.
28. Garrigos M, Mir LM, Orlowski S. Competitive and non-competitive inhibition of the multidrug-resistance-associated P-glycoprotein ATPase- further experimental evidence for a multisite model. *Eur J Biochem* 1997; 244: 664-673.
29. Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 1981; 41: 1967-1972.
30. Molden E, Christensen H, Sund RB. Extensive metabolism of diltiazem and P-glycoprotein-mediated efflux of desacetyl-diltiazem (M1) by rat jejunum in vitro. *Drug Metab Dispos* 2000; 2: 107-9.
31. Lampidis TJ, Kolonias D, Tapiero H, Savaraj N, Cahn J. In vitro cardiac potencies of multidrug resistance modulators. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1990; 31: 373.
32. Kukl JS, Sikic BI, Blume KG, Chao NJ. Use of etoposide in combination with cyclosporine for purging multidrug resistant leukemic cells from bone marrow in a mouse model. *Exp Hematol* 1992; 20: 1048-1054.
33. Pirker R, Keilhauer G, Rascharck M, Lechner C, Ludwig H. Reversal of multidrug resistance in human KB cell lines by structural analogs of verapamil. *In J Cancer* 1990; 45: 916-919.
34. Song S, Suzuki H, Kawai R, Sugiyama Y. Effect of PSC 833, a P-glycoprotein modulator, on the disposition of vincristine and digoxin in rats. *Am Soc Pharmacol Exp Therap* 1999; 27: 689-694.
35. Fernandez C, Buyse M, German- Fattal M, Gimenez F. Influence of the pro-inflammatory cytokines on P-glycoprotein expression and functionality. *J Pharm Pharm Sci* 2004; 3: 359-371.
36. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, VonRichter O, Zundler I, Kroemer HK. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest* 1999; 104: 147-153.
37. Lin JH, Chiba M, Chen I.-W, Nishime JA, de Luna M, Yamazaki M, Lin Y. Effect of dexamethasone on the intestinal first-pass metabolism of indinavir in rats: evidence of cytochrome P-450 and P-glycoprotein induction. *Drug Metabol Dispos* 1999; 27: 1187-1193.
38. Salphati L, Benet LZ. Modulation of P-glycoprotein expression by cytochrome P-450 3A inducers in male and female rat livers. *Biochem. Pharmacol* 1998; 55: 387-395.
39. Jette L, Beaulieu E, Leclere J-M, Beliveau R. Cyclosporin A treatment induces overexpression of

- P-glycoprotein in the kidney and other tissues. *Am J Physiol* 1996; 270: F756-F765.
40. Laffont, C, De Vrieze G, Maas R, Bousquet-Melou A, Fink-Gremmels J. *Comparativa evaluation of P-glycoprotein activity in horses, pigs, cattle, sheep, goats, and rats using a lymphocyte-based ex vivo model. J Vet Pharmacol Therap* 2003; 26: 82-307.
41. Didier AD, Loor F. The abamectin derivate ivermectin is a potent P-glycoprotein inhibitor. *Anticancer Drugs* 1996; 7: 745-751.
42. Paul AJ, Tranquilli WJ, Seward RL, Todd KS, Di Pietro JA. Clinical observations in collies given ivermectin orally. *Am J Vet Res* 1987; 48: 684-685.
43. Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 727-733.
44. Roulet A, Puel O, Gesta S, Lepage JF, Drag M, Soll M, Alvinerie M, Pineau T. MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *Eur J Pharmacol* 2003; 2-3: 85-91.
45. Tranquilli WJ, Paul AJ, Todd KS. Assessment of toxicosis induced by high-dose administration of milbemycin oxime in collies. *Am J vet Res* 1991; 52: 1170-1172.
46. Alvinerie M, Dupuy J, Eeckhoutte C, Sutra JF. Enhanced absorption of pour-on ivermectin formulation in rats by co-administration of the multidrug-resistant-reversing agent verapamil. *Parasitology Res* 1999; 85:920-922.
47. Lifschitz A, Virkel G, Sallovitz J, Imperiale F, Pis A, Lanusse C. Loperamide-induced enhancement of moxidectin availability in cattle. *J vet Pharmacol Therap* 2002; 25: 111-120.
48. Molento MB, Lifschitz A, Sallovitz J, Lanusse C, Prichard R. Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. *Parasitol Res* 2004; 2:121-7.
49. Dupuy J, Larrieu G, Sutra JF, Lespine A, Alvinerie M Enhancement of moxidectin bioavailability in lamb by a natural flavonoid: quercetin. *Vet Parasitol* 2003; 4:337-47.
50. Chiu S, Green M, Baylis F, Eline D, Rosegay A, Meriwether H, Jacob T. Absorption, tissue distribution and excretion of tritium-labelled ivermectin in cattle, sheep, and rat. *J. Agric. Food Chem* 1990; 38: 2072-2078.
51. Lifschitz, A, Virkel G, Sallovitz J, Sutra JF, Galtier P, Alvinerie M, Lanusse C. Comparativa distribution of ivermectin and doramectin to tissues of parasitic location in cattle. *Vet parasitol* 2000; 87:327-338.
52. Laffont CM, Toutain P, Alvinerie M, Bousquet-Mélou A. Intestinal secretion is a mayor route for parent ivermectin elimination in the rat. *Drug Metab Dispos* 2002; 30: 626-630.
53. Lifschitz A, Virkel G, Sallovitz J, Imperiale F, Pis A, Lanusse C. Loperamide modifies the tissue disposition kinetics of ivermectin in rats. *J Pharm Pharm* 2004; 56:61-67.
54. Broeks A, Janssen H, Calafat J, Plasterk RHA. A P-glycoprotein protects *Caenorabditis elegans* against toxins. *EMBO J* 1995; 14: 1858-1866.
55. Kwa MSG, Okoli MN, Schulz-Key H, Okongkwo PO, Ross MH. Use of P-glycoprotein gene probes to investigate antihelmintic resistance in *Haemonchus contortus* and comparison with *Onchocerca volvulus*. *Int J Parasitol* 1998; 28: 1235-1240.
56. Smith JM, Prichard RK. Localization of P-glycoprotein mRNA in the tissues of *Haemonchus contortus* adult worms and its relative abundance in drug-selected and susceptible strains. *J Parasitol* 2001; 83 (3): 612-620.
57. Xu M, Molento M, Blackhall W, Ribeiro P, Beech R, Prichard RK. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 91: 327-335.
58. Molento MB, Prichard RK. Effects of the multidrug-resistance-reversing agents verapamil and CL 347,099 on the efficacy of ivermectin or moxidectin against unselected and drug-selected strains of *Haemonchus contortus* in jirds (*Meriones unguiculatus*). *Parasitol Res* 1999; 85: 1007-1011.
59. Merino G, Alvarez AI, Prieto JG, Kim RB. The antihelmintic agent albendazole does not interact with P-glycoprotein. *Drug Metab Dispos* 2002; 30: 365-369.
60. Merino G, Molina AJ, Garcia JL, Pulido MM, Prieto JG, Alvarez AI. Intestinal elimination of albendazole sulfoxide: pharmacokinetic effects of inhibitors. *Int J Pharm* 2003; 16; 263:123-32.
61. Beugnet F, Gauthey M, Kerboeuf D. Partial in vitro reversal of benzimidazole resistance by the free-living stages of *Haemonchus contortus* with verapamil. *Vet Res* 1997; 141: 575-576.
62. Wakasugi H, Yano I, Ito T, Hashida T, Futami T, Nohara R, Sasayama S, Inui K. Effect of clarithromycin on renal excretion of digoxin: interaction with P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 1:123-8.
63. Pedersen KE, Thayssen P, Kiltgaard NA, Christiansen BD, Nielsen-Kudsk F. Influence of verapamil on the inotropism and pharmacokinetics of digoxin. *Eur J Pharmacol* 1983; 25: 199-206.
64. Woodland C, Ito S, Koren G. A model for the prediction of digoxin-drug interactions at the renal tubular cell level. *Ther Drug Monit* 1998; 2:134-8.
65. Wang YH, Chao PD, Hsiu SL, Wen KC, Hou YC. Lethal quercetin-digoxin interaction in pigs. *Life Sci* 2004; 10:1191-7.
66. Rodríguez-Ibáñez M, Nalda-Molina R, Mantalar-Montero M, Bermejo MV, Merino V, Garrigues TM. Transintestinal secretion og ciprofloxacin, grepafloxacin and sparfloxacin: in vitro and in situ inhibition studies. *Eur J Pharm Bioph* 2003; 55: 241-246.
67. Niemi M, Backman JT, Fromm MF, Neuvonen PJ, Kivisto KT. Pharmacokinetic interactions with

rifampicin : clinical relevance. *Clin Pharmacokinet* 2003; 9:819-50.

68. Hugnet C, Cadore JL, Buronfosse F, Pineau X, Mathet T, Berny PJ. Loperamide poisoning in the dog. *Vet Hum Toxicol* 1996; 1:31-3.

69. Sadeque AJ, Wandel C, He H, Shah S, Wood AJ. Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 3:231-7.

70. Nakayama A, Saitoh H, Oda M, Takada M, Aungst BJ. Region-dependent disappearance of vinblastine in rat small intestine and characterization of its P-glycoprotein-mediated efflux system. *Eur J Pharm Sci* 2000; 11: 317-324.

71. Varis T, Kivisto KT, Backman JT, Neuvonen PJ. The cytochrome P450 3A4 inhibitor itraconazole markedly increases the plasma concentrations of dexamethasone and enhances its adrenal-suppressant effect. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 5:487-94.

72. Dahlinger J, Gregory C, Bea J. Effect of ketoconazole on cyclosporine dose in healthy dogs. *Vet Surg* 1998; 1:64-8.

UVEÍTIS EN EL FELINO

Del Sole MJ^{1,2}, Sande PH¹, Rosenstein RE¹, Aba MA²

¹ Laboratorio Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

² Laboratorio Fisiología Sistema Nervioso y Endocrinología, Departamento Fisiopatología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Argentina

Resumen: La uveítis es un desorden oftálmico frecuente en los felinos, que en el 70% de los casos se asocia a enfermedades sistémicas fatales de alta prevalencia. Además, puede estar asociada a traumas penetrantes o contusos relacionados con peleas callejeras y accidentes automovilísticos, a los que esta especie se encuentra altamente expuesta. El proceso se inicia con una lesión tisular local que compromete la barrera hematoocular aumentando la permeabilidad vascular. Consecuentemente, los leucocitos infiltrados liberan citoquinas y otros mediadores, como metabolitos del ácido araquidónico y especies reactivas del oxígeno (ROS). Se ha demostrado que un exceso de ROS que supera la capacidad de defensa del sistema antioxidante endógeno produce daño irreversible a nivel de las distintas estructuras oculares. Actualmente, la terapéutica se basa en el uso de corticoides y antiinflamatorios no esteroides. Sin embargo, estudios recientes indican que sólo el 33% de los animales con uveítis asociadas a enfermedades sistémicas responden a estos tratamientos. El objetivo del presente trabajo es exponer el estado actual del conocimiento sobre los mecanismos fisiopatológicos de la uveítis felina y los tratamientos utilizados, así como orientar la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

Palabras clave: uveítis, felinos, fisiopatología, terapéutica

FELINE UVEITIS

Abstract: Uveitis is a frequent ophthalmic disorder in the domestic cat, often associated with mortal systemic diseases of high prevalence in this species. In addition, uveitis may be caused by perforating or blunt traumas provoked by fights or car accidents. The process starts with a local lesion in the haematoocular barrier which increases the vascular permeability. The infiltrated leukocytes release cytokines and other inflammatory chemical mediators, like arachidonic acid metabolites and reactive species of oxygen (ROS). The increased amount of ROS may overpass the capacity of the endogen antioxidant system and produces an irreversible lesion in the different ocular structures. At present, the therapy against uveitis is mainly directed towards pain reduction and to avoid lesions in visual tissues. In general, it is based on the use of corticoids and no steroid antiinflammatory drugs. However, in recent studies it has been shown that only 33% of animals affected by uveitis associated to systemic diseases respond to the treatment. The aim of the present revision is to present the current status of knowledge regarding the physiopathology of uveitis and to analyze available drugs for its treatment. In addition, possible alternative therapies will be suggested.

Key words: uveitis, feline, pathophysiology, therapy

Fecha de recepción: 13/05/05

Fecha de aprobación: 05/10/05

Dirección para correspondencia: Del Sole MJ, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Campus Universitario, Tandil (7000), Buenos Aires, Argentina. Tel./Fax: 02293 42 6667 **E-mail:** mdelsole@vet.unicen.edu.ar

ANATOMÍA

La úvea, o tracto uveal, es la túnica media vascular del ojo. Consiste en una porción anterior, compuesta por el iris y el cuerpo ciliar, y una posterior, la coroides. La úvea es el principal componente de la barrera hematoocular, está implicada en la formación del humor acuoso (HA) y es una barrera inmunitaria para los componentes internos del ojo (1). La disfunción de su actividad como barrera que normalmente evita el ingreso de proteínas de alto peso molecular al fluido intraocular, puede provocar la reducción o pérdida de las funciones visuales (2).

El *iris* funciona como un diafragma móvil localizado frente al cristalino. Mediante los músculos lisos iridiales (esfinteriano y dilatador pupilar) regula el ingreso de luz a la retina a través del control del tamaño de la pupila. El *cuerpo ciliar*, a través de la producción de HA, aporta nutrientes a la córnea, al cristalino y a los tejidos adyacentes. Además, está implicado en el filtrado del HA a través del drenaje uveoescleral, en la reposición de glicosaminoglicanos al humor vítreo (HV), en la provisión de puntos de anclaje de las fibras zonulares del cristalino y, por consiguiente, en su acomodación dinámica que es considerablemente limitada en los animales (3). La *coroides* se ubica entre la retina y la esclerótica. Sus funciones son suministrar nutrientes a la parte externa de la retina y absorber el calor generado por la luz incidente, protegiendo a los fotorreceptores (3). El *tapetum* es una lámina reflectora contenida en la coroides superior que incrementa la sensibilidad visual porque refleja la luz a través de la capa fotorreceptora luego de su primer pasaje (1, 3).

FISIOPATOLOGÍA

La inflamación uveal está involucrada en diversas enfermedades oculares y sistémicas debido a la naturaleza altamente vascular e inmunosensible de la úvea. La íntima relación anatómica de esta estructura con el cristalino, la retina y el nervio óptico, componentes oculares fundamentales para el desarrollo de la función visual, hace crítico el diagnóstico temprano de la enfermedad.

La uveítis se clasifica en anterior, intermedia y posterior de acuerdo con las estructuras implicadas en el proceso inflamatorio. La uveítis anterior afecta primariamente al iris (*iritis*) o al iris y la parte anterior del cuerpo ciliar (*iridociclitis*). La uveítis intermedia afecta con mayor predominio la parte posterior del cuerpo ciliar (*pars planitis*) y la uveítis posterior involucra sobre todo a la coroides

(*coroiditis*), aunque, debido a su proximidad con la retina, es usual la inflamación de ambas estructuras (*retinocoroiditis o coriorretinitis*) (1, 4, 5, 6). Sin embargo, el límite entre estas entidades es difuso, pues las estructuras uveales son contiguas y usualmente se afectan en forma conjunta (1, 4, 5, 6).

La barrera hematoocular está compuesta por uniones estrechas entre las células epiteliales del cuerpo ciliar no pigmentado, células epiteliales pigmentarias retinianas y células endoteliales vasculares del iris y la retina (3). La uveítis se inicia con una lesión tisular local que compromete la barrera hematoocular (6). Al igual que la inflamación en otros tejidos, la respuesta aguda al daño uveal consiste en una breve vasoconstricción arteriolar, seguida por una prolongada dilatación de la unidad arteriola-capilar-vénula con concurrente alteración de la permeabilidad vascular. Si bien toda la vasculatura iridial posee una misma angioarquitectura, en la que el tipo de unión intercelular se corresponde con la de las arteriolas, es decir uniones menos predisuestas al aumento de la permeabilidad vascular como las de las vénulas (2), los felinos presentan una pared de células endoteliales discontinuas en los capilares del iris (3), característica que favorece el desarrollo de uveítis en gatos. Consecuentemente, proteínas, eritrocitos (*hifema*) y leucocitos (*hipopion*) abandonan el lumen vascular y se acumulan en el HA produciendo turbidez en la cámara anterior (Figura 1). El impacto de la de luz sobre estas partículas provoca su reflexión continua a través de la cámara anterior (fenómeno Tyndall) (5). En condiciones fisiológicas, el contenido proteico del HA en gatos se encuentra alrededor de 0,50 mg/ml (7), valores similares a los obtenidos recientemente en nuestro laboratorio (0,32 +/- 0,04 mg/ml). La proteína más abundante es la albúmina, seguida por globulinas de mayor tamaño. Además las proteínas, la fibrina y los pigmentos, estos últimos provenientes de los macrófagos cargados de pigmentos y de las células estromales pigmentadas del iris (5), pueden acumularse focalmente sobre el endotelio corneal (*precipitados queráticos*), gravitar en la cámara anterior ventral (*hipopion*) e infiltrar el iris hipervascularizado (*rubeosis iridial*), generando *tumefacción iridial* (6). Asimismo, si el sangrado fue inicialmente extensivo o es continuo puede ocurrir un llenado eritrocitario completo de la cámara anterior (2). También es posible que debido a la inflamación intraocular los *vasos ciliares anteriores*, e incluso los *conjuntivales*, se encuentren *hiperémicos* (2, 6).

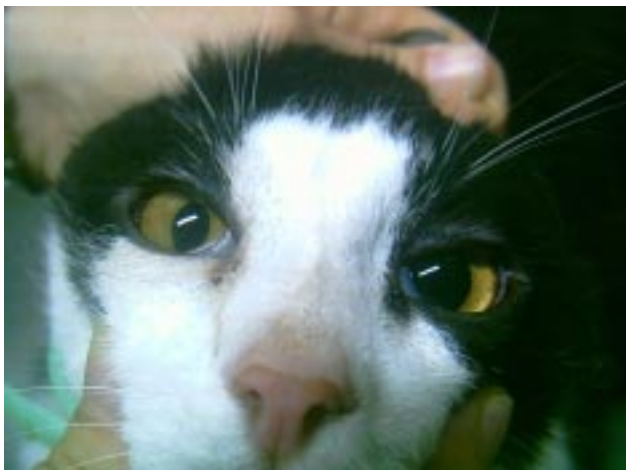


Figura 1. Gato de 8 años de edad con uveítis unilateral derecha. Nótese la anisocoria y la turbidez en el humor acuoso producto de la infiltración celular y proteica. También se observa dolor puesto de manifiesto por epífora y leve enoftalmo con protrusión pasiva del tercer párpado.

Figure 1. Male cat, 8 years old, with unilateral right uveitis. See the anisocoria and the flare in anterior camera due to cellular and protein infiltration. Pain is manifested by epiphora and soft enophthalmos with third eyelid protrusion.

La inflamación aguda de la úvea anterior provoca dolor que se manifiesta por *blefarospasmo*, *fotofobia*, *lagrimeo* excesivo y retracción del globo ocular (*enoftalmos*), con protrusión pasiva o activa del tercer párpado (6) (Figura 2).

La disminución de la presión intraocular (PIO), indicador temprano de uveítis (2), es característica del proceso patológico y se origina como consecuencia de la reducción en la producción de HA por la inflamación de los cuerpos ciliares (*ciclitis*) (6), o bien por un aumento del flujo uveoescleral mediado por prostaglandinas (PGs) (2). Asimismo, en procesos crónicos, la fibrosis o atrofia (o ambos) del cuerpo ciliar contribuyen a la disminución de la función secretoria e hipotonía ocular (2). La PIO normal oscila en un rango de 15 a 20 mm Hg (6).

La constricción pupilar, o *miosis*, es una respuesta a las PGs y a otros mediadores de la inflamación, por acción directa sobre el músculo esfinteriano. El reflejo tapetal permite evaluar la simetría pupilar (Figura 1) (5). Aunque la miosis puede no estar presente en todos los casos; pues en procesos tempranos, o bien cuando las *sinequias anteriores* o *posteriores* mantienen pupilas contraídas o medianamente dilatadas, el resultado es una pupila fija o distorsionada (2).



Figura 2. Gata de 8 meses de edad con uveítis unilateral pos traumática. Se observa dolor puesto de manifiesto mediante blefarospasmo, epífora y enoftalmo, con consecuente protrusión del tercer párpado.

Figure 2. Kitten with unilateral posttraumatic uveitis. The blepharospasm, epiphora and enophthalmos with consequent third eyelid protrusion are signs of pain.

El *edema corneal* observado en algunos casos es el resultado de una disfunción de las células endoteliales de la córnea inducida por mediadores de la inflamación presentes en el HA (5). Estas células son una de las estructuras implicadas en mantener la condición anhidra de la córnea a través del funcionamiento de una bomba Na-K ATPasa (3). En los casos crónicos, el edema se produce por la extravasación de líquido desde los vasos sanguíneos perilímbicos profundos que invaden la córnea hacia el estroma como consecuencia de la prolongación de la inflamación de las estructuras contiguas (6).

La *coriorretinitis activa* se caracteriza por infiltración celular y edema, que en el examen oftalmoscópico se presentan como focos grisáceos. La alteración de la barrera hematorretiniana produce edema y desprendimiento retinianos, manguitos perivasculares y hemorragia. En la *coriorretinitis inactiva* los signos oftalmoscópicos son: alteración de la coloración tapetal, hiperpigmentación o hipopigmentación del epitelio pigmentario retiniano e hiperreflectividad tapetal por adelgazamiento de la retina (6).

Mediadores químicos

Una de las posibles causas de la pérdida visual asociada a uveítis es el consecuente daño provocado por la infiltración de células

inflamatorias, que una vez activadas liberan citoquinas y otros mediadores, como metabolitos del ácido araquidónico (AA), óxido nítrico (NO), anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($HO\cdot$) (8). Las citoquinas, así como el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), la interleuquina 1 (IL-1), la interleuquina 6 (IL-6), la interleuquina 12 (IL-12), amplifican la respuesta inflamatoria por activar y reclutar más células inflamatorias en el sitio de la inflamación (9).

Los metabolitos del AA regulan la permeabilidad vascular, la quimiotaxis y la amplificación de la uveítis (10). Si bien se desconoce el principal destino metabólico del AA (vía de la ciclooxigenasa (COX), lipooxigenasa u oxidación), y por consiguiente el tipo de mediadores inflamatorios predominantes en los ojos de animales con uveítis, se ha demostrado que en la cámara anterior de conejos y humanos, el AA liberado desde las células dañadas por la acción de fosfolipasas se transforma más rápidamente en derivados de la COX (PGs, tromboxano y prostaciclina) que en los derivados de la lipooxigenasa (leucotrienos, ácidos hidroperóxidos e hidroxieicosatetraenoico) (5). De todos ellos, las PGs han sido las más estudiadas y podrían estar involucradas en la miosis, hiperemia, aumento de la permeabilidad vascular y, dependiendo de la especie, en el descenso de la PIO (5).

Los leucotrienos son sustancias vasoactivas con efectos similares a los de las PGs. Si bien su acción a nivel ocular no ha sido estudiada en detalle, es conocida su actividad quimiotáctica, humoral y celular mayor que la de las PGs (5). El leucotrieno B_4 , detectado en el HA de perros con uveítis inducida por el cristalino (UIC) (8), facilita la adherencia de leucocitos al endotelio vascular.

Las células inflamatorias acumuladas en el tracto uveal, principalmente fagocitos polimorfonucleares (PMNs) y mononucleares pueden generar especies reactivas del oxígeno (ROS) (9). Los ROS, (incluyendo el H_2O_2 , el $HO\cdot$ y el O_2^-) cumplen un rol central en el desarrollo de la uveítis (5). En este sentido, se ha descrito un aumento significativo en la peroxidación lipídica en modelos experimentales de uveítis (11, 12) y que la perfusión de ojos de caninos *in vitro* con H_2O_2 provoca miosis, ruptura de la barrera hematoacuosa, disminución de la PIO y edema conjuntival (13).

El O_2^- se produce en relación con el proceso de fagocitosis en el que existe un alto consumo de O_2 y glucosa. Aunque por si mis-

mo es poco reactivo, los productos secundarios asociados, tales como H_2O_2 , el ácido hipocloroso y el $HO\cdot$ provocan daño tisular (9).

El H_2O_2 es un oxidante fuerte pero su reacción con compuestos orgánicos es baja (8). En presencia de H_2O_2 , la mieloperoxidasa liberada por los fagocitos cataliza la transformación de halidas, incluyendo cloridas, en ácido hipocloroso. Este ácido reacciona con otros metabolitos derivados de O_2^- para formar $HO\cdot$, que puede inducir toxicidad directa, incluyendo peroxidación de lípidos de membrana (8). Estudios efectuados en modelos experimentales de uveítis demostraron producción de O_2^- y H_2O_2 por fagocitos activados que infiltran la úvea y la retina (9, 14).

Por otro lado, se ha demostrado que los fagocitos activados sintetizan cantidades considerables de NO a partir de L-arginina en una reacción catalizada por la isoforma inducible de la NOS (iNOS) cuya expresión está transcripcionalmente regulada y es incrementada por la presencia de lipopolisacárido, citoquinas y H_2O_2 , entre otros (8). El NO reacciona con proteínas y el ADN celular y participa en la inducción de distintos procesos de toxicidad irreversible directamente o luego de su oxidación a peroxinitritos ($ONOO^-$) (15), el oxidante biológico más potente obtenido a partir de NO y O_2^- (11).

La úvea, aún en condiciones normales, posee una alta actividad metabólica aeróbica con consecuente producción de O_2^- y H_2O_2 . Sin embargo, diversos sistemas enzimáticos intracelulares previenen la acumulación de desechos metabólicos altamente tóxicos para el ojo (5).

La retina es una estructura particularmente susceptible al daño oxidativo debido a su alto consumo de O_2 , su alta proporción de ácidos grasos polinsaturados y su exposición directa a la luz (8). Recientemente, se ha dedicado especial atención a los ROS como factores iniciadores de la degeneración retiniana inducida por la inflamación. De hecho en uveítis experimentales se han identificado todos los productos de peroxidación lipídica (conjugados diana, malonildialdehído (MDA), hidroperóxido de ácido docosahexanoico y productos de reacción entre el MDA y el grupo amino de las proteínas) (8), así como una elevada concentración de peroxinitritos ($ONOO^-$). Los hidroperóxidos pueden inducir la infiltración de más fagocitos lo que provoca la producción de mayor cantidad de O_2^- (16).

Sistema antioxidante endógeno

Diversos sistemas antioxidantes hidrosolubles, así como enzimas con actividad antioxidante protegen al ojo del daño causado por estas especies reactivas (17). Además, diversas metaloproteínas con propiedades neutralizantes de radicales libres tales como la transferrina, la ceruloplasmina y la albúmina participan de este sistema de defensa endógeno (17). Entre los antioxidantes hidrosolubles se encuentran la vitamina C, el glutatión, el ácido úrico, la cisteína, el piruvato y la tirosina y entre los liposolubles el tocoferol y los retinoides (17). Las enzimas antioxidantes son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión transferasa, entre otras (9). Estas enzimas fueron detectadas en el epitelio y endotelio corneal, en la región apical del epitelio posterior del iris, en el epitelio ciliar interno y lenticular y en los segmentos internos de los fotorreceptores y epitelio pigmentario de la retina (RPE). La catalasa y la glutatión peroxidasa fueron también identificadas en la coroides (9, 18, 19). Un exceso de oxidantes puede producir daño a nivel de la retina, el nervio óptico, el cristalino y el segmento anterior (20, 21). Varios estudios experimentales han demostrado que la administración de enzimas antioxidantes, antioxidantes liposolubles y *scavengers* de HO \cdot contribuye a la preservación de las estructuras oculares durante la uveítis (9). Estos hallazgos sugieren que la capacidad del sistema antioxidante endógeno no es suficiente para contrarrestar situaciones de estrés oxidativo como la uveítis. Además, la distribución esencialmente intracelular de las enzimas con actividad antioxidante deja al descubierto el espacio extracelular donde resulta relevante la presencia de antioxidantes lipo e hidrosolubles (9).

ETIOLOGÍA

La uveítis felina puede ser producida por causas exógenas o endógenas (Tabla 1) (22). Si bien el avance de las técnicas diagnósticas ha permitido reducir el porcentaje de uveítis de origen idiopático, la mayoría de las uveítis no pueden diferenciarse y se clasifican como tales (2).

Los agentes infecciosos comúnmente implicados en el desarrollo de uveítis en animales expuestos a condiciones naturales son el parásito intracelular *Toxoplasma gondii*, el virus de la leucemia felina (ViLeF), el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), el virus de la peritonitis infecciosa felina (VPIF) y las micosis, dentro de las cuales se encuentran las provocadas por *Cryptococcus neoformans*,

Histoplasma capsulatum, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* y *Candida albicans* (1, 2, 6, 22, 23, 24). Asimismo, la *Bartonella henselae* (25), el herpesvirus felino 1 (HV1) (22), los hongos dematiáceos (26), la *Cuterebra* spp (27, 28), el *Mycobacterium bovis* y, ocasionalmente, el *M. tuberculosis* y el *M. avium* (29), e incluso un nematodo de la familia *Metastrongylidae* (2) se han asociado a uveítis en el gato.

De acuerdo con estudios realizados en EE.UU., la frecuencia de presentación de cada uno de los agentes implicados es muy variable. Por un lado, mediante estudios serológicos se determinó que el 74% de los gatos con uveítis anterior y/o retinocoroiditis analizados era positivos a *T. gondii*, el 13% a VIF, el 12% a ViLeF y el 6% a VPIF (24). Por el otro, en un estudio histológico de 158 globos oculares de gatos con diagnóstico histopatológico de uveítis, el 32% de los ojos analizados presentó un infiltrado linfocítico-plasmocítico focal o difuso en iris y cuerpo ciliar; el 20% neoplasias sólidas o difusas; el 19% inflamación exudativa mixta con fibrina y otras proteínas compatibles con VPIF; el 9% de los casos fueron UIC; el 2% infiltración uveal difusa de macrófagos cargados con *Histoplasma* spp; otro 2% se correspondió con *Cryptococcus neoformans* y sólo un caso fue compatible con *Toxoplasma gondii*, aunque la presencia del organismo no fue demostrada (23). En un estudio donde se analizaron los posibles agentes infecciosos implicados en la uveítis de 45 gatos, el 70% no presentó causa conocida y fueron clasificados como idiopáticos (30).

Si bien en todas ellas, excepto las UIC y las neoplásicas, no existen cambios oftalmológicos clínicos patognomónicos, particularmente en el caso en que sólo la úvea anterior está afectada (22), algunos signos ocurren más frecuentemente ante ciertas causas (2). Los precipitados queráticos en forma de "grasa de carnero" se presentan con mayor frecuencia en las uveítis por VPIF y ViLeF, y aquellas provocadas por VPIF incluyen hemorragia con células inflamatorias (2). El VIF y el ViLeF se asocian con la presencia de nódulos iridiales, de la misma manera que este último se vincula a la presencia de masas blancas a rosadas en la cámara anterior o adheridas a la porción anterior del iris (2). Los infiltrados celulares en el HV anterior ocurren más frecuentemente con VIF, así como la formación de sinequias posteriores, cataratas corticales y glaucoma en uveítis crónicas (2). En general, las uveítis por VPIF evolucionan a una panuveítis/panoftalmitis con edema corneal severo y di-

fuso, uveítis anterior marcada, vitritis, coriorretinitis y desprendimientos retinianos inflamatorios (2). Asimismo, la uveítis anterior provocada por ViLeF puede progresar a una inflamación difusa de todo el globo ocular o a una formación tumoral (2).

El *Toxoplasma gondii* es un parásito protozoario intracelular obligado de distribución mundial que produce uveítis secundaria como producto de la replicación de los taquizoitos en los tejidos oculares (31) o bien por la deposición de complejos inmunes en el tejido uveal (32) en asociación con estrés, debilidad, dosis inmunosupresoras de corticoides (33, 34), infecciones virales o enfermedades parasitarias concurrentes (6). Aunque se han descrito casos de panuveítis congénitas (31), la infección se presenta regularmente en animales mayores de 3 años de edad (23). A diferencia de lo que ocurre en humanos, en los que los casos se caracterizan por una retinocoroiditis (31, 35), en los felinos la lesión más común es la iridociclocoroiditis con máxima afectación del cuerpo ciliar (31). Los componentes celulares inflamatorios consisten en macrófagos, linfocitos y unas pocas células plasmáticas perivasculares, distribución que sugiere un modo de infección hematógeno (31). Las ma-

nifestaciones clínicas, la evidencia serológica de la infección (títulos IgM mayores a 1:256, títulos de IgG crecientes o antígeno circulante sin anticuerpos) y la respuesta al tratamiento son de utilidad para orientar el diagnóstico, que sólo puede confirmarse mediante la histopatología del material *postmortem* (22, 31). Sin embargo, se han diseñado pruebas más sensibles para identificar ADN de *T. gondii* en HA (36, 37).

El VIF, descrito por primera vez en 1987, es un lentivirus que produce un síndrome de inmunodeficiencia en gatos (38) de alta prevalencia a nivel mundial (39) y muchas veces asociado a uveítis (40). Probablemente como consecuencia del principal modo de transmisión (contacto sangre-sangre por mordeduras de animales infectados con lesiones gingivales) la enfermedad se presenta principalmente en machos mayores de 5 años (23, 24, 41). Si bien la relación entre la inflamación intraocular y la infección por VIF es aún desconocida, este virus podría causar uveítis por daño viral directo del tracto uveal, por un fenómeno inmune secundario en el ojo (42) o por permitir infecciones oportunistas (41). En este sentido, los títulos de anticuerpos para *T. gondii* son más frecuentes en gatos VIF-positivos

Tabla 1. Causas de uveítis felina
Table 1. Causes feline uveitis

Exógenas	Endógenas
Trauma	Infecciosas
Úlcera corneal	Virus de la inmunodeficiencia felina (VIF)
Heridas penetrantes	Virus de la leucemia felina (ViLeF)
	Virus de la peritonitis infecciosa felina (VPIF)
	Herpesvirus felino 1 (HVF 1)
	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	<i>Histoplasma capsulatum</i>
	<i>Coccidioides immitis</i>
	<i>Blastomyces dermatitidis</i>
	<i>Candida albicans</i>
	Hongos dematiáceos
	<i>Bartonella henselae</i>
	<i>Micobacterium</i> spp
	Parasitarias
	<i>Toxoplasma gondii</i>
	Oftalmomiasis <i>Cuterebra</i> spp
	Uveítis inducida por el cristalino (UIC)
	Idiopáticas
	Neoplásicas

que en VIF-negativos (6, 43). El VIF puede producir tres entidades clínicas distintas, que en orden de frecuencia son: uveítis anterior leve a moderada, *pars planitis* y glaucoma. Sin embargo, también se observa coriorretinitis, hemorragias y desprendimientos retinianos (6, 41). En el examen oftalmológico puede observarse un infiltrado blanco y punteado en vítreo anterior cuyos puntos coalescen y dan el aspecto típico de "banco de nieve" (6, 41), presumiblemente constituido por un infiltrado difuso linfocítico-plasmocítico (41). El diagnóstico serológico sólo tiene valor para resultados positivos y las técnicas de PCR aún dan resultados controvertidos (44).

La *VPIF* provoca una enfermedad invariablemente fatal que afecta, en general, a gatos menores de 3 años (23, 24, 45), de linajes puros y mantenidos en residencias con varios ejemplares (46). Mientras que la forma efusiva de la enfermedad consiste en colectas pleurales y/o peritoneales de un fluido rico en fibrina, la no efusiva, o seca, cursa con manifestaciones, principalmente oculares y neurológicas (45). La uveítis anterior granulomatosa, con o sin signos de enfermedad sistémica (2), consiste en exudados fibrinocelulares en la cámara anterior y precipitados queráticos en forma de "grasa de carnero", así como coriorretinitis (46, 47). Otros hallazgos relacionados con la enfermedad son hemorragia y desprendimiento retinianos y neuritis óptica (46). La inflamación puede ser bilateral, aunque no simétrica y consiste en un patrón piogranulomatoso perivascular comprendido por neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas e histiocitos en forma de *spindle* en úvea, retina y meninges del nervio óptico (6, 46). El diagnóstico de *VPIF* es muy difícilmente comprobable en animales vivos (48). Sin embargo, la combinación de un título de anticuerpos para coronavirus mayor a 1:1600, linfopenia e hipergamaglobulinemia tiene un valor predictivo en el 88,9% de los casos con sospecha de *VPIF* sistémica (22). Si bien actualmente se está desarrollando una técnica de PCR que permite determinar infección por *VPIF* (46, 49, 50), debido a la aún escasa especificidad, la biopsia del tejido afectado es el único medio diagnóstico confirmatorio de la enfermedad (46).

El *ViLeF* es un retrovirus que se transmite horizontal y verticalmente (51, 52) que tiene particular selectividad por el tejido uveal. Posiblemente la enfermedad es consecuencia de la invasión linfosarcomatosa y la anemia pronunciada (53), en este sentido el tracto uveal es un sitio común de metástasis de lin-

focitos neoplásicos diseminados por vía hematogena. Los gatos con linfosarcoma pueden presentar signos de uveítis media, incluyendo miosis, efecto Tyndall y precipitados queráticos, así como sutiles masas iridiales por infiltración de células tumorales (54). Asimismo, el glaucoma secundario es consecuencia de la obstrucción del ángulo de drenaje por estas células neoplásicas (51). La afectación ocular del *ViLeF* es controvertida. Por un lado, en un estudio realizado en gatos positivos a *ViLeF* los signos fueron predominantemente neurológicos (63%) y sólo el 11,3% presentó enfermedad ocular. La degeneración y hemorragia retinianas observadas en el 27% de los casos fueron relacionadas con la profunda anemia secundaria a *ViLeF* y sólo un gato manifestó uveítis anterior. Por el otro, el 89% de los gatos infectados experimentalmente presentaron lesiones en la retina y el humor vítreo (53). El diagnóstico se confirma por inmunofluorescencia o ELISA (53, 54). Mediante la citología del HA se evidencian cantidades variables de linfocitos y, ocasionalmente, plasmocitos y neutrófilos, aunque rara vez se observan linfocitos atípicos (2). Asimismo, los análisis histopatológicos de aspirados medulares, biopsia de nódulos linfáticos y de la misma masa intraocular pueden incluirse en el diagnóstico (2).

Uveítis micótica. Si bien las enfermedades fúngicas sistémicas son menos frecuentes en el gato que en el perro, deben ser consideradas en felinos que manifiesten síntomas oculares (6). El microorganismo, en general, ingresa por vía respiratoria y se disemina por vía hematogena (6). Las lesiones oculares pueden acompañar a la enfermedad o bien ser el único signo presente (54). De ellas, la más frecuente es la coroiditis; sin embargo a veces se presenta uveítis anterior que es secundaria a la inflamación del tracto posterior (55).

La infección con *Cryptococcus neoformans* es la más común de las micosis (6, 54, 56). Si bien los sitios más frecuentes en los que se desarrolla la enfermedad son la piel, la nariz y el sistema nervioso central (SNC) (54, 56), la coriorretinitis granulomatosa o exudativa, con hemorragia y desprendimiento de retina, puede originarse a partir de la diseminación hematogena o la invasión directa desde los senos paranasales, cavidad nasal o meninges ópticas (6, 23, 24, 57). Por medio de la vitreocentesis e identificación del organismo por citología, histopatología o aislamiento en cultivo se puede confirmar el diagnóstico (6, 58).

La coriorretinitis granulomatosa focal con desprendimiento retiniano, uveítis anterior y neuritis óptica son las lesiones oculares observadas en los animales con diseminación sistémica de células mononucleares infectadas por *Histoplasma capsulatum* desde el foco infeccioso primario (pulmones y linfonódulos relacionados) (6, 23, 59, 60, 61). El agente ha sido detectado en cortes histológicos oculares (59).

La infección por *Blastomyces dermatitidis* es mucho menos frecuente que en perros (54, 60). Genera granulomas coroidales blanco-grisáceos, en ocasiones con desprendimiento retiniano y panoftalmítis, aunque también se ha descrito la uveítis anterior granulomatosa crónica (6, 54).

Candida albicans es un hongo dimórfico que durante la fase de levadura habita la mucosa de los tractos alimentario, respiratorio superior y genital. La depresión de la inmunidad mediada por células es un factor importante en el desarrollo de inflamación piogranulomatosa de retina y cuerpo vítreo (62).

Finalmente, en EE.UU. se han detectado gatos con *Coccidioides immitis*. En un estudio retrospectivo de 48 gatos afectados, el 19% manifestó signos oculares que incluyeron desprendimiento de retina, uveítis e iritis (63).

La UIC se origina por el escape proteico producido por injurias penetrantes o fuga a través de la cápsula cristalina en los estadios avanzados de cataratas hiper maduras (1, 6). Las proteínas internas, alejadas del sistema inmune tiempo antes del nacimiento, ingresan en el HA y son expuestas al sistema inmune de la úvea, lo que promueve uveítis aguda y crónica y generalmente endoftalmítis, en general, menos intensa que en los caninos (2). El proceso se caracteriza por una inflamación anterior neutrofílica en la fase aguda y granulomatosa en la fase crónica, con rara afección del tracto posterior (23).

La uveítis idiopática se caracteriza por un infiltrado linfocítico-plasmocítico focal o difuso del iris y el cuerpo ciliar. En un estudio histopatológico, la forma difusa se presentó en gatos de mediana edad, en forma bilateral y asociada a glaucoma, mientras que la nodular se observó en gatos de edad avanzada, en forma unilateral y se asoció a glaucoma en 4 de 5 casos como consecuencia de la obliteración de la hendidura ciliar y la invasión de la red trabecular con láminas de linfocitos (23). Como la respuesta linfocítica-plasmocítica no

es inusual en gatos con enfermedad crónica, es posible que este tipo de uveítis refleje la escasa sensibilidad de las pruebas diagnósticas corrientes para VIF y toxoplasmosis (6). Esta hipótesis es avalada por el único caso sospechoso de toxoplasmosis encontrado en el estudio citado (23).

Uveítis traumática. La naturaleza altamente vascular de la úvea y el escaso desarrollo de una túnica muscular en estos vasos predispone al sangrado, generalmente en relación con procesos traumáticos originados por accidentes automovilísticos (64) o arañazos provocados durante peleas callejeras. Los signos clínicos incluyen aquellos de la uveítis anterior aguda más hifema, con cantidad variable de fibrina. Cuando las injurias romas son pequeñas, el hifema se resuelve en 7-10 días (64), pero con traumas considerables, el trauma o la uveítis anterior resultante pueden producir daño en el iris, luxación lenticular y cataratas. Los traumas penetrantes pueden afectar la córnea, el cristalino y el segmento posterior (2).

Otros. Recientemente se describió un caso de uveítis producida por *Bartonella henselae* (25), en el que se observó producción local de IgG específica. Asimismo, información reciente sugiere que el herpesvirus felino 1 (HVF 1) puede inducir inflamación intraocular (22). *Mycobacterium bovis* y, ocasionalmente, *M. tuberculosis* y *M. avium* pueden producir coroiditis granulomatosa asociada con hemorragia y desprendimiento retiniano (29). En cortes histológicos de un globo ocular de un gato con uveítis supuestamente generada por inoculación directa del agente (26) se han hallado hongos dematiáceos, mohos saprófitos que regularmente se encuentran en el suelo y material vegetal. Además, se han descrito casos de oftalmomiasis internas en gatos, dos de ellas anteriores y el agente identificado fue *Cuterebra* spp (27, 28).

En un caso de periarteritis nodosa, enfermedad rara en los gatos y caracterizada por necrosis fibrinoide de arterias medianas y pequeñas (54), se han encontrado exudados proteicos en la cámara anterior, infiltración de linfocitos y células plasmáticas del iris y los procesos ciliares, como así también focos de necrosis.

La uveítis felina también se indujo experimentalmente por inoculación de ViLeF (51), ViLeF-VSFe (virus del sarcoma felino) (65), *T. gondii* (66) y *Cryptococcus neoformans* (57), así como de VIF y VPIF (22).

COMPLICACIONES

Diversas complicaciones pueden originarse en los gatos a partir de la uveítis anterior o posterior que generalmente están relacionadas directamente con la duración y la causa de la inflamación uveal (2).

El *glaucoma* puede ser el resultado de las sinequias anteriores periféricas, el cierre del ángulo de drenaje iridocorneal y de la hendidura esclerociliar, la sinequia posterior completa con iris bombé y el desarrollo de membranas preiridiales. El estado final puede resultar en *buftalmia* o atrofia del globo ocular (*pthisis bulbis*) (2). Los gatos uveíticos también pueden desarrollar *cataratas* con sinequias posteriores múltiples (Figura 3).

Cabe destacar, que las uveítis asociadas a enfermedades sistémicas presentan peor pronóstico que las demás. De acuerdo con estudios recientes, el 50% de los casos de uveítis con enfermedad sistémica concurrente pueden desarrollar glaucoma secundario, mientras que sólo el 28% de las uveítis sin manifestaciones sistémicas de enfermedad lo padecen (2).

TRATAMIENTO

Un tratamiento apropiado de la uveítis felina es esencial para evitar la luxación lenticular, la formación de cataratas, el glaucoma, el desprendimiento de retina y la ceguera, secuelas frecuentes de la inflamación intraocular (4, 22). El tratamiento de la uveítis consiste en una terapia específica, deter-



Figura 3. Catarata hipermadura pigmentaria secundaria a uveítis asociada a VIF en un gato adulto pelocorto.

Figure 3. Hypermature and pigmentary secondary cataract in an adult shorthair cat with uveitis produced by VIF.

minado por la etiología de la inflamación y en un tratamiento inespecífico, destinado a disminuir la inflamación, el dolor y las posibles secuelas.

Al presente, los *corticoides* son la base del tratamiento de la uveítis. Estos fármacos inhiben las reacciones inmunes mediadas por células, reducen la producción de anticuerpos y estabilizan las membranas lisosomales disminuyendo la liberación de enzimas proteolíticas intracelulares (1). Entre sus efectos benéficos primarios, también se incluyen la inhibición de la quimiotaxis de leucocitos y liberación de mediadores proinflamatorios, supresión de la formación de fibroblastos e inhibición de la producción de PGs y leucotrienos (67). Los corticoides *tópicos* están indicados en el tratamiento de la uveítis anterior, incluso de aquella asociada a enfermedades infecciosas sistémicas, cuando no existe queratitis ulcerosa (6, 22). Se utilizan tanto acetato de prednisolona 1% como dexametasona 0,1% o fosfato sódico de betametasona 0,1% 3-4 veces al día (1, 4, 6). La eficacia de estos fármacos se puede incrementar aplicando preparados de corticoides de depósito en forma subconjuntival (acetonida de triamcinolona 4-20 mg) (1, 6). Los corticoides sistémicos están indicados para el tratamiento de uveítis intermedias o posteriores; en forma conjunta con los tópicos en uveítis anteriores graves; en procesos inmunomediados o cuando la ulceración corneal impide su uso en forma tópica (1, 4, 6). Inicialmente se utiliza prednisolona oral 1 mg/kg cada 12 h y la terapia se reduce en forma gradual después de 5-14 días (6). También está indicada la dexametasona 0,1-0,5 mg/kg/día por vía intramuscular (1).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) reducen la liberación de proteínas desde los vasos uveales mediada por PGs, amortiguando la cantidad de anticuerpos presentes que favorecen reacciones inmunológicas y de fibrina que genera sinequias (4, 6). Además, reducen la miosis mediada por productos de inflamación (2). Se indican cuando el uso de corticoides no es recomendable, ya sea en forma tópica, por ulceración corneal (no parecen potenciar la actividad de colagenasa (2)), o sistémica (3, 6). En forma tópica se recomienda el uso de flurbiprofeno sódico 0,03% y diclofenac sódico 0,1% (2). Con cautela se puede utilizar ácido acetilsalicílico oral en dosis total de 80 mg cada 48-72 h (6). También está indicado el uso de meglumina flunixin de 0,5 a 1 mg/kg endovenosa en la terapia inicial y por no más de 5 días (1, 2).

El ungüento de atropina al 1%, aunque sin efecto antiinflamatorio, es el fármaco de elección para el tratamiento de las inflamaciones del segmento anterior del ojo. La uveítis anterior provoca dolor como resultado de la inflamación y posterior espasmo del músculo ciliar. La atropina relaja estos músculos y alivia el dolor, mejora la actitud del paciente y permite aplicar otros medicamentos. Asimismo, reduce las posibilidades de producir sinequias al dilatar la pupila. Se administra según sea necesario hasta lograr la dilatación pupilar, con una frecuencia máxima de 4 veces al día, y luego en las cantidades requeridas para mantenerla (4). El monitoreo constante de la PIO y la turbidez del HA son los parámetros utilizados para determinar la frecuencia, dosificación y duración del tratamiento (2).

Para el tratamiento de la infección con *Toxoplasma gondii* se utiliza clindamicina (12 mg/kg cada 12 h) con o sin esteroides (22, 68, 69). La adición de corticoides incrementa la respuesta al tratamiento de 42,9 a 86,7% (2). Los casos de uveítis fúngicas deben ser tratados mediante el suministro de antifúngicos durante meses. El fluconazol (50 mg oral cada 12-24 h) es la droga de mayor penetración ocular (70). Sin embargo, por una cuestión de costos, la Criptococosis de los gatos ha sido tratada con éxito mediante el suministro de ketoconazol oral (10 mg/kg/día durante 60 días). La flucitocina (2) (250 mg cada 3,1 kg por día durante 28 días) y el itraconazol (71, 72) (10 mg/kg cada 24 h durante al menos 1 mes después de la resolución clínica) son otras alternativas. La Histoplasmosis ha sido exitosamente tratada mediante el suministro de ketoconazol (15 mg/kg/día durante meses) (59) e itraconazol (5 mg/kg cada 12 h) (73). Finalmente, mediante una combinación de doxiciclina (5 mg/kg cada 12 h) y glucocorticoides durante 21 días se resolvió una uveítis por *Bartonella henselae* (25).

En síntesis, entre las alternativas terapéuticas actuales para el tratamiento de la uveítis felina de cualquier origen, los corticoides son los fármacos más utilizados (22, 74). Sin embargo, el reconocido efecto inmunosupresor de estos compuestos puede agravar el desarrollo de la enfermedad sistémica y su uso crónico a nivel ocular podría desencadenar un glaucoma cortisónico (75, 76). Aunque muchas veces considerados inocuos, los corticoides tópicos se absorben y, aunque en menor medida, provocan las mismas alteraciones que los sistémicos sobre las funciones adrenales y la regulación de la diabetes mellitus (4). Por

otro lado, los AINEs, también indicados para el tratamiento de esta enfermedad, pueden retrasar el proceso de cicatrización o bien generar insuficiencia o necrosis papilar renal agudas, hemorragia gastrointestinal y ulceración e inhibición de la agregación plaquetaria; estas últimas exacerbadas con el uso simultáneo de corticoides (4, 6).

La injuria oxidativa como factor causal de la uveítis experimental está avalada por evidencias experimentales recientes que demuestran una considerable reducción del cuadro clínico por tratamiento con diversos antioxidantes naturales o sintéticos e inhibidores de la NOS (77, 78). Evidencias recientes indican que los carotenoides u otros antioxidantes e inhibidores de la NOS revierten la uveítis inducida por endotoxina en ratas (77, 79, 80).

PRONÓSTICO

El pronóstico de la uveítis, intrínsecamente ligado al desarrollo de un diagnóstico precoz e implementación de una terapéutica adecuada, es desalentador. En un estudio retrospectivo realizado en EE.UU., se determinó que el 56% de los gatos con uveítis idiopática y sólo el 33% de los animales que presentan uveítis asociadas a enfermedades sistémicas responden a la terapéutica. De esta forma, el 72% de los gatos que padecen uveítis culminan en ceguera o déficit visual significativo (2).

DISCUSIÓN

La uveítis es un desorden oftálmico frecuente en la población felina doméstica. Generalmente se encuentra asociada a una variedad considerable de enfermedades sistémicas y de alta prevalencia a nivel mundial, que a menudo se manifiestan únicamente como uveítis anterior y que, además de las posibles consecuencias sobre la función visual, pueden implicar un riesgo significativo para la vida del animal (1, 2, 4, 5, 6).

La asociación de esta enfermedad con diversas enfermedades oculares y sistémicas se debe a la naturaleza altamente vascular e inmunosensible de la úvea. En este sentido, también se reconoce la susceptibilidad particular de esta especie al desarrollo de la enfermedad debido a que la discontinuidad de las células endoteliales de los vasos iridiales es una condición particular de los felinos (3).

De acuerdo con estudios realizados en EE.UU., la frecuencia de presentación de cada

uno de los agentes implicados es muy variable con importantes diferencias entre los resultados de estudios serológicos (24) e histopatológicos (23). Además, si bien el avance en el desarrollo de técnicas apropiadas para la identificación de factores causales de la enfermedad ha permitido reducir el porcentaje de uveítis de origen desconocido, la mayoría de ellas aún no pueden diferenciarse y se clasifican como idiopáticas (2, 30).

Debido a sus indudables implicancias terapéuticas, la identificación de los mediadores químicos de la inflamación ocular despierta gran interés. Si bien la mayoría de los autores coinciden en señalar a las PGs como mediadores centrales para varios de los signos asociados con la enfermedad (5), es posible que los estudios realizados hasta el presente se hubieran centrado específicamente en estos autacoides y no puede descartarse la posibilidad de que otros mediadores participen en este proceso inflamatorio en forma tan o más activa. Recientemente, debido a la susceptibilidad de la retina al daño oxidativo (8), se ha comenzado a prestar especial atención a los ROS (incluyendo el H_2O_2 , el $HO\cdot$ y el $O_2\cdot^-$) (5, 11, 12, 13), así como a especies reactivas de nitrógeno (NO, y peroxinitritos, entre otros) (8, 11, 15), como factores iniciadores de la degeneración retiniana inducida por la inflamación. Evidencias experimentales recientes demuestran que el tratamiento con diversos antioxidantes naturales o sintéticos e inhibidores de la NOS (9, 77, 78, 79, 80) provoca una considerable reducción del cuadro clínico en modelos animales. Estos hallazgos podrían sugerir que en la uveítis la capacidad del sistema antioxidante endógeno no es suficiente para contrarrestar el estrés oxidativo.

Entre las alternativas terapéuticas actuales para el tratamiento de la uveítis felina de cualquier origen, los corticoides son los fármacos más utilizados (22, 74). Sin embargo, como ya se mencionara, su efecto inmunosupresor agrava el desarrollo de la enfermedad sistémica y su uso crónico a nivel ocular podría desencadenar un glaucoma cortisónico (75, 76). Asimismo, los corticoides tópicos se absorben y, aunque en menor medida, provocan alteraciones similares a las producidas luego de su administración sistémica (4). En este mismo sentido, los AINEs, también indicados para el tratamiento de esta enfermedad, pueden retrasar el proceso de cicatrización o bien provocar sus reconocidos efectos adversos a nivel renal, gastrointestinal y sobre los mecanismos de coagulación (4, 6).

En cuanto al pronóstico de la enfermedad, se carece de estudios nacionales que avalen los resultados descriptos en la bibliografía, en los que se reconoce un peor pronóstico en las uveítis asociadas a enfermedades sistémicas debido a la escasa respuesta a la terapéutica que se observa en estos casos (2).

En síntesis, las terapéuticas actualmente disponibles distan de ser satisfactorias. La alta prevalencia de la enfermedad, la falta de respuesta al tratamiento y los efectos colaterales de los fármacos de uso actual fundamentan la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas efectivas en el control de la enfermedad y sin efectos adversos sistémicos o locales que afecten la salud del animal. En este contexto, la identificación del complejo conjunto de mecanismos bioquímicos involucrados en el desarrollo de la enfermedad, que aún no han sido completamente elucidados, podría constituir una avenida fértil para el desarrollo de terapias de nueva generación. No se dispone al presente de antecedentes clínicos sobre el uso de compuestos que eviten o disminuyan el estrés oxidativo o inhiban la síntesis de NO para el tratamiento de la uveítis felina. Sobre la base del conjunto de evidencias aquí presentadas, se sugiere que la incorporación de fármacos con estas propiedades, podrían contribuir en forma significativa al desafío terapéutico que enfrentan los veterinarios frente a esta amenaza a la calidad de las funciones visuales de los felinos.

REFERENCIAS

1. Slatter D. Fundamentos de Oftalmología Veterinaria, Segunda Edición, Ed. Intermédica. Buenos Aires. (Argentina), 1992; p. 357-95
2. Glaze MB, Gelatt KN. Feline Ophthalmology. En: Gelatt KN. Veterinary Ophthalmology, Tercera Edición, Ed. Lippincott Williams Wilkins. Philadelphia (Estados Unidos), 1999; p. 1018-25
3. Gum GG, Gelatt KN, Ofri R. Physiology of the Eye. En: Gelatt KN. Veterinary Ophthalmology, Tercera Edición, Ed. Lippincott Williams Wilkins. Philadelphia (Estados Unidos), 1999; p. 151-81
4. Wilkie DA. Trastornos de la úvea. En: Kirk RW, Bonagura JD. Terapéutica veterinaria de pequeños animales XI. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid (España), 1994; p. 1233-40
5. Collins BK, Moore CP. Disease and surgery of the canine anterior uvea. En: Gelatt KN. Veterinary Ophthalmology, Tercera Edición, Ed. Lippincott Williams Wilkins. Philadelphia (Estados Unidos), 1999; p. 151-81
6. Barnett KC, Crispin SM. Oftalmología Felina Atlas & Texto, Ed. Intermédica. Buenos Aires. (Argentina), 2000; p. 118-39
7. Gray HE, Willis AM, Morgan RV. Effects of topi-

- cal administration of 1% brinzolamide on normal cat eyes. *Vet Ophthalmol* 2003; 6 (4):285-90
8. Rao N. Role of oxygen free radicals in retinal damage associated with experimental uveitis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1990; 88:797-850
 9. Rao NA, Wu GS. Free Radical Mediated Photoreceptor damage in uveitis. *Prog Retin Eye Res* 2000; 19 (1):41-68
 10. Rao NA, Patchett R, Fernandez MA, Sevanian A, Kunkel SL, Marak GE Jr. Treatment of experimental granulomatous uveitis by lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibitors. *Arch Ophthalmol* 1987; 105 (3):413-5
 11. Wu GS, Sevanian A, Rao NA. Detection of retinal lipid hydroperoxides in experimental uveitis. *Free Radic Biol Med* 1992; 12 (1):19-27
 12. Bosch-Morell F, Roma J, Puertas FJ, Marin N, Díaz-Llopis M, Romero FJ. Efficacy of the antioxidant ebselen in experimental uveitis. *Free Radic Biol Med* 1999; 27 (3-4):388-91
 13. Shiels IA, Sanderson SD, Taylor SM. Arterially perfused eye model of uveitis. *Aust Vet J* 1999; 77 (2):100-4
 14. Wu GS, Zhang J, Rao NA. Peroxynitrite and oxidative damage in experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38 (7):1333-9
 15. Yermilov V, Rubio J, Ohshima H. Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett* 1995; 376 (3):207-10
 16. Wu GS, Rao NA. Activation of NADPH oxidase by docosahexaenoic acid hydroperoxide and its inhibition by a novel retinal pigment epithelial protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40 (5):831-9
 17. Rose RC, Richer SP, Bode AM. Ocular oxidants and antioxidant protection. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217 (4):397-407
 18. Rao NA, Thaete LG, Delmage JM, Sevanian A. Superoxide dismutase in ocular structures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26 (12):1778-81
 19. Atalla LR, Sevanian A, Rao NA. Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase in ocular tissue. *Curr Eye Res* 1988, 7 (10):1023-7
 20. Guy J, Ellis EA, Mames R, Rao NA. Role of hydrogen peroxide in experimental optic neuritis. A serial quantitative ultrastructural study. *Ophthalmic Res* 1993; 25 (4):253-64
 21. Ishimoto S, Wu GS, Hayashi S, Zhang J, Rao NA. Free radical tissue damages in the anterior segment of the eye in experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37 (4):630-6
 22. Lappin MR. Feline infectious uveitis. *J Feline Med Surg* 2000; 2:159-63
 23. Peiffer RL, Wilcock BP. Histopathologic study of uveitis in cats: 139 cases (1978-1988). *J Am Vet Med Assoc* 1991; 198 (1):135-8
 24. Lappin MR, Marks A, Greene CE, Collins JK, Reif JS, Powell CC. Serologic prevalence of selected infectious diseases in cats with uveitis. *J Am Vet Med Assoc* 1992; 201 (7):1005-9
 25. Lappin MR, Black JC. *Bartonella* spp infection as a possible cause of uveitis in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 1999; 214 (8):1205-7
 26. Bernays ME, Peiffer RL Jr. Ocular infections with dematiaceous fungi in two cats and a dog. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 213 (4):507-9
 27. Johnson BW, Helper LC, Szajerski ME. Intraocular *Cuterebra* in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 1988; 193 (7):829-30
 28. Harris BP, Miller PE, Bloss JR, Pellittieri PJ. Ophthalmomyiasis interna anterior associated with *Cuterebra* spp in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216 (3):352-5
 29. Gunn-Moore DA, Jenkins PA, Lucke VM. Feline tuberculosis: a literature review and discussion of 19 cases caused by an unusual mycobacterial variant. *Vet Rec* 1996; 138 (3):53-8
 30. Davidson MG, Nasisse MP, English RV, et al. Feline anterior uveitis: a study of 53 cases. *J Am Anim Hosp Assoc* 1991; 27:77
 31. Dubey JP, Carpenter JL. Histologically confirmed clinical toxoplasmosis in cats: 100 cases (1952-1990). *J Am Vet Med Assoc* 1993; 203 (11):1556-66
 32. Dernouchamps JP, Vaerman JP, Michiels J, Masson PL. Immune complexes in the aqueous humor and serum. *Am J Ophthalmol* 1977; 84 (1):24-31
 33. Dubey JP, Frenkel JK. Immunity to feline toxoplasmosis: modification by administration of corticosteroids. *Vet Pathol* 1974; 11 (4):350-79
 34. Lappin MR, Dawe DL, Lindl PA. The effect of glucocorticoid administration on oocyst shedding serology, and cell-mediated immune responses of cats with recent or chronic toxoplasmosis. *J Am Anim Hosp Assoc* 1991; 27:625-32
 35. Dubey JP. *Toxoplasmosis of animal and man*. Boca Rton, Fla: CRC Press Inc; 1988. p. 1-220.
 36. Aouizerate F, Cazenave J, Poirier L, Verin P, Cheyrou A, Begueret J, Lagoutte F. Detection of *Toxoplasma gondii* in aqueous humor by the polymerase chain reaction. *Brit J Ophthalmol* 1993; 77 (2):107-9
 37. Burney DP, Chavkin MJ, Dow SW, Potter TA, Lappin MR. Polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* within aqueous humor of experimentally-inoculated cats. *Vet Parasitol* 1998; 79:181-6
 38. Pedersen NC, Ho EW, Brown ML, Yamamoto JK. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science* 1987; 13; 235 (4790):790-3
 39. Yamamoto JK, Hansen H, Ho EW, Morishita TY, Okuda T, Sawa TR, Nakamura RM, Pedersen NC. Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the conti-

- mental United States and Canada and possible mode of transmission. J Am Vet Med Assoc 1989; 15; 194 (2):213-20
40. Callanan JJ, Thompson H, Toth SR, O'Neil B, Lawrence CE, Willett B, Jarrett O. Clinical and pathological findings in feline immunodeficiency virus experimental infection. Vet Immunol Immunopathol 1992; 35 (1-2):3-13
41. English RV, Davidson MG, Nasisse MP, Jamieson VE, Lappin MR. Intraocular disease associated with feline immunodeficiency virus infection in cats. J Am Vet Med Assoc 1990; 196 (7):1116-9
42. Loesenbeck G, Drommer W, Egberink HF, Heider HJ. Immunohistochemical findings in eyes of cats serologically positive for feline immunodeficiency virus (FIV). Zentralbl Veterinarmed 1996; 43 (5):305-11
43. Witt CJ, Moench TR, Gittelsohn AM, Bishop BD, Childs JE. Epidemiologic observations on feline immunodeficiency virus and *Toxoplasma gondii* coinfection in cats in Baltimore, Md. J Am Vet Med Assoc 1989; 15; 194 (2):229-33
44. Bienzle D, Reggeti F, Wen X, Little S, Hobson J, Kruth S. The variability of serological and molecular diagnosis of feline immunodeficiency virus infection. Can Vet J 2004; 45 (9):753-7
45. Addie DD, Toth S, Murray GD, Jarrett O. Risk of feline infectious peritonitis in cats naturally infected with feline coronavirus. Am J Vet Res 1995; 56 (4):429-34
46. Hoskins JD. Actualización sobre la enfermedad coronaviral felina. En: August J. Consultas en Medicina Interna Felina, Tercera Edición, Ed. Intermédica. Buenos Aires (Argentina), 1999; p. 43-9
47. Andrew SE. Feline infectious peritonitis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2000; 30 (5):987-1000
48. Sparkes AH, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Feline infectious peritonitis: a review of clinicopathological changes in 65 cases, and a critical assessment of their diagnostic value. Vet Rec 1991; 7; 129 (10):209-12
49. Addie DD, Jarrett O. Use of a reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. Vet Rec 2001; 148 (21):649-53
50. Herrewegh AAPM, De Groot RJ, Cepica A, Egberink HF, Horzinek MC, Rottier PJM. Detection of feline coronavirus RNA in feces, tissues, and body fluids of naturally infected cats by reverse transcriptase PCR. J Clin Microbiol 1995; 33 (3):684-9
51. Shelton GH, McKim KD, Cooley PL, Dice PF, Russell RG, Grant CK. Feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infections in a cat with lymphoma. J Am Vet Med Assoc 1989; 194 (2):249-52
52. Albert DM, Lahav M, Colby ED, Shaddock JA, Sang DN. Retinal neoplasia and dysplasia. I. Induction by feline leukemia virus. Invest Ophthalmol Vis Sci 1977; 16 (4):325-37
53. Brightman II AH, Ogilvie GK, Tompkins M. Ocular disease in FeLV-positive cats: 11 cases (1981-1986). J Am Vet Med Assoc 1991; 198 (6):1049-51
54. Stiles J. Ocular Manifestations of Systemic Disease: The cat. En: Gelatt KN. Veterinary Ophthalmology, Tercera Edición, Ed. Lippincott Williams Wilkins. Philadelphia (Estados Unidos), 1999; p. 1448-73
55. Gionfriddo JR. Feline systemic fungal infections. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2000; 30 (5):1029-50
56. Gerds-Grogan S, Dayrell-Hart B. Feline cryptococcosis: a retrospective evaluation. J Am Anim Hosp Assoc 1997; 33 (2):118-22
57. Blouin P, Cello RM. Experimental ocular cryptococcosis. Preliminary studies in cats and mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 1980; 19 (1):21-30
58. Flatland B, Greene RT, Lappin MR. Clinical and serologic evaluation of cats with cryptococcosis. J Am Vet Med Assoc 1996; 209 (6):1110-3
59. Clinkenbeard KD, Cowell RL, Tyler RD. Disseminated histoplasmosis in cats: 12 cases (1981-1986). J Am Vet Med Assoc 1987; 190 (11):1445-8
60. Percy DH. Feline histoplasmosis with ocular involvement. Vet Pathol 1981; 18 (2):163-9
61. Gwin RM, Makley TA Jr., Wyman M, Werling K. Multifocal ocular histoplasmosis in a dog and cat. J Am Vet Med Assoc 1980; 176 (7):638-42
62. Gerding PA Jr., Morton LD, Dye JA. Ocular and disseminated candidiasis in an immunosuppressed cat. J Am Vet Med Assoc 1994; 204 (10):1635-8
63. Greene RT, Troy GC. Coccidioidomycosis in 48 cats: a retrospective study (1984-1993) J Vet Int Med 1995; 9 (2):86-91
64. Bistner S, Shaw D, Riis RC. Diseases of the uveal tract (Parte III). En: Ophthalmology in Small Animal Practice. Veterinary Learning System Schering. (Estados Unidos); p. 177-85
65. Lubin JR, Albert DM, Essex M, de Noronha F, Riis R. Experimental anterior uveitis after subcutaneous injection of feline sarcoma virus. Invest Ophthalmol Vis Sci 1983; 24 (8):1055-62
66. Davidson MG, Lappin MR, English RV, Tompkins MB. A feline model of ocular toxoplasmosis. Invest Ophthalmol Vis Sci 1993; 34 (13):3653-60
67. Chavkin MJ, Severin GA. Uveítis felina. En: Bonagura JD. Terapéutica veterinaria de pequeños animales XII, Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. Philadelphia (Estados Unidos), 1995; p. 1352-6
68. Lappin MR, Greene CE, Winston S, Toll SL, Epstein ME. Clinical feline toxoplasmosis. Serologic diagnosis and therapeutic management of 15 cases. J Vet Int Med / Am Coll Vet Int Med 1989; 3 (3):139-43

69. Chavkin MJ, Lappin MR, Powell CC, Cooper CM, Muñana KR, Howard LH. *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in the aqueous humor of cats with toxoplasmosis. *Am J Vet Res* 1994; 55 (9):1244-9
70. Malik R, Wigney DI, Muir DB, Gregory DJ, Love DN. Cryptococcosis in cats: clinical and mycological assessment of 29 cases and evaluation of treatment using orally administered fluconazole. *J Med Vet Micol* 1992; 30 (2):133-44
71. Medleau L, Greene CE, Rakich PM. Evaluation of ketoconazole and itraconazole for treatment of disseminated cryptococcosis in cats. *Am J Vet Res* 1990; 51 (9):1454-8
72. Medleau L, Jacobs GJ, Marks MA. Itraconazole for the treatment of cryptococcosis in cats. *J Vet Int Med* 1995; 9 (1):39-42
73. Hodges RD, Legendre AM, Adams LG, Willard MD, Pitts RP, Monce K, Needels CC, Ward H. Itraconazole for the treatment of histoplasmosis in cats. *J Vet Int Med* 1994; 8 (6):409-13
74. Mancianti F, Giannelli C, Bendinelli M, Poli A. Mycological findings in feline immunodeficiency virus-infected cats. *J Med Vet Mycol* 1992; 30 (3):257-9
75. Zhan GL, Miranda OC, Bito LZ. Steroid glaucoma: corticosteroid-induced ocular hypertension in cats. *Exp Eye Res* 1992; 54 (2):211-8
76. Bhattacharjee P, Paterson CA, Spellman JM, Graff G, Yanni JM. Pharmacological validation of a feline model of steroid-induced ocular hypertension. *Arch Ophthalmol* 1999; 117 (3):361-4
77. Ohgami K, Shiratori K, Kotake S, Nishida T, Mizuki N, Yazawa K, Ohno S. Effects of Astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:2694-701
78. Koch FH, Augustin AJ, Grus FH, Spitznas M. Effects of different antioxidants on lens-induced uveitis. *Ger J Ophthalmol* 1996; 5 (4):185-8
79. Kamata K, Inazu M, Takeda H, Goto H, Matsumiya T, Usui M. Effect of a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor on intraocular nitric oxide production in endotoxin-induced uveitis rabbits: *in vivo* intraocular microdialysis study. *Pharmacol Res* 2003; 47 (6):485-91
80. Ohta K, Nakayama K, Kurokawa T, Kikuchi T, Yoshimura N. Inhibitory effects of pyrrolidine dithiocarbamate on endotoxin-induced uveitis in Lewis rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:744-50.

LA TEORÍA DEL PRIÓN

CL Pidone

Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de Rosario

Resumen: *Las encefalitis espongiformes transmisibles son un conjunto de enfermedades que afectan al sistema nervioso central de los animales y el hombre. Los agentes causales se denominan priones y tienen características muy particulares. Sin embargo, la teoría del prión no es la única teoría que describe y explica el origen de estas enfermedades. En este trabajo se describen las diferentes teorías y se ensaya un análisis epistemológico de las mismas.*

Palabras clave: prión, teorías, encefalitis espongiformes transmisibles.

PRION THEORY

Abstract: *Transmissible spongiform encephalopathies are a group of diseases that affect the central nervous system of animals and humans. The causal agents are named priones which have particular characteristics. However, the prion hypothesis is not the only theory that describes and explains the origin of these diseases. In this review the different theories are described and an epistemologic analysis of the same is made.*

Key words: prion, theories, transmissible spongiform encephalopathies.

Fecha de recepción: 03/06/05

Fecha de aprobación: 23/08/05

Dirección para correspondencia: Méd. Vet. MSc. Claudio Luis Pidone. Avda. Ovidio Lagos y Ruta 33
(2170) Casilda. Santa Fe.

E-mail: cpidone@fveter.unr.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Ya a mediados del siglo XX se describe al "prión", proteína infecciosa, como agente causal de las llamadas "encefalitis espongiformes transmisibles" (EET). Y aún hoy es la teoría más aceptada, a pesar de que existen otras y que contradice al dogma central de la biología, que dice que si una partícula es infecciosa debe contener un ácido nucleico (es decir, información genética). Por ello, esta teoría fue tan difícil de aceptar.

La encefalopatía espongiforme bovina (EEB) o "enfermedad de la vaca loca", el scrapie de la oveja y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), en los humanos, son algunos ejemplos de enfermedades causadas por priones. Las llamadas encefalitis espongiformes transmisibles no estaban descritas en el bovino. El scrapie, en cambio, se conoce desde hace más de 200 años, y los ingleses tomaban medidas para controlarlo sin conocer su verdadera etiología.

¿Qué son los priones? Los priones son pequeñas partículas infecciosas de naturaleza proteica que dan lugar a procesos nerviosos degenerativos conocidos como encefalopatías espongiformes transmisibles.

Esta hipótesis, que alude a una «proteína» como única causante de la enfermedad, es una hipótesis polémica que describe qué son y cómo se reproducen los priones.

El prión o proteína PrP^{Sc} proviene de la proteína PrP celular (PrP^C), una proteína normal de las membranas neuronales cuya función exacta no está demostrada. La enfermedad se produce cuando la PrP^{Sc} se acumula en el interior de las células nerviosas, apareciendo entonces lesiones degenerativas con características espongiformes. La proteína normal posee una configuración globular y por una inducción directa se obtendría la PrP^{Sc}, de configuración abierta. Parece ser que el cambio de conformación se debe a una simple modificación covalente. Ambas proteínas son codificadas por el mismo gen y poseen idéntica secuencia de aminoácidos. Sin embargo, su conformación tridimensional es distinta, en clara contradicción con el enunciado del Dogma Central de la Biología de J. Monod: «La secuencia de aminoácidos determina de manera unívoca la estructura terciaria de las cadenas polipeptídicas» (1).

Algunas encefalopatías causadas por priones se presentan de forma esporádica, o como un trastorno hereditario. Sin embargo,

otras son enfermedades transmisibles, generalmente entre individuos de la misma especie, y ocasionalmente también entre distintas especies.

La posibilidad de que esta enfermedad haya saltado la barrera interespecie, desde una especie de rumiante (oveja) a otra (vaca), deja abierta la posibilidad de que después pueda pasar al hombre, lo que la convierte en un problema de salud pública.

Pero... ¿cómo puede convertirse en infecciosa una proteína natural? ¿Cómo se explica que dentro de una misma especie pueda presentarse bajo tantas variantes? Las múltiples preguntas que permanecen sin respuesta abogan en favor de la existencia de un agente patógeno asociado. Pero éste todavía está por descubrirse.

Este trabajo no pretende realizar una revisión de todo lo relacionado a las EET. De hecho, casi no se discuten temas tan importantes como la epizootiología, la sintomatología, el diagnóstico o el control de estas enfermedades. En realidad, el objetivo de esta investigación se centró en analizar las distintas teorías que explican el origen de estas enfermedades, exponiendo sus argumentos y remarcando sus puntos a favor y en contra. Y ensayar un análisis más amplio que abarca al conocimiento científico en sí mismo.

TEORÍAS

Teoría viral

Fue la primer hipótesis en aparecer. Algunos autores consideran que los verdaderos agentes causantes de las EET serían virus. Los primeros estudiosos del tema comprobaron cómo el agente infeccioso obtenido de cerebros de ovejas muertas por scrapie o "prurito lumbar" pasaba a través de filtros de un tamaño parecido al de los virus, pero que no dejaban pasar a las bacterias. Este hecho hizo pensar que los agentes causales de estas enfermedades eran, efectivamente, virus. Y dado el largo período de incubación que presentaban todas las EET, se los llamó «virus lentos».

Además, tenían una propiedad que los alejaba de los virus convencionales: la gran resistencia de estos nuevos agentes a ser inactivados por tratamientos físicos como el calor y la radiación ultravioleta, que normalmente inactivan a los virus. Por eso, se los denominó «Virus no convencionales» (2,3).

Sin embargo, la presencia del supuesto virus nunca fue demostrada. Los partidarios

de esta teoría sostienen que el virus es tan pequeño que es muy difícil de aislar. Algunos autores sostienen que la PrP sería un receptor viral o el producto de la replicación vírica. Asimismo, existen indicios de que determinados virus pueden resistir más de lo que se creía a la acción de la radiación ultravioleta y otras medidas físicas.

La característica de los priones de presentar distintas «cepas», cada una de ellas con diferentes propiedades (período de incubación, susceptibilidad de uno u otro animal de laboratorio, tropismo por determinada zona del cerebro), podría explicarse fácilmente mediante la teoría viral, pues la aparición de distintas cepas es una característica típica de los virus.

Para algunos autores, el hecho de que no se haya aislado aún un virus no invalida la hipótesis de su existencia, y sostienen que las partículas víricas pueden, en determinadas ocasiones, «escondarse» dentro de las células y estar protegidas contra el sistema inmunitario y defensivo del organismo huésped.

En cambio, tal y como afirma Prusiner, un hecho que iría en contra de la existencia de un virus es la ausencia total de respuesta inflamatoria celular en los tejidos afectados (4).

Hoy en día, como veremos más adelante, la teoría del prión es la más aceptada. Sin embargo, como la hipótesis del prión no ha proporcionado respuestas convincentes a muchas cuestiones básicas, diversos investigadores retomaron la hipótesis del virus lento. Así, para L. Manuelidis, por ejemplo, el argumento de que debe descartarse que el agente infeccioso sea un virus, debido a su insólita resistencia a las radiaciones ionizantes y ultravioletas, no es válido. De hecho, existen virus conocidos que disponen de un sistema de reparación del material genético que les permite resistir niveles de radiación similares. La falta de respuesta inmune también puede ser justificada, ya que existen virus lentos convencionales que, como ya se mencionó, escapan al sistema inmune instalándose en el interior de las células.

La hipótesis vírica de Manuelidis no implica que PrP no desempeñe un papel esencial en estas enfermedades. Sin embargo, en este caso se le atribuyen funciones distintas que en la hipótesis del prión, defendida por Prusiner y sus colaboradores.

Manuelidis hace especial hincapié en varias características de los agentes infecciosos, a saber:

- La existencia de distintas cepas
- Su multiplicación exponencial
- Su tiempo de latencia prolongado
- La infección del sistema mononuclear-fagocítico.

Para los partidarios de la hipótesis vírica, la epidemia de EEB constituyó una prueba a favor: al quedar sobradamente demostrada la transmisión por vía oral, cabe preguntarse cómo resiste un agente puramente proteico la acidez y el ataque de las enzimas en el aparato digestivo. En cambio, muchos virus sí son capaces de sobrevivir a estas condiciones. Manuelidis sugiere que, como el virus de la polio, el agente infeccioso es transportado por los glóbulos blancos desde el intestino delgado hasta el bazo, en donde puede permanecer latente durante 5 a 20 años. Este razonamiento no es válido para un agente de naturaleza puramente proteica.

Ante la dificultad de aislar partículas víricas, Manuelidis argumenta que una partícula provista de un ácido nucleico y proteínas de protección puede no ser visible. Aproximadamente un año después, el equipo de Manuelidis obtuvo un gel de electroforesis con bandas que revelaban la existencia de ARN en extractos cerebrales de hámsters con CJD. Las bandas no pudieron localizarse ni en cerebros no infectados ni en las librerías genómicas, por lo que fueron consideradas probables secuencias víricas (5).

Otros autores se preguntan: ¿Un virus similar al Parvovirus B19 podría transmitir la encefalopatía espongiiforme?.

Ellos se basan en la hipótesis de que un virus podría inducir a la polimerización de una proteína normal o mutante y esto ya estaría demostrado en el Parvovirus B19 y en las células falciformes (6).

La teoría viral, en definitiva, propone la existencia de una pequeña cantidad de ácidos nucleicos y una proteína, que habría de ser la PrP^{Sc}; pero el papel del virus sería primordial.

Teoría del virino, Teoría de las Moléculas Mixtas (Holopriones) o Teoría unificada

Esta hipótesis postula que el agente causal de las enfermedades espongiiformes transmisibles podría ser una molécula quimérica,

constituida por una proteína codificada por el hospedador y un ácido nucleico, no codificante, propio del agente infeccioso. De esta forma, el ácido nucleico estaría protegido y camuflado por la proteína del huésped (2, 3).

C. Weissmann, en 1991, es quien propuso esta teoría, la cual sugiere que el agente infeccioso estaría compuesto por dos componentes. Uno de los componentes sería la proteína PrP^{Sc} (o "apoprión"), capaz de causar enfermedades transmisibles incluso en ausencia de ácidos nucleicos. El otro componente (o "coprión") es quien tendría las propiedades fenotípicas que definen el linaje del agente infeccioso (u "holoprión"). Esta teoría admite que el ácido nucleico puede encontrarse también como un constituyente normal en las células, siendo reclutado por el apoprión, para ser replicado por las enzimas celulares, bajo estímulo de la PrP^{Sc}. La presencia de PrP^{Sc} sería indispensable para la replicación del ARN. Y se ha propuesto que el coprión es un ácido nucleico (ADN o ARN), por ser transmisible y mutable.

Weissmann sugirió que los ácidos nucleicos que constituyen copriones potenciales están normalmente asociados a PrP^{Sc}, pero que también pueden estar presentes de manera independiente en las células de individuos no infectados. Esta hipótesis implica que los copriones no son esenciales para la patogénesis ni la propagación.

Según el modelo del holoprión, PrP^{Sc} sería capaz de propagarse por la conversión de PrP^C (o de precursores formados a partir de PrP^C) en copias de sí misma, mediante modificaciones covalentes o cambios conformacionales mediados por PrP^{Sc} o por el holoprión. Una vez que el holoprión ha penetrado en una célula, su coprión puede ser replicado por polimerasas celulares, proceso estimulado por la presencia de PrP^{Sc}. El nivel de holopriones en el citoplasma crece a medida que las PrP^{Sc} de nueva formación se van uniendo a los copriones sintetizados por las polimerasas.

En la segunda parte de su modelo de propagación, Weissmann intenta explicar por qué las preparaciones del agente infeccioso son resistentes a nucleasas y a radiaciones. Weissmann afirma que el carácter infeccioso y patogénico del holoprión radica en la proteína PrP^{Sc}, de acuerdo con la propuesta de Prusiner y sus colaboradores. Es decir, la destrucción del coprión no elimina el efecto infeccioso de un extracto de tejido contaminado. Si una molécula de PrP^{Sc} que ha perdido

su coprión original penetra en una célula, puede (pero no necesariamente) reclutar un ácido nucleico que le sirva como coprión. El holoprión resultante posee propiedades fenotípicas que difieren de las del holoprión original.

En 1994, Weissmann publica en *Science* una actualización de su modelo. En esta ocasión, sugiere que en las células neuronales normales, PrP^C es transportada hasta la superficie celular, de donde es endocitada y probablemente reciclada. Por infección de PrP^{Sc}, las PrP^C son convertidas en PrP^{Sc} en la superficie celular o en el interior de las vesículas de endocitosis. La gran estabilidad de PrP^{Sc} se presenta como el determinante de su acúmulo en la célula (7).

Quienes defienden la teoría del virino, sostienen que el ácido nucleico sería demasiado pequeño para codificar la proteína, que es un componente necesario del agente infeccioso. Y que esta proteína necesaria para proteger al genoma estaría codificada por el propio huésped. La falta de respuesta inmunológica a la infección se explicaría sencillamente por la ausencia de antígenos extraños (5).

Taxonómicamente hablando, los virinos se situarían entre los virus convencionales y los viroides.

El Nemavirus

En relación con estas dos teorías, algunos autores afirman que ya estaría demostrado que el agente causal es un virus y que contiene un genoma de ADN. Según éstos, con el microscopio electrónico se pueden observar dos estructuras morfológicas bien definidas: fibrillas asociadas al Scrapie (SAF) y partículas tubulofilamentosas semejantes a virus que fueron denominadas «Nemavirus» (NVP). Estas partículas poseerían una estructura inusual, no observada en otros virus, constituida por tres capas: una externa proteica, una intermedia de ssADN, y una más interna, también proteica, de PrP/SAF.

Siempre según estos autores, PrP^{Sc} ni es el agente ni es parte de él, y sostienen que existiría otra proteína, codificada por el ADN viral, necesaria para la conversión de PrP^C en PrP^{Sc} (3, 8).

TEORÍA DEL PRIÓN O DE LAS PARTÍCULAS PROTEICAS

En 1982, el neurólogo y bioquímico estadounidense Stanley Prusiner causó una ver-

dadera revolución al formular la hipótesis del prión (9), por dos motivos fundamentales:

1. Contradice el dogma fundamental de la biología molecular, constituido por la tríada ADN-ARN-proteína. Es decir: va en contra de la afirmación de que toda información genética sigue esa secuencia: desde el ADN hacia el ARN y luego hacia las proteínas.

2. También va en contra del dogma de que toda enfermedad infecciosa transmisible está producida por agentes que requieren material genético (ADN o ARN) para su replicación.

El equipo de Prusiner consiguió aislar extractos puros del agente infeccioso a partir de cerebros de hámster. Entonces, observaron que los métodos que degradan ácidos nucleicos no reducen el nivel infeccioso de los extractos, y concluyeron que tanto ADN como ARN estaban ausentes.

En vista de los resultados, Prusiner (nacido en 1942) (10) introdujo el término prión ("Proteinaceous infectious particle"), para diferenciar al nuevo agente infeccioso de otros agentes patógenos como virus, viroides, bacterias, hongos o parásitos. Los priones fueron definidos como partículas proteicas carentes de ácidos nucleicos (11).

Sorprendentemente, el gen codificante de esta proteína fue finalmente hallado en el lugar que los partidarios de la teoría del prión menos esperaban: en el genoma del hospedador. Pero, sorprendentemente, se descubrió que la proteína PrP presente en los organismos sanos es proteasa-sensible, mientras que la proteína PrP de los organismos afectados por la enfermedad es proteasa-resistente (5, 12).

Hoy, la idea iconoclasta de una proteína infecciosa se ha convertido casi en un dogma (1).

Hay tres rasgos principales en esta teoría. El primero es que el componente activo en los priones es una proteína anormal llamada proteína del prión (en forma abreviada, PrP). Las células animales normales tienen una forma de PrP que se llama PrP celular (en forma abreviada, PrP^C). Los animales infectados con priones tienen una PrP anormal. En el scrapie, la PrP anormal se denomina PrP^{Sc}.

La propia proteína anormal dirige la conversión de la proteína normal del huésped a la forma anormal. En otras palabras, PrP^{Sc} convierte PrP^C en PrP^{Sc}.

J.S. Griffith propuso esta teoría en 1967 para explicar cómo los priones podían reproducirse si sólo eran proteína y no tenían ácido nucleico. Él hizo esto quince años antes del descubrimiento de las PrP^{Sc} y PrP^C. Muchos, en ese momento, han llamado herética a esa teoría, porque describía la replicación de un agente patógeno sin un genoma de ácido nucleico (y los genes son ácidos nucleicos, y los ácidos nucleicos son quienes almacenan y transmiten la información genética en todos los organismos conocidos) (13).

La idea de que la estructura de una proteína puede ser inducida por la de otra proteína recuerda lo que los inmunólogos imaginaban a principios de la década del 40: se suponía que la penetración de un antígeno «moldaba» al anticuerpo correspondiente. Una hipótesis absolutamente lógica para explicar la adaptación exacta de la respuesta inmunitaria a una multiplicidad de antígenos. Finalmente, esta hipótesis demostró ser falsa, ya que la respuesta inmune está inducida por la expresión clonal de un anticuerpo ya presente en el repertorio.

La hipótesis del prión, entonces, permanece polémica porque rompe con los nuevos conceptos. Aquellos que han trabajado en este campo bajo otros paradigmas (como las hipótesis del virus o del virino) son renuentes a aceptar esta nueva teoría. Sin embargo, científicos de otros campos son más receptivos a aceptarla, y así ésta ha ganado terreno en los círculos científicos. Esta hipótesis explica mejor todas las observaciones sobre estos agentes y las enfermedades que ellos causan.

Según la teoría, a partir de una sola molécula infectante se inicia una reacción en cadena o de tipo «efecto dominó», que da lugar a un crecimiento exponencial de la cantidad de partículas de PrP^{Sc}.

Este proceso se asemeja a la proliferación de bacterias o virus; sin embargo, no es debido a que el prión se reproduzca, sino a la conversión de PrP en PrP^{Sc}, catalizada por esta última partícula (1).

En síntesis, la hipótesis del prión propone que PrP^C, espontáneamente o por contacto con PrP^{Sc}, sufre un cambio de conformación que le confiere resistencia a los procesos degradativos normales de la célula, razón por la cual se acumula en los tejidos del huésped. Este cambio conformacional requiere la intervención de una proteína del huésped, denominada "proteína X" (2, 9, 11).

Principales datos que apoyan la etiología proteica:

- PrP^{Sc} no está presente en cerebros sanos, y sí en los de animales enfermos.
- Los procesos que modifican o destruyen ácidos nucleicos no tienen efectos sobre la infectividad de los priones.
- Anticuerpos frente a PrP neutralizan la infectividad (éstos no se producen normalmente, al no existir respuesta inflamatoria).
- Cambios en la secuencia de aminoácidos de la PrP se vinculan a cambios en el período de incubación de la enfermedad.
- Mutaciones en el gen que codifica en humanos la síntesis de PrP se relacionan con el desarrollo de distintas encefalopatías espongiiformes.
- Las placas amiloideas con PrP^{Sc} son específicas de las encefalopatías espongiiformes transmisibles.
- Cultivos celulares infectados con PrP^{Sc}, producen PrP^{Sc}.
- PrP^{Sc} se sintetiza más lentamente que PrP^C, y se acumula principalmente en el interior celular, o extracelularmente en forma de placas amiloideas (1).

Por el otro lado, el principal problema de la teoría del prión es explicar cómo las deformaciones de un sólo tipo de molécula puede dar origen a cerca de 20 cepas diferentes de scrapie (14).

Aunque hay muchas evidencias de la validez de la hipótesis del prión, no existe aún una prueba de que la actividad infecciosa se produzca solamente por una proteína. El experimento ideal consistiría en lograr que una proteína pura, preferiblemente recombinante, se plegara a la forma resistente *in vitro*, y que esta proteína resistente originara nueva proteína *in vivo* (9).

La teoría viral (sea un virus aún desconocido o el Nemavirus propuesto por H. Narang) permite definir a las proteínas priónicas como productos de la enfermedad, y no como la causa de ésta, tal como lo propone Prusiner (4).

TEORÍA CRISTALINA

Esta teoría intenta explicar cómo se multiplican los priones, y postula que, al ser PrP^C una proteína altamente hidrofóbica, podría en un momento dado cambiar de fase para formar un cristal PrP^{Sc} infeccioso, que sería responsable de la resistencia a la degradación enzimática. Este cristal actuaría a modo de núcleo de germen o núcleo al que se incorporarían nuevas moléculas idénticas.

El cristal podría romperse, quedándose dentro o fuera de la célula, y dando origen a nuevos núcleos de crecimiento, lo que explicaría la ampliación de PrP^{Sc} sin necesidad de ácidos nucleicos (15).

TEORÍA DE LA INTOXICACIÓN POR ORGANOFOSFORADOS

Mark Purdey, un granjero ecológico de Somerset, fue quien sospechó que la EEB tenía sus orígenes en una intoxicación con un antiparasitario organofosforado. Se trata de un insecticida que se rocía sobre la espalda del animal a lo largo de la columna vertebral y que se absorbe a través de la piel.

Purdey empezó a investigar su teoría con mayor insistencia al observar la total similitud de síntomas que existe entre la EEB y la intoxicación crónica por organofosforados. Esta teoría sostiene que los priones normales están diseñados por el organismo para protegerle de los ataques oxidativos de ciertas sustancias químicas que han sido activadas por agentes perniciosos, como la luz ultravioleta. Y considera que si los priones son expuestos a poco cobre y mucho manganeso, se distorsionan y pierden su función.

Purdey sostiene que el organofosforado, al ser aplicado sobre la columna vertebral del animal, absorberse a través de la piel y pasar al interior del organismo, retiene y secuestra el cobre. Luego, sería la alimentación con suplementos de harinas animales en las que intervienen los restos de gallinas alimentadas con altas dosis de manganeso (para aumentar su producción de huevos) lo que habría hecho el resto.

Desde un principio, sus investigaciones han sido muy criticadas (16, 17).

POSTULADOS DE KOCH

En el siglo XIX, el bacteriólogo alemán Robert Koch (1843-1910) (10), enunció una serie de condiciones que un agente infeccioso debía cumplir para ser considerado "causa" de una determinada enfermedad. Estos enunciados se conocen como "Postulados de Koch" y han servido como guía para el estudio de las enfermedades transmisibles.

Los enunciados de los postulados de Koch son:

- El agente se debe encontrar siempre en caso de enfermedad
- El agente puede ser aislado en medios de cultivo artificiales
- La enfermedad puede ser reproducida

en un animal de laboratorio empleando un cultivo puro

- El agente puede ser aislado, en cultivo puro, a partir de un animal de laboratorio infectado experimentalmente.

A través de los años, estos postulados mostraron tener serios inconvenientes para explicar la génesis de muchísimas enfermedades infecciosas, fundamentalmente virales (18).

Además, los priones son tan pequeños que aún no han podido visualizarse, ni siquiera con el microscopio electrónico, que permite visualizar a los virus más pequeños (la microscopía electrónica revela los acúmulos de proteína fibrilar característicos de estas enfermedades, pero no al agente en sí mismo) (13).

De hecho, las EET no satisfacen los postulados de Koch, fundamentalmente porque los agentes no pueden ser aislados en cultivo puro.

Por ello, y dado que estas infecciones imponían un modelo diferente, Johnson y Gillis propusieron tres nuevos criterios para poder incluir también a estas nuevas enfermedades:

- La enfermedad debe transmitirse experimentalmente a animales o recuperarse el agente en cultivo celular

- Debe lograrse la transmisión del proceso clinicopatológico utilizando material filtrado o diluciones seriadas para lograr la replicación del agente, o demostrarse la recuperación del agente a partir de tejido enfermo y/ o en células apropiadas sin previas lesiones, ya sea por microscopía electrónica, inmunofluorescencia o por otros métodos

- Deben hacerse estudios paralelos con tejidos normales y enfermos para asegurarse que el supuesto agente no es ubicuo o simplemente un contaminante (18).

ANÁLISIS EPISTEMOLÓGICO DE LAS TEORÍAS

Una teoría es una red: cada nudo es un término, cada hilo corresponde a una hipótesis o definición. Debajo de esa red, están las observaciones. Las cuerdas son los enunciados teóricos mixtos o reglas de correspondencia.

En el razonamiento científico imperante en el siglo XVII, las teorías debían ser confrontadas y apoyadas por los hechos. Hoy día sabemos que no es posible validar una teoría a partir de un número finito de hechos, por

más favorables que estos parezcan. Una contrastación con resultados favorables no establece una hipótesis de manera concluyente, sino que se limita a proporcionarle un mayor o menor grado de apoyo (19).

Todas las hipótesis enunciadas en este trabajo relatan hechos que "las sostienen". Incluso, un mismo hecho argumenta a favor de más de una teoría. Sin embargo, esto no alcanzaría para darles el estatus de "teoría científica".

La gente asume a menudo que los científicos se preocupan en "demostrar" las hipótesis o teorías. Esta asunción es incorrecta, porque las hipótesis nunca pueden demostrarse; básicamente, las teorías sólo pueden refutarse. Una hipótesis que falla a una o más pruebas puede considerarse refutada y ser desechada. Si, en cambio, resiste los intentos de refutación, nos estaremos acercando a considerarla, momentáneamente, como "verdadera".

Una hipótesis es válida con tal de que pueda explicar la conducta del sistema que describe, pero siempre es posible que tenga que ser revisada o desechada en el futuro, en base a nuevos descubrimientos.

Por ejemplo, la teoría viral fue la primera que pretendió explicar el origen de las enfermedades espongiformes degenerativas. Fue, tal vez, la que se formuló con menor apoyo de observaciones científicas, basada en la red de conocimientos con la que se contaba en ese entonces. Con el avance de las investigaciones, debió ser revisada, porque, por ejemplo, el agente en estudio resistía métodos de inactivación que los virus no suelen resistir.

Quien sostenía que una teoría era científica sólo si podíamos proponer una observación que pudiera "falsearla" fue el filósofo austriaco Karl Popper (1902-1994) (10). Para él, lo importante era lograr "refutar" una teoría. Sin embargo, una teoría no suele ser abandonada ante el primer hecho que la contradiga. Es más, se suelen inventar algunas hipótesis de rescate para explicar lo que entonces llaman "anomalía".

Entonces... ¿Qué pasa cuando aparece un caso que la contradice?

Para Popper, la teoría se cae (no es "universal"). Él afirmaba que una teoría que no es refutable por ningún suceso concebible no es científica. La irrefutabilidad no es, decía, una virtud de una teoría, sino un vicio.

Las teorías no se transmiten como dogmas, sino más bien con el estímulo a discutir las y mejorarlas. Una actitud dogmática se halla claramente determinada a verificar nuestras leyes y esquemas; en cambio, una actitud crítica (característica de la ciencia) es una disposición a cambiarlas, a someterlas a prueba, a refutarlas si fuera posible (20, 21).

Hoy en día, sin embargo, una teoría soporta uno o dos casos en contra. En este sentido, algunos autores dicen que una teoría se “rectifica”, es decir, se adecúa para incluir esos casos que originalmente la contradicen (los esquemas se reacomodan a los datos).

En el caso de las teorías que estamos estudiando, todas presentan serias anomalías que tienen sus teorías complementarias que las explican. Por ejemplo, la teoría viral presenta anomalías que parecen insalvables, como la extraordinaria resistencia del agente causal. Sin embargo, sus impulsores, entonces, hablan de sistemas de reparación genética no demostrados que mantendrían “viva” la teoría.

En este sentido, a medida que las investigaciones en torno a las EET avanzaban, las observaciones registradas por los científicos no eran del todo coincidentes con lo hasta ese entonces conocido. Entonces, si uno tiende a aceptar lo que es racional, compatible con un sistema de creencias... ¿Qué pasa cuando aparece una nueva percepción?

Surge, como dice el filósofo estadounidense Thomas Kuhn (1922-1997) (10), una teoría “revolucionaria”, que derriba conceptos y paradigmas establecidos previamente. Ponen en juego descubrimientos que no pueden acomodarse dentro de los conceptos que eran hasta entonces habituales (22,23). En estos casos, no es posible pasar de lo viejo a lo nuevo mediante una simple adición a lo que ya era conocido. Ni tampoco se puede describir completamente lo nuevo en el vocabulario de lo viejo ni viceversa. Las distintas teorías que explican el origen de las EET aportan a la ciencia nuevas palabras, necesarias para definir lo nuevo que intenta describirse. Así, aparecen términos como prión, holoprión, coprión o virino.

En este punto, la teoría del prión es emblemática. Contradice nada menos que dos dogmas fundamentales de la biología molecular: la tríada o secuencia ADN-ARN-proteína y la creencia de que toda enfermedad infecciosa transmisible debe estar producida por agen-

tes constituidos de material genético (ADN o ARN).

El lógico y filósofo húngaro Imre Lakatos (1923-1974) (10), por su parte, rechazaba las doctrinas justificacionistas (es decir, aquellas que afirman que una teoría científica puede demostrarse) y sostenía que los enunciados factuales no pueden demostrarse por la observación.

Además, afirmaba que todas las observaciones están cargadas teóricamente. Las observaciones son importantes, pero detrás de las observaciones siempre hay una teoría, razón por la cual las observaciones no pueden “derribar” teorías: una teoría no derriba otra teoría. Las teorías, en realidad, no se enfrentan a la naturaleza, sino a las teorías que las subyacen (24).

Por ello, las observaciones no son objetivas. Lo objetivo es una pretensión. Dicho de otra forma: el mundo no es como uno lo ve, sino como uno lo organiza.

Los datos no se ven solos: se ven desde la teoría que se alberga en la mente del observador. Si a un dato lo observan dos personas con esquemas teóricos distintos no verán la misma cosa, porque las experiencias no están descritas desde un lenguaje neutro e independiente de las teorías.

Las hipótesis se enfrentan con los datos más las teorías que los subyacen. Los datos no pueden ser determinantes. Pueden apoyar varias teorías. En realidad, la lucha de las teorías es contra todo un ámbito, y no sólo contra determinados datos.

Porque las teorías siempre tienen “contraejemplos”. Y algunas, a pesar de ser incapaces de corroborar algunas cosas, no se descartan. Se piensa que tal vez no tengamos al momento los métodos o instrumentos necesarios para medirlas.

Un ejemplo lo tenemos en la Teoría Viral, que plantea que, si bien el ácido nucleico debe existir, la ciencia no cuenta aún con los instrumentos necesarios para detectarlo.

Es muy curioso el hecho de que una misma observación sea explicada, desde distintas teorías, de una manera diferente. Por ejemplo, la polimerización de una proteína mutante, la PrP^{Sc}, con la consecuente formación de las placas amiloideas, es un hecho que nadie discute; pero el modelo que explica cómo se

producen (es decir, cómo se replica el agente) es bien diferente. La teoría del prión sostiene que a partir de una sola molécula infectante se inicia una reacción en cadena que da lugar a un crecimiento exponencial de la cantidad de partículas de PrP^{Sc}. Como estas no pueden eliminarse, se depositan y acumulan en el tejido nervioso. Sería una conversión de PrP^C en PrP^{Sc}, catalizada por la misma molécula anormal. Por otro lado, la teoría cristalina postula que la multiplicación del agente se debería al cristal que actuaría a modo de núcleo y al cual se incorporarían nuevas moléculas idénticas. Este cristal podría romperse, quedando dentro o fuera de la célula, y dando origen a nuevos núcleos de crecimiento. Esto explicaría la ampliación de PrP^{Sc} sin necesidad de ácidos nucleicos.

Cada teoría, o mejor aún, cada "programa de investigación científica", tiene un "núcleo" firme, tenazmente protegido contra las refutaciones mediante un gran "nudo protector" de hipótesis auxiliares. Incluso es factible "inventar" una hipótesis que explique cualquier anomalía que se presente.

De hecho, todos los programas, incluso los más conocidos, tienen problemas o anomalías no debidamente solucionados.

Porque la ciencia no sólo debe hallar una hipótesis sustentable, sino también, y quizás en mayor medida, debe incorporar el contenido de tal hipótesis en un sistema teórico de conocimientos.

Lakatos también sostenía que no tiene que haber, necesariamente, sólo una teoría. Más aún, decía que es bueno trabajar con dos o más programas de investigaciones científicas a la vez (24). Y en nuestro caso, como vimos, conviven distintas teorías que tienen más o menos fuerza.

Algunas observaciones favorecen una teoría y otras, por el contrario, la contradicen. Por ejemplo, la existencia de distintas cepas de priones induce a pensar en una etiología de tipo viral, pero la ausencia de respuesta inmune e inflamatoria va en contra de esta teoría. Por otro lado, la existencia de diferentes cepas es muy difícil de interpretar desde la teoría proteínica pura, pero ésta se fortalece cuando se observa que los procesos que modifican o destruyen ácidos nucleicos no tienen efectos sobre la infectividad de los priones.

Entonces ¿pueden coexistir varias teo-

rías igualmente verdaderas sobre los mismos datos?. Sí, que los datos coincidan con una determinada teoría no le dan a ésta el carácter de "única". En Ciencias Sociales es común la coexistencia de varias teorías acerca de un mismo hecho; en Ciencias Naturales, en cambio, generalmente las teorías suelen ser sucesivas.

Kuhn sostenía que las revoluciones científicas son un cambio repentino e irracional de punto de vista. Lakatos decía que, en realidad, lo que normalmente sucede es que un programa de investigación progresivo sustituye a uno regresivo. Y que desde un paradigma se puede conversar de otro paradigma. Pero... ¿Cuál elegimos?

Si uno de los programas de investigaciones científicas tiene mayores posibilidades de predicción y ampliación de conocimientos y vemos que va delante de la experiencia, podemos catalogarlo como "progresivo". En cambio, cuando el programa sólo termina respondiendo a los desafíos del otro programa, estamos ante uno que se muestra como "regresivo". Para Lakatos, lo más importante es que la teoría debe lograr "predecir" los hechos.

En esta misma línea, sin condenar *a priori* ninguna creencia (admitiéndolas, en principio, a todas a título de hipótesis), la ciencia propone procedimientos para establecer cuál es la mejor hipótesis, o la más digna de crédito. Sostiene que deberá ser adoptada aquella creencia que resulte más eficaz para "predecir" el comportamiento del objeto al cual se refiere, lo que deberá constatararse de modo directo, construyendo consensuadamente los contextos en los que deberán efectuarse las constataciones perceptuales mismas.

Es decir, la ciencia dispone examinar todas las opiniones a título de hipótesis y se compromete a decidir por una de ellas de conformidad con lo que los hechos parecen dictaminar, mediante una metódica comprobación de la eficacia predictiva de cada una de las hipótesis en juego.

Una teoría perdura mientras no haya otra mejor que la reemplace. Hoy, la teoría del prión es la más aceptada, aunque aún no podemos descartar a las otras hipótesis mencionadas. De hecho, la hipótesis del prión no siempre es pertinente para explicar y predecir el comportamiento del agente de la EEB, mientras que los razonamientos virológicos clásicos permiten una aproximación más pragmática.

Ahora... ¿Cuándo una teoría puede considerarse verdadera?

Como vimos, en un primer momento se pedía que fuera "verificable". Luego, se la analizaba "por la negativa" (es decir, debía demostrarse que no lo era). Y finalmente, se transformó en una cuestión "probabilística" (aunque existan casos negativos, si el mayor porcentaje de casos cumple con las premisas se consideraba válida. Ej.: un gato con tres patas sigue siendo un gato, aunque por definición deba tener 4 patas).

Y ... ¿Qué nivel de precisión deben tener las teorías en sus enunciados?

Es una típica treta de adivino predecir cosas de manera tan vaga que difícilmente fracasen sus predicciones: así éstas se hacen irrefutables. Porque si son muy imprecisas siempre serán verdaderas (positivas). Ejemplo: "Eso no es un gato". Puede ser verdadero, pero no nos aporta nada. Por el contrario, si son muy precisas siempre serán falsas (negativas) (25).

Otro tema a considerar es cuando las teorías tienen consecuencias políticas y/o comerciales. En estos casos, sus defensores suelen decir que es por esta razón que no son muy tenidas en cuenta. Sea esto cierto o no, muchas personas piensan que en esta historia están de nuevo implicados los *lobbies* o grupos de influencia de la industria farmacéutica, que quieren evitar a toda costa que a la hipótesis de Purdey se le dé credibilidad. Desde el Ministerio de Agricultura británico se ha intentado constantemente desacreditarlo y las investigaciones efectuadas para corroborar o negar su teoría han sido realizadas, según sus defensores, muy superficialmente (16).

Otras teorías, en cambio, parecen oponerse a lo que la comunidad científica acepta. En estos casos, corremos el riesgo de atar nuestras mentes a los dictados de aquellos que, coyunturalmente, han sido consagrados como exponentes actuales de la ciencia (26). De ser cierta, la descripción del Nemavirus como agente causal, en lugar del prión, podría ser un buen ejemplo.

Por último, es de interés comentar que en internet se pueden leer opiniones que sostienen que estas enfermedades son consecuencia directa de la alimentación "artificial" de los bovinos; es decir, de la "antinatural" idea de alimentar con productos de origen animal a especies que son naturalmente herbívoras, no adaptadas a tal tipo de alimentación, y que

por ende no pueden "deshacerse" de algunas de las proteínas que ingieren. Según estas ideas, las EET serían, en realidad, intoxicaciones por acumulación de proteínas anómalas (los priones) en el tejido nervioso del huésped.

Como se puede apreciar, estas enfermedades han dado origen a muchísimas teorías explicativas, con más o menos asidero, pero lo cierto es que hoy todas estas teorías conviven, dejando muy claro que el enigma aún no está definitivamente resuelto.

CONCLUSIONES

Con respecto al origen de las enfermedades espongiiformes transmisibles, parece que lo más prudente sería no dogmatizar en un campo en el que nuestros conocimientos parecen tan limitados. Si en el futuro se confirma la hipótesis del prión, el dogma de la genética clásica habrá sido atrapado en falta. Y, a la inversa, si el modelo de la proteína infecciosa queda invalidado, el gran avance de conocimientos que ha acaecido en los últimos años se habrá debido, paradójicamente, a una hipótesis inicial inexacta.

De ser cierta la teoría del prión, sin dudas éste sería uno de los descubrimientos biológicos más importantes del siglo XX (13). Es importante destacar que esta teoría no sólo postula la existencia de un agente nada convencional, cuyas características biológicas contradicen principios básicos de la biología, sino que ha generado más dudas que certezas; en estas dudas la ciencia deberá trabajar a los fines de darles una respuesta, y así brindar mayores precisiones sobre uno de los agentes infecciosos que más polémica ha generado en los últimos años.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Elisa Etcheverrigaray, por la revisión crítica del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lasmézas CI, Deslys JR, Robain O, Dormont D. Enfermedades por priones y su agente secreto. <http://coli.usal.es/web/articulos/art17/art17.htm>. Consultada en noviembre de 2004. En: Servidor educativo del Departamento de Microbiología y Genética (<http://edicion-micro.usal.es/web/educativo/entrada.html>) - Universidad de Salamanca (<http://www.usal.es/web-usal>).
2. Weber EL. Biología de los priones: actualización. Revista Argentina de Microbiología 1999; 31: 205-218.
3. Hope J. The nature of the scrapie agent: the evolution of the virino. Ann N Y Acad Sci. 1994; Jun

- 6;724:282-9.
4. Narang H. A critical review of the nature of the spongiform encephalopathy agent: protein theory versus virus theory. *Experimental Biology and Medicine* 2002; 227:4-19.-
5. van Leeuwen FALTA INICIAL, Ingeborg MM. El polémico agente infeccioso. <http://www.bio.vu.nl/thb/users/ingeborg/Prion2.html>. Departamento de Biología Teórica. Vrije Universiteit, Amsterdam (Países Bajos). Consultada en noviembre de 2004. En: <http://www.bio.vu.nl> (Vrije Universiteit, Amsterdam).
6. Chesebro, B. Prion diseases: Enhanced: BSE and prions: uncertainties about the agent. *Science* 1998; 279: 42-43.
7. Weissmann C. The prion connection: now in yeast. *Science* 1994; 264: 5258-530.
8. Narang H. Evidence that homologous ssDNA is present in scrapie, Creutzfeldt-Jakob disease, and bovine spongiform encephalopathy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994; 724: 314-326.
9. Weber EL. Priones y encefalopatías espongiiformes transmisibles. *InVet* 2002; 4: 93-100.
10. Biografías y vidas. <http://www.biografiasyvidas.com>. Consultada en noviembre de 2004.
11. Prusiner SB. The prion diseases. *Brain Pathology* 1998; 8: 499-513.
12. Prions puzzling infectious proteins. <http://science-education.nih.gov/nihHTML/ose/snapshots/multimedia/ritn/prions/prions1.html>. Consultada en noviembre de 2004. En: Snap Shots of Science and Medicine: <http://science-education.nih.gov/snapshots.nsf> (Office of Science Education of the National Institutes of Health).
13. NOVA Online. The brain eater. <http://www.pbs.org/wgbh/nova/madcow/>. Consultada en noviembre de 2004. En: Public Broadcasting Service (PBS) (<http://www.pbs.org>).
14. Johnson T. Nobel Prize given to prion theorist. *International Worker* 1997; N° 241, Saturday November 8.
15. Ciencia Hoy. Volumen 6, N°32, 1996. El Prión: Un agente infeccioso no convencional. <http://www.ciencia-hoy.retina.ar/hoy32/prion02.htm>. Consultada en marzo de 2005.
16. Discovery Dsalud. Lo que no se cuenta sobre la enfermedad de las vacas locas. http://www.dsalud.com/numero25_6.htm. Consultada en enero de 2005.
17. Purdey M. High-dose exposure to systemic phosmet insecticide modifies the phosphatidylinositol anchor on the prion protein: the origins of new variant transmissible spongiform encephalopathies?. *Medical Hypotheses* 1998; 50: 91-111 c.Harcourt Brace & Co. Ltd 1998.
18. Fredricks DN, Relman DA. Sequence - Based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clinical Microbiology Review*. 1996; Jan. pág.:18-33.
19. Hempel C. *Filosofía de la ciencia natural*. Alianza Editorial. Madrid (España), 1979.
20. Popper K. *El desarrollo del conocimiento científico. Conjeturas y refutaciones*. Paidós. Buenos Aires (Argentina), 1967.
21. Popper K. *La lógica de la investigación científica*, Tecnos. Madrid (España), 1971.
22. Kuhn TS. *La estructura de las revoluciones científicas*. FCE. México, 1971.
23. Kuhn TS. ¿Qué son las revoluciones científicas? Paidós. Barcelona (España), 1989.
24. Lakatos I. *La metodología de los programas de investigación científica*. Alianza Editorial. Madrid (España), 1983.
25. Follari R. ¿Cuál es la objetividad en el conocimiento científico?. Universidad Nacional de Rosario, 20 de septiembre de 2002.
26. Samaja J. *Epistemología y Metodología*. Eudeba. Buenos Aires (Argentina), 1994.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

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

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

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

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

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

Normas generales de redacción

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

Las fotografías en blanco y negro podrán ser incluidas en número no mayor a 3 por artículo. Otras inclusiones de fotografías en blanco y negro o en color tendrán un cargo extra y estarán a cargo de los autores. Las versiones electrónica y en CD-ROM de la revista podrán contener fotografías color sin costo para los autores. La inclusión de fotografías color en el material impreso deberá ser expresamente solicitado al editor. El material envi-

do estará listo para su reproducción, podrán enviarse fotografías o gráficos en formato TIF, CRD, JPG, GIF o BMP. El costo de cada artículo será de \$ 50 hasta 7 hojas (publicadas) y \$ 10 por cada hoja adicional que deberá ser abonado por los autores indefectiblemente antes de su publicación.

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

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

Normas particulares de redacción: 1.Trabajos de investigación:

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

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

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

inglés las 200 palabras.

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

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

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

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

Si se tratase de trabajos publicados en libros:

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

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

Las tablas se presentarán en hojas separadas y con títulos completos ubicados sobre el margen superior y numerados con números arábigos, deberá incluirse además el título en inglés. Los gráficos se presentarán también en hojas separadas pero con títulos explicativos ubicados al pie de los mismos y numerados consecutivamente con números romanos debiéndose incluir además el título en inglés. Las tablas, gráficos o fotos se adjuntarán al final del manuscrito debiéndose indicar en el texto la posición correspondiente "insertar" tabla N° o gráfico N° o foto N°.

Las fotografías deberán remitirse con la numeración en el reverso escrito con lápiz (o pegar una etiqueta de papel) de acuerdo a su secuencia en el texto, así como también indicarse el título y el autor del trabajo y cuál es la parte superior de la misma. El tamaño deberá ser de 10 por 15 cm, pudiendo reducirse en la publicación por lo que se sugiere la buena calidad del detalle que se quiera resaltar. Cada foto deberá ser acompañada de una breve reseña explicativa de la misma en español y en inglés.

II. Artículos de revisión

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

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

III. Comunicaciones breves

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

IV. Información institucional

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

V. Cartas al editor

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

Correspondencia

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

Sr. Director ANALECTA VETERINARIA
CC 296 (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA
TEL/FAX: 0221-4257980

Desde el exterior: +54-221-4257980
E-mail: analecta@fcv.unlp.edu.ar

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