

Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo (Evaluation of acute toxicity of extracts of medicinal plants by an alternative testing)

Deodelys Bermúdez Toledo: Unidad de Toxicología Experimental. (UTEX) Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara. Santa Clara. Cuba | **Emilio Monteagudo Jiménez:** Unidad de Toxicología Experimental. (UTEX) Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara. Santa Clara. Cuba | **Maria Boffill Cárdenas:** Unidad de Toxicología Experimental. (UTEX) Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara. Santa Clara. Cuba | **Luis E. Díaz Costa:** Unidad de Toxicología Experimental. (UTEX) Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara. Santa Clara. Cuba | **Alexander Roca Simeón:** Unidad de Toxicología Experimental. (UTEX) Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara. Santa Clara. Cuba | **Emoe Betancourt Morgado:** Unidad de Toxicología Experimental. (UTEX) Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara. Santa Clara. Cuba | **Enrique A Silveira Prado:** Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Cuba. |

* Para contactar: Deodelys Bermúdez Toledo. Unidad de Toxicología Experimental. (UTEX) Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara. Carretera a Acueducto y Circunvalación. CP 50200. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. E-mail: deodelysbt@iscm.vcl.sld.cu

REDVET: 2007, Vol. VIII Nº 3.

Recibido: 14.01.2007 / Referencia: 070305 / Aceptado: 10.02.2007 / Publicado: 01.03.2007

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030307.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n030307/030706.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®. Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con RECVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> - <http://www.redvet.es>

Resumen

Se evaluó la toxicidad a dosis única de seis extractos de plantas medicinales: *Psidium guajava* L. (guayaba), *Eucalyptus citriodora* Hooker (eucalipto de limón), *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (caña santa, hierba de limón), *Hibiscus elatus* Sw. (majagua), *Justicia pectoralis* Jacq. (tilo), *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (orégano francés) mediante un método alternativo e internacionalmente validado y aceptado (procedimiento de dosis fijas) en ratas Sprague Dawley. El grupo tratado recibió por vía oral una dosis límite de 2000 mg/kg de masa corporal y el control negativo

cloruro de sodio 0,9%. En las condiciones del ensayo no se produjo mortalidad ni se manifestaron síntomas indicativos de toxicidad en los animales. Los estudios anatomopatológicos macroscópicos no mostraron ninguna alteración en los órganos estudiados. La DL₅₀ de los extractos de estudio se encuentra por encima de 2000 mg/kg de masa corporal, calificándose éstos, según el Sistema Global Armonizado, como "No clasificadas" ("No tóxicas").

Palabras clave: Toxicidad aguda | Métodos alternativos | Procedimiento de dosis fijas | Plantas medicinales |

Abstract

A single dose toxicity study in six extracts of medicinal plants: *Psidium guajava* L. (guava), *Eucalyptus citriodora* Hooker (lemon eucalyptus), *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemon grass), *Hibiscus elatus* Sw. (majagua), *Justicia pectoralis* Jacq. (linden), *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (French oregano) was done, using an alternative internationally validated and accepted method (Fix Dose Procedure) in Sprague Dawley rats. The treated group received by oral route a dose limit of 2000 mg/kg of corporal mass and the control

negative chloride of sodium 0.9%. Under the assay conditions didn't produced mortality neither they showed indicative symptoms of toxicity in the animals. The macroscopic anatomopathology studies didn't show any alteration in the studied organs. The LD₅₀ of the study extracts is above 2000 mg/kg of corporal mass, being qualified these, according to the Harmonized Global System, as "Not classified" ("Not toxic").

Key words: Acute toxicity | Alternative testings | Fix dose procedure | Medicinal plants |

Introducción

El uso de fitomedicamentos constituye una nueva categoría terapéutica que sin dudas revolucionó el esquema de tratamiento medicinal de fines del siglo XX y marca un aporte ascendente en el siglo XXI. La existencia de plantas con un elevado potencial terapéutico constituye una alternativa farmacológica de marcado interés en el tratamiento de muchas enfermedades, de ahí la importancia de realizar estudios preclínicos con el propósito de detectar posibles efectos tóxicos post administración.

Dentro de la batería de ensayos de primera barrera se encuentran los estudios de toxicidad a dosis única imprescindibles en la estimación del potencial tóxico de una sustancia, referido como el estudio cuali-cuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición en función del tiempo tras la administración de una dosis única de la sustancia o de varias dosis fraccionadas en el transcurso de 24 horas.¹

Ciertas corrientes regulatorias medioambientales para estudios de estimación de riesgo, han considerado por razones éticas y económicas el uso racional de los animales de experimentación, contribuyendo a la acelerada adopción internacional de criterios regulatorios en la validación y análisis de métodos alternativos científicamente seguros, menos costosos, rápidos y extrapolables que favorezcan la implantación de las **3 R** propuestas por Rusell y Burch en 1959 referidas a **R**educir (disminución), **R**efinar (perfeccionamiento) y **R**eemplazar (sustitución) el uso animal, unido a una cuarta **R** de **R**esponsabilidad por parte de los investigadores.²

En diciembre de 2002 quedó abolida por la OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) la ejecución del test clásico para la determinación de toxicidad aguda y la dosis letal 50 (DL₅₀) que fue sustituido por tres métodos alternativos cuyo objetivo común es reducir el número de animales empleados y minimizar el sufrimiento de éstos, estos métodos comprenden el test de Clasificación Tóxica Aguda o Método de las Clases de Toxicidad (Toxic Class Method, TCM),^{3,4} Procedimiento de Sube y Baja (Up-and-Down Method, UDP)⁵ y Procedimiento de Dosis Fijas (Fixed Dose Procedure, FDP).⁶

El Procedimiento de Dosis Fijas fue adoptado en la Guía No. 420 de la OECD⁵ como alternativa a la prueba clásica aguda. El método se basa en la evaluación de dosis prefijadas (5, 50, 300 y 2000 mg/kg) para discernir la clasificación tóxica de una sustancia según el Sistema Global Armonizado (SGA)⁷ La dosis seleccionada debe ser no letal, no dolorosa y no estresante, además de no ser corrosiva ni severamente irritante.

El estudio de plantas como *Psidium guajava* L. (guayaba), *Eucalyptus citriodora* Hooker (eucalipto de limón), *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (caña santa, hierba de limón), *Hibiscus elatus* Sw. (majagua), *Justicia pectoralis* Jacq. (tilo) y *Plectranthus amboinicus* (Lour.)

Spreng (orégano francés) deriva de su amplio uso tradicional dado por la variedad de actividades farmacológicas descritas, por lo que consideramos necesario evaluar su potencial tóxico mediante el procedimiento de dosis fijas y clasificar las mismas de acuerdo a lo establecido internacionalmente por el Sistema Global Armonizado para este modelo. Esta información brindará elementos al perfil toxicológico de las plantas a evaluar, permitiendo el uso científicamente sustentado de estas.

Materiales y métodos

Método de evaluación

La toxicidad aguda a dosis única se evaluó mediante el método alternativo Procedimiento de Dosis Fijas (PDF), internacionalmente validado y aceptado.⁷

Sustancias de ensayo

Extractos hidro-alcohólicos de las plantas medicinales: *Psidium guajava* L. (guayaba), *Eucalyptus citriodora* Hooker (eucalipto de limón), *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (caña santa, hierba de limón), *Hibiscus elatus* Sw. (majagua), *Justicia pectoralis* Jacq. (tilo) y *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (orégano francés), producidos en el Laboratorio Provincial de Plantas Medicinales de Santa Clara (Villa Clara, Cuba), con un contenido alcohólico entre el 27 y 35%. Posteriormente se rotoevaporaron hasta extractos blandos a una concentración final de 200 mg/mL.

Modelo biológico

Ratas Sprague Dawley identificadas convenientemente en la oreja, con una masa corporal de 200 ± 20 g y edad de $7,5 \pm 0,5$ semanas. Los animales se mantuvieron en salas climatizadas a una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, con una humedad relativa entre 30 y 70% y ciclos luz/oscuridad de 12/12 horas. Recibieron como alimento dieta comercial pelletizada EMO (Alyco®, CENPALAB) con su correspondiente certificado de calidad. El agua era de calidad apta para consumo humano. El acceso a los alimentos y al agua fue *ad libitum*. Los animales fueron sometidos a cuarentena e inspección clínica diaria durante 5 días antes del inicio de experimento.

Diseño experimental

Aleatoriamente se conformaron siete grupos experimentales, seis grupos tratados y uno control. Las sustancias de ensayo fueron administradas con un ayuno previo de 16 a 18 horas por vía oral mediante cánula intragástrica 16G, a dosis única de 2000 mg/kg de masa corporal, teniendo en cuenta la ausencia de signos o síntomas de toxicidad por esta vía de administración y los datos toxicológicos de las sustancias de ensayo. Se dosificaron 5 hembras de cada grupo experimental, administrándoles un volumen de 10 mL/kg masa corporal de las sustancias de ensayo. El grupo control recibió el mismo volumen de cloruro de sodio al 0,9%.

Los animales fueron observados individualmente durante los primeros 30 minutos, con especial atención durante las primeras 4 horas y diariamente hasta los 14 días del experimento, recogiendo signos y síntomas de toxicidad

Las observaciones estuvieron dirigidas a la determinación de: muerte y tiempo de ocurrencia de la misma, signos y síntomas de toxicidad incluyendo su comienzo y duración, además de cambios en la piel, membranas de mucosas y ojos, en el sistema respiratorio, en el circulatorio, en el nervioso central y en el autónomo, en la actividad somatomotora y en la conducta. Se prestó especial atención a la potencial ocurrencia de temblor, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, somnolencia y coma.

Se controló el peso vivo de los animales en los días 1, 7 y 14 del experimento como uno de los parámetros demostrativos de toxicidad. Al concluir el experimento se sacrificaron los animales por inhalación de éter etílico para el posterior estudio anatomopatológico macroscópico del cerebro, el estómago, el hígado, el bazo, los pulmones, los riñones, los músculos, el esófago y el intestino delgado.

Resultados y discusión

La administración de una dosis límite de 2000 mg/kg de masa corporal no provocó muertes de los animales o síntomas indicativos de toxicidad, solo en el grupo tratado con *Justicia pectoralis* se manifestaron síntomas de somnolencia y sedación en los dos primeros días post administración, observándose una rápida recuperación de los animales. La masa corporal como indicador de toxicidad, se comportó dentro de los parámetros establecidos para la curva de crecimiento de la especie y línea del modelo biológico utilizado (Tablas 1 y 2). Los estudios anatomopatológicos macroscópicos no mostraron ninguna alteración en los órganos estudiados ni se observaron alteraciones clínicas.

Tabla 1. Evolución de la masa la masa corporal en función del tiempo

Grupo Experimental	Masa corporal (g)			
	Día 1	Día 7	Día 14	Dif.
1 <i>Psidium guajava</i>	186	214	230	44
2 <i>Eucalyptus citriodora</i>	190	221	237	47
3 <i>Cymbopogon citratus</i>	194	218	229	35
4 <i>Hibiscus elatus</i>	195	218	229	34
5 <i>Justicia pectoralis</i>	191	222	246	55
6 <i>Plectranthus amboinicus</i>	193	213	234	41
Control Cloruro de sodio 0,9%	190	222	244	54

Tabla 2. Rango de masa corporal con relación a la edad en semanas de la especie y y línea del modelo biológico

Edad (semanas)	Masa corporal (g)
7-8	180-200
8-9	200-220
9-10	220-240

Actualmente se acepta desde el punto de vista regulatorio que no es necesario definir un valor puntual de DL₅₀ para una sustancia y que resulta prácticamente suficiente ubicar dicha dosis en un rango.⁸ Las regulaciones para la ejecución de este tipo de estudio alternativo de toxicidad aguda plantean que si no existen informes anteriores de toxicidad de la(s) sustancia(s) que se investiga(n) es posible utilizar una dosis límite de 2000 mg/kg de masa corporal, lo que se ajusta a nuestro estudio dado que son extractos de plantas sobre las que no se ha señalado toxicidad en su extenso uso tradicional.

Aunque los animales que fueron tratados con el extracto de *Justicia pectoralis* evidenciaron síntomas de somnolencia y sedación en los dos primeros días post administración, estos resultados están acordes con las propiedades sedantes informadas para esta planta sobre el sistema nervioso central,⁹ no ocurriendo muertes ni manifestaciones síntomas indicativo de toxicidad. Sobre esta planta no se reporta información toxicológica, solo advertencias de no

exceder su uso por más de 30 días consecutivos ni administrarla conjuntamente con anticoagulantes o en pacientes con trastornos de la coagulación.

La administración de las sustancias de ensayo restantes no produjo mortalidad ni síntomas atribuibles a toxicidad y los estudios anatomopatológicos macroscópicos no mostraron alteración alguna en los órganos estudiados, además de no observarse alteraciones clínicas.

Respecto al extracto de *Psidium guajava*, los resultados se corresponden con los encontrados por Martínez *et al.*¹⁰ al evaluar hojas secas de esta planta en un estudio toxicológico preclínico mediante los procedimientos de dosis letal media (DL₅₀) en ratones suizos OF1 y toxicología alternativa, método de las Clases de Toxicidad (CTA) en ratas Wistar. Estos investigadores realizaron también la evaluación genotóxica de dos extractos, uno acuoso y otro hexánico, en un sistema *in vitro* de ensayo de inducción de segregación somática a corto plazo en el hongo *Aspergillus nidulans* y un ensayo *in vivo* de la droga seca mediante la prueba de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón. No se presentaron muertes en ninguno de los dos modelos experimentales en el rango de dosis empleando hasta 2000 mg/kg de masa corporal y los resultados histológicos no sugirieron daños atribuibles a toxicidad del material vegetal probado. Los resultados de los estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron la ausencia de efecto genotóxico de las sustancias ensayadas.

Respecto al *Eucalyptus citriodora* se reporta que la administración de esta planta puede provocar síntomas tales como convulsiones, miosis, taquicardia, somnolencia, entre otros efectos. Los mismos autores refieren una posible intoxicación por eucaliptol (aceite esencial).¹¹ Por el contrario, en nuestro estudio con el empleo de una dosis límite de 2000 mg/kg de masa corporal no se evidenció ningún síntoma ni signo de toxicidad.

En un estudio realizado con extractos de *Cymbopogon citratus* se informó que la decocción de las hojas no provocó efectos tóxicos, genotóxicos o teratogénicos en diferentes modelos biológicos. Por el contrario, los resultados de actividad mutagénica fueron negativos, en tanto que los correspondientes a la acción protectora de las concentraciones probadas reafirmaron la capacidad antioxidante mostrada por el extracto vegetal.¹²

En otro estudio en que se realizó la evaluación toxicológica aguda de los extractos fluidos al 30 y 80% de *Cymbopogon citratus*¹³ se demostró que el fármaco al 30% posee muy baja toxicidad, no ocurriendo así con la concentración al 80% en que éstos son más evidentes. Los daños observados estuvieron centrados en estómago con congestión vascular ligera e infiltrado hemorrágico focal en la lámina propia, en hígado y riñón, donde los hallazgos histológicos permitieron afirmar el efecto hepatotóxico y nefrotóxico de los mismos. Los investigadores calcularon una DL₅₀ de 440,58 mg/kg de masa corporal.

Sobre el *Hibiscus elatus* no se reporta información toxicológica ni algún otro estudio realizado a esta planta. En las farmacias cubanas se expende en forma farmacéutica de jarabe como expectorante, sin haber mostrado toxicidad alguna.^{14,15}

Con el *Plectranthus amboinicus* se reporta un estudio toxicogenético de un extracto fluido al 70% y del aceite esencial por dos sistemas de ensayo de genotoxicidad: uno mediante ensayo *in vitro* (segregación somática en el hongo diploide *Aspergillus nidulans* D-30) evaluándose el posible efecto genotóxico del extracto fluido y el aceite esencial y otro *in vivo* (inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón) para evaluar la acción clastogénica o aneugénica del extracto fluido, demostrándose una acción citotóxica y genotóxica significativa dosis dependiente para las sustancias de prueba en el ensayo *in vitro* y no en el ensayo *in vivo* para el extracto fluido.¹⁶

Conclusiones

En las condiciones del ensayo no se produjo mortalidad ni se manifestaron síntomas indicativos de toxicidad en los animales. Los estudios anatomopatológicos macroscópicos no mostraron ninguna alteración en los órganos estudiados. La DL₅₀ de los extractos de estudio

se encuentra por encima de 2000 mg/kg de masa corporal, calificándose éstos, según el Sistema Global Armonizado, como "No clasificadas" ("No tóxicas").

Bibliografía

1. Dipascuale L, Wallace H. Acute toxicity and eye irritancy. En: Principles and Methods of Toxicology. 4 ed. Philadelphia: Taylor and Francis, 2001; 4a: 853-917.
2. Stokes WS, Schechtman LM, Hill RN. The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM): a review of the ICCVAM test method evaluation process and current international collaborations with the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). *Altern Lab Anim*, 2002 Dec; 30 Suppl 2: 23-32.
3. Diener W, Schlede E. Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC50 Tests. *ALTEX :: Alternatives to Animal Experiments*. 1999; 3. URL disponible en: http://altweb.jhsph.edu/publications/journals/altex/1999_3/altex1999_3d.htm [fecha de acceso 10 de agosto de 2006]
4. OECD. Guidelines for testing of chemicals. Acute oral toxicity. Acute Toxic Class Method. Organization for Economic Co-operation and Development. Guide No. 423, 2000 [Revised Draft Guideline October 2000]. URL disponible en: <http://www.oecd.org> [fecha de acceso 10 de agosto de 2006]
5. OECD. Guideline for testing of chemicals. Organization for Economic Co-operation and Development. Guide No. 425, 2001. Up and Down Procedure. URL disponible en: <http://www.oecd.org> [fecha de acceso 10 de julio de 2006]
6. Organization for Economic Co-operation and Development. Revised Draft Guideline 420. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. OECD Guideline for Testing of Chemicals, 2000. URL disponible en: <http://www.oecd.org> [fecha de acceso 10 de julio de 2006]
7. OECD. Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental. Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, 1998 in November 1998. Organisation for Economic Co-operation and Development. [Revised November 1998]. URL disponible en: <http://www.oecd.org/ehs/class/HCL6.htm> [fecha de acceso 15 de septiembre de 2006]
8. Kennedy GL, Ferenz RL, Burgess BA. Estimation of acute oral toxicity in rats by determination of the approximate lethal dose rather than the LD₅₀. *J Appl Toxicol*, 1986; 2001; 6:145-148.
9. Sánchez Ester, Fuentes Leticia, Chávez Diosothys, Rodríguez CA. Estudio farmacognóstico de *Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonard. *Rev Cubana Plant Med* 2003; 8(3) URL disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol8_3_03/pla05303.htm [fecha de acceso 10 de agosto de 2006]
10. Martínez María J, López Marisol, Betancourt J, Barceló H, Montes María E, Regó Rosaura. Estudio toxicológico preclínico de la *Psidium guajava* L. (guayaba). *Rev Cubana Plant Med*. 2001; 2:56-61. URL disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol6_2_01/pla05201.htm [fecha de acceso 10 de agosto de 2006]
11. Castaño MT, Ruíz L, Vidal JL. Monografías farmacéuticas. Alicante: Colegio Oficial de Farmacéuticos (COF). 1998.
12. Cápiro Nancy, Sánchez-Lamar A, Fonseca Gladys, Baluja Ligia, Borges E. Capacidad protectora de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. ante el daño genético inducido por estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed*, 2001; 20(1):33-37. URL disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol20_1_01/ibi07101.htm [fecha de acceso 2 de octubre de 2006]
13. Martínez María J, Betancourt J, Ramírez Ana R, Barceló H, Meneses R, Lalnez A. Evaluación toxicológica aguda de los extractos fluidos al 30 y 80% de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (caña santa). *Rev Cubana Plant Med*, 2000; 5(3):97-101. URL disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol5_3_00/pla06300.htm [fecha de acceso 2 de octubre de 2006]
14. Milanés R, Alonso Dalya, González G. Farmacognosia de la droga "flores de majagua" (*Hibiscus elatus* Sw., familia *Malvaceae*). III. Estandarización de la droga cruda.

- Alteraciones de la droga. Rev Cubana Plant Med 1999;3(2):79-81. URL disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4_2_99/pla07299.htm [fecha de acceso 2 de octubre de 2006]
15. Milanés R, Alonso Dalya, González G. Farmacognosia de la droga "flores de majagua" (*Hibiscus elatus* Sw., familia *Malvaceae*). IV. Estandarización del extracto fluido. Rev Cubana Plant Med, 1999; 3(2):82-87. URL disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4_2_99/pla08299.htm [fecha de acceso 2 de octubre de 2006]
16. Vizoso A, Ramos A, Edreira Aymee, Betancourt J, Décalo Mercedes. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (orégano francés). Estudio toxicogenético de un extracto fluido y del aceite esencial. Rev Cubana Plant Med 1999; 3(2):68-73. URL disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol4_2_99/pla05299.htm [fecha de acceso 10 de agosto de 2006]



REDVET® [Revista Electrónica de Veterinaria](http://www.veterinaria.org) (ISSN nº 1695-7504) es medio oficial de comunicación científico, técnico y profesional de la Comunidad Virtual Veterinaria, se edita en Internet ininterrumpidamente desde 1996. Es una revista científica veterinaria referenciada, arbitrada, online, mensual y con acceso a los artículos íntegros. Publica trabajos científicos, de investigación, de revisión, tesinas, tesis doctorales, casos clínicos, artículos divulgativos, de opinión, técnicos u otros de cualquier especialidad en el campo de las **Ciencias Veterinarias** o relacionadas a nivel internacional.

Se puede acceder vía web a través del portal [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org). <http://www.veterinaria.org> o en desde **REDVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> - <http://www.redvet.es>

Se dispone de la posibilidad de recibir el Sumario de cada número por [correo electrónico](mailto:redvet@veterinaria.org) solicitándolo a redvet@veterinaria.org

Si deseas postular tu artículo para ser publicado en **REDVET®** contacta con redvet@veterinaria.org después de leer las Normas de Publicación en <http://www.veterinaria.org/normas.html>

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica siempre que se cite la fuente, enlace con [Veterinaria.org®](http://www.veterinaria.org). <http://www.veterinaria.org> y **REDVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> - <http://www.redvet.es>