

Efecto de la mezcla ozono/oxígeno combinado con levofloxacin en un modelo de sepsis peritoneal en rata (Effect of ozone/oxygen mixture combined with levofloxacin in a model of peritoneal sepsis induced in rats)

DMV. Zullyt Zamora Rodríguez: Departamento de Biomedicina, Laboratorio de Ensayos Biológicos, Centro de Investigaciones del Ozono. Apartado Postal 6414, Ciudad Habana. Cuba. zullyt.zamora@cnic.edu.cu | **Silvia Menéndez Cerero:** Centro de Investigaciones del Ozono, POBox 6414, Ciudad de La Habana, Cuba. | **Ricardo González Alvarez :** Departamento de Biomedicina, Laboratorio de Ensayos Biológicos, Centro de Investigaciones del Ozono. Apartado Postal 6414, Ciudad Habana. Cuba | **DMV Siegfried Schulz:** Universidad de Marburg, Marburg, Alemania.

R7EDVET: 2007, Vol. VIII N° 9

Recibido: 20 Julio 2007 / Referencia: 09012_REDVET / Aceptado: 30 Agosto 2007 / Publicado: 01 Septiembre 2007

Está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090907/090712.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 REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la mezcla ozono/oxígeno combinado con antibiótico y aplicado terapéuticamente en un modelo de sepsis peritoneal en rata. El estudio fue realizado en ratas Wistar macho (200-250 g), los cuales fueron divididos aleatoriamente en cinco grupos: 1. inducción de la infección peritoneal, sin tratamiento alguno; 2. infectados y tratados con levofloxacin (25mg/kg); 3. infectados y tratados con la mezcla ozono/oxígeno por vía intraperitoneal, a la dosis de 1 mg/kg de peso; 4 y 5. infectados y tratados con Levofloxacin (25 mg/kg) más la mezcla ozono/oxígeno i.p a 0,4 y 1 mg/kg, respectivamente. Se determinó el porcentaje de mortalidad de los animales mediante la observación diaria y también se registró el peso de los animales. Los resultados mostraron que los grupos de animales que recibieron tratamientos combinados de antibiótico y la mezcla ozono/oxígeno tuvieron un elevado porcentaje de sobrevivencia, siendo del 77 hasta el 100 % a las 120 h y entre el 66 y el 77 % a las 240 h. Sin embargo, en el grupo tratado con antibiótico fue de un 77% a las 120 h, pero ya a las 240 h el por ciento de sobrevivencia fue del 33 %. Este estudio demostró la efectividad de la combinación de la mezcla ozono/oxígeno con un antibiótico de última generación. Sin embargo, la aplicación sola de ozono de forma terapéutica, por vía intraperitoneal, en este modelo de sepsis no fue efectivo por lo cual se requiere evaluar otras dosis y vías de administración del ozono.

Palabras claves: ratas | choque séptico | peritonitis | mezcla ozono/oxígeno | sepsis |

Abstract

The aim of this research was to evaluate the effect of ozone / oxygen mixture (OOM) combined with an antibiotic and applied therapeutically in a model of peritoneal sepsis induced by rat faecal material. The study was performed in male Wistar rats weighing 200-250 g. The animals

were divided in five groups. The first one was the infected control with faecal material alone. The second was also infected and treated with levofloxacin (25 mg/kg). The third group also infected and was treated with OOM by intraperitoneal route (1mg/kg). The groups four and five were infected and treated with levofloxacin (25 mg/kg) and The OOM (0.4 and 1mg/kg) respectively. The body weight and mortality rate were determined. The results showed that in the groups of animals treated with combined therapy (OOM plus levofloxacin) the survival rate was greater (77 %-100 %) at 120 h thereafter Whereas as it was between 66 and 77 % at 240 h after the combined treatment . In contrast the group of animals only treated with antibiotics showed a survival rate of 77 % at 120 h but 240 h after treatment the survival rate decreased to 33 %. Therefore, this study supports the beneficial effects of combined therapy with OOM and levofloxacin in the treatment of peritoneal sepsis. However it is necessary to evaluate other administration routers and doses in order to confirm these results.

Key words: rats | septic shock | peritonitis | ozone/oxygen mixture | sepsis |

Introducción

La sepsis y el choque séptico, además de ser causantes de una morbilidad elevada, constituyen también la causa más frecuente de muerte en las Unidades de Cuidados Intensivos de los Estados Unidos¹ y muchos otros países.² Históricamente, la mortalidad asociada con la sepsis se mantuvo entre un 50 y un 75 % aproximadamente en los pacientes portadores de la misma, pero a partir del advenimiento del antibiótico terapia se redujo hasta un rango de un 30 a un 50 %.³ A pesar de ese avance, los estimados recientes señalan la existencia de 750,000 casos de sepsis severa por año en los Estados Unidos, pero el número de los casos registrados se está incrementando progresivamente en un 9.5 anual.

El uso de anticuerpos neutralizantes de endotoxinas^{4,5} o antagonistas del factor de necrosis tumoral- α (FNT- α),⁶ receptores solubles que inactivan FNT- α en la sangre o de antagonistas de receptores de la interleucina -1 (IL-1),⁷ han sido usados entre otros, pero no se han demostrado efectos beneficiosos significativos en la reducción de la mortalidad. Muchas razones fueron explicadas ante tal situación como fueron la heterogeneidad de los pacientes, la diversidad de acciones que producen las citocinas y sus diferentes efectos en dependencia de la fase y del mayor o menor estado de gravedad del paciente.⁸⁻¹⁰ Recientes estudios¹¹⁻¹⁴ han demostrado que el acondicionamiento oxidativo con ozono (POO), aplicado intraperitonealmente en un modelo de sepsis letal en ratas, produjo hasta un 60 % de incremento de la sobrevivencia. También demostraron que el POO, combinado con tratamiento con Tazobactam en un modelo de sepsis peritoneal, incrementó los porcentos de sobrevivencia de los animales hasta un 93% e indujo una disminución significativa en la expresión FNT- α e IL-1, tanto en tejido hepático como esplénico. En otros estudios se demostró que el POO tuvo efecto inhibitor de la liberación de FNT- α en el modelo de choque endotóxico en ratón, al igual que se observó una modulación del estrés oxidativo hepático, mediante el incremento en la actividad de enzimas antioxidantes en dicho tejido.^{12,13}

La levofloxacin, isomero-levo de la D, L- racemate ofloxacin, es un nuevo antibiótico del grupo de la fluoroquinolona, aprobado en diciembre del 2006 en los Estados Unidos. Esta nueva fluoroquinolona se ha demostrado que tiene mayor efectividad que otras como la ciprofloxacina y la ofloxacin.¹⁵ La levofloxacin, en estudios *in vitro* ha demostrado ser dos veces más potente que la ofloxacin. Es mayormente activa contra organismos aerobios entre ellos gram negativos y gram positivos, aunque también tiene una actividad moderada contra organismos anaerobios.¹⁶

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del tratamiento con ozono aplicado intraperitonealmente, combinado con la levofloxacin, en un modelo de sepsis peritoneal letal en rata.

Materiales y Métodos

Se utilizaron ratas macho, de la línea Wistar, 180-250g de peso corporal, provenientes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Habana, Cuba. Estos animales fueron mantenidos durante todo el experimento en condiciones de temperatura y humedad controlados, incluyendo ciclos de luz-oscuridad, con alimentación y agua *ad libitum*. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético para el trabajo con los animales de experimentación.

Inducción de la peritonitis

La sepsis peritoneal fue inducida mediante una inyección intraperitoneal de una disolución de materia fecal 0.65 g/kg de peso corporal. La materia fecal fue diluida en solución Ringer:lactato (1:1). La materia fecal utilizada fue extraída del ciego de la rata donante, a la cual se le practicó la eutanasia bajo atmósfera de éter.

Tratamientos

El tratamiento con antibiótico Tavanic (levofloxacin 500 mg), de la Hoechst Marion Roussel), se aplicó por vía intramuscular a la dosis de 12,5 mg/kg. La aplicación de esta dosis se realizó en dos tiempos, la primera una hora después de la inducción de la infección intraperitoneal y la otra, dos horas después. Los tratamientos con la mezcla ozono/oxígeno (MOO) fueron aplicados por la vía intraperitoneal a las dosis de 0,4 y 1 mg/kg, en diferentes tiempos 4, 7 y 24 horas después de la inducción de la sepsis peritoneal.

Diseño experimental

Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en cinco grupos experimentales de 9 animales cada uno; grupo 1, animales infectados (0,65 mg/kg); grupo 2, animales infectados (0,65 mg/kg) y tratados con levofloxacin (12,5 mg/kg) (+1h, +2h); grupo 3, infectado (0,65 mg/kg) y tratado con la MOO i.p (1mg/kg) (+4h, +7h, +24h); Grupo 4, infectado (0,65 mg/kg) y tratado con Levofloxacin (12,5 mg/kg) (+1h, +2h) y la MOO i.p (0,4 mg/kg) (+4h,+7h,+24h); Grupo 5, infectado (0,65 mg/kg) y tratado con levofloxacin (12,5 mg/kg) (+1h y +2h) y con la MOO i.p (1mg/kg) (+ 4h,+ 7h,+ 24h). Los animales fueron observados hasta las 240 h, monitoreándose la mortalidad de los animales. Se tomaron como puntos finales de porcentos de mortalidad las 120 h y las 240 h, los cuales fueron comparados. Durante la observación diaria de los animales también se registró el peso de los mismos como indicador de su estado general. El análisis de los pesos solamente fue realizado para los grupos 2, 4 y 5 puesto que en el resto de los grupos los porcentos de sobrevivencia fueron tan bajos que decidimos no incluir este análisis en ellos. Al culminar las 240 h de observación, lo cual fue tomado como punto crítico, a las ratas se les practicó la eutanasia bajo atmósfera de éter.

Análisis Estadístico

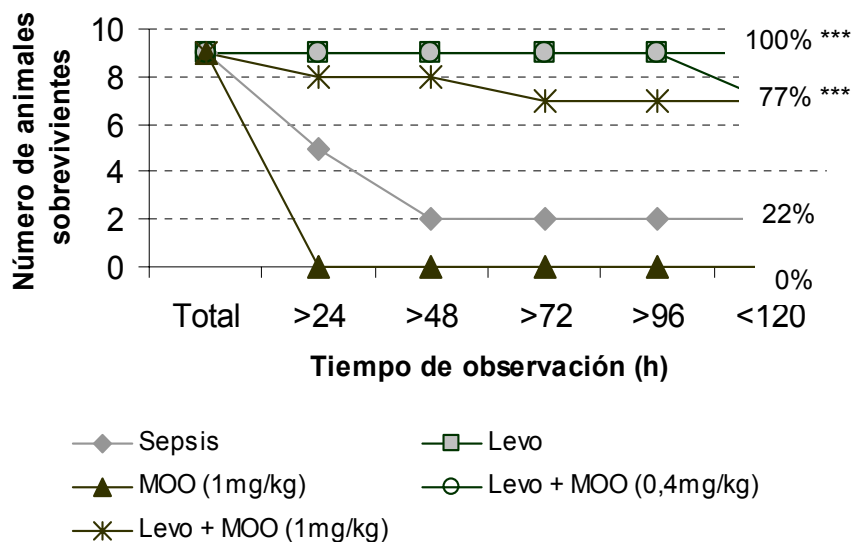
Los resultados de por cientos de sobrevivencia fueron procesados mediante el paquete estadístico NCSS y se les realizó la prueba de Fisher. Mientras que los datos correspondientes al peso de los animales se les realizó la prueba de Mann Whitney.

Resultados

Los grupos tratados con levofloxacin y ozono y el grupo de animales tratados solo con antibiótico, después de la inducción de la sepsis peritoneal, mostraron por cientos de sobrevivencia entre el 100 y el 77 % hasta las 120 h. Es de destacar que la muerte de los animales comenzó a ocurrir a partir de las 48 h. En el grupo control positivo, al cual se le induce la sepsis y no recibe ningún tratamiento, se observó un porcentaje de sobrevivencia del 22 % a las 48 h, lo cual demuestra la alta letalidad de dicho modelo experimental de sepsis peritoneal. Igualmente se observó una alta letalidad en el grupo tratado con ozono solamente,

con un por ciento de sobrevivencia del 0 % a las 24h después de inducido el choque séptico (Grafico 1).

Grafico 1. Efecto del tratamiento con la mezcla ozono/oxígeno combinado con levofloxacin sobre la sobrevivencia hasta las 120 h en ratas con peritonitis.



*** Significación estadística para $p < 0,001$ con respecto al control con sepsis. Levo – Levofloxacina. MOO - mezcla ozono/oxígeno

El análisis estadístico reflejó diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre el control con sepsis y los grupos tratados con levofloxacina y los otros dos grupos tratados con levofloxacina más la mezcla ozono/oxígeno, no existiendo diferencias estadísticas entre los grupos tratados con antibiótico solamente y los que recibieron la combinación con ozono y antibiótico. En el análisis del por ciento de sobrevivencia que se realizó a las 240 h después de la inducción del choque séptico se observó que en los grupos tratados con antibiótico y ozono los por cientos de sobrevivencia disminuyeron con respecto al análisis realizado a las 120 h, pero a pesar de esto se mantuvieron altos entre 66 y 77 %, lo que demuestra la efectividad del tratamiento combinado. Sin embargo, no se comportó igual, el grupo tratado solo con antibiótico, en el cual se observó una disminución de la sobrevivencia hasta un 33 %. (Grafico 2). El análisis estadístico realizado a las 240 h, demostró el incremento de la sobrevivencia reportado para los grupos tratados con levofloxacina y ozono a diferentes dosis (0,4 y 1 mg/kg), siendo altamente significativo ($p < 0,001$) con respecto al control con sepsis y el tratado solamente con levofloxacina. No existan diferencias entre las diferentes dosis de ozono aplicadas.

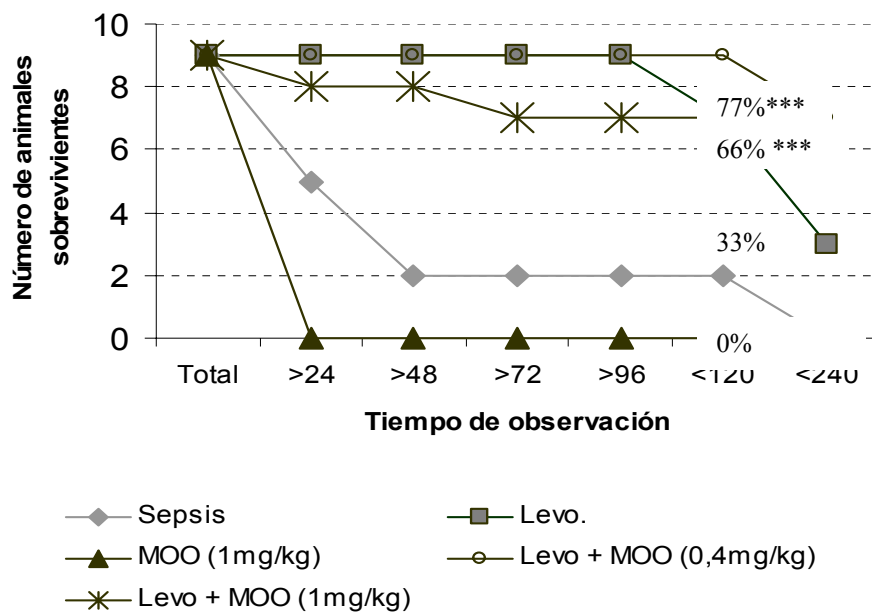
El análisis estadístico entre los pesos iniciales y finales para cada uno de los grupos reflejó, que en los grupos tratados con antibiótico y la mezcla ozono/oxígeno (1 y 0, 4 mg/kg) hubo una disminución significativa de los pesos de los animales, siendo de 21,5 y 16,8 %, respectivamente, mientras que con el grupo tratado con antibiótico solamente, no hubo diferencia estadísticamente significativas observándose una disminución del peso corporal de un 11 % (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis del peso de los animales para los grupos 2, 4 y 5.

Grupos	Peso inicial (g) (Me ± DE)	Peso final (g) (Media ± DE)	Disminución (%)	p
Levo (12,5 mg/kg)	199,6 ± 12,01	178,6 ± 6,40	11	0,075
Levo (12,5 mg/kg) + MOO (0,4 mg/kg)	213,11 ± 14,61	177,28 ± 12,26	16,8	0,0012
Levo (12,5 mg/kg) + M (1 mg/kg)	212,11 ± 33,89	166,4 ± 16,69	21,5	0,0023

Los datos del peso final fue analizado a las 240 h. Levo: Levofloxacina, MOO: Mezcla ozono/oxígeno.

Grafico 2. Efecto del tratamiento con la mezcla ozono/oxígeno combinado con levofloxacin sobre la sobrevivencia hasta las 240 h en ratas con peritonitis.



*** Significación estadística para $p < 0,001$ con respecto al control con sepsis.
Levo – Levofloxacin. MOO - Mezcla ozono/oxígeno

Discusión

Nuestros resultados demuestran la efectividad de la combinación de la MOO combinada con antibiótico en un modelo de peritonitis en ratas, lo cual constituye el primer reporte sobre la efectividad de la ozonoterapia aplicada terapéuticamente y de forma combinada en un modelo de sepsis peritoneal. Otros recientes reportes sobre el uso de la ozonoterapia en este modelo han sido publicados por nuestro grupo de trabajo, pero han sido referidos a la aplicación del ozono como acondicionamiento oxidativo,¹¹⁻¹⁴ es decir su aplicación de forma preventiva y no terapéuticamente. En estos estudios se demostró que el POO incrementa la sobrevivencia de los animales a los cuales se les induce una sepsis peritoneal letal¹¹ y utilizando este mismo modelo de sepsis. Se evaluó el POO combinado con Tazobactam, donde igualmente se incrementó la sobrevivencia de los animales, lo cual se demostró que fue mediado por un efecto inmunomodulador de la terapia combinada sobre la expresión de las citocinas proinflamatorias (FNT e IL-1), tanto en tejido hepático como esplénico.¹⁴ Por otra parte, se demostró que el POO en un modelo de choque endotóxico en ratón, estimuló la actividad de enzimas antioxidantes en el tejido hepático.¹²

Cuando la MOO se aplicó como único agente, no fue efectivo, por lo que debe ser aplicado terapéuticamente como terapia combinada con antibiótico. Este resultado pudiera deberse a que el ozono, al contactar con la pared celular de las bacterias presentes en la disolución de materia fecal previamente inoculada intraperitonealmente, acelera la liberación de la endotoxina, la cual pasa a la sangre rápidamente produciéndose una muerte acelerada por endotoxemia. Esta hipótesis será evaluada en ulteriores estudios.

Algunos estudios clínicos han reportado que el tratamiento con levofloxacin tiene un 95 % de efectividad en los pacientes.¹⁷

Yagel y col. 1996, demostraron la efectividad de la levofloxacin en el tratamiento de sepsis en el ratón inducida por *Pseudomonas aeruginosa*. Las dosis efectivas de levofloxacin estuvieron en un rango desde 3.71 hasta 16.98 mg/kg, para el 50 % de protección de los animales infectados.¹⁸

Teniendo en cuenta, tanto los estudios donde el ozono es aplicado en forma de acondicionamiento oxidativo en modelos de choque séptico y este estudio donde el ozono es aplicado de forma terapéutica (después de la inducción de la peritonitis), podemos decir que ambas formas terapéuticas de aplicar el ozono actúan por diferentes mecanismos de acción. Así por ejemplo, cuando el ozono es aplicado preventivamente, su acción es sobre un organismo sano, por tanto es capaz de preparar al organismo (tanto desde el punto de vista inmunológico como bioquímico) para enfrentar la sepsis que se va a inducir posteriormente. Mientras que cuando se aplica después de la inducción de la sepsis su acción es directamente sobre los microorganismos y sus estructuras, puesto que este modelo de choque séptico se caracteriza por ser agudo y con una alta letalidad. Además, lograr una modulación previa en la expresión de diferentes sistemas moleculares de defensa del organismo es muy difícil, por la rapidez con que estos sistemas de defensa responden ante una agresión determinada.

Teniendo en cuenta, que el peso de los animales es un factor importante dentro de la valoración del estado general del animal, podemos decir que, la disminución estadísticamente significativa entre el peso inicial y final observada en los grupos tratados con levofloxacina y MOO, pudiera ser debido, por una parte, a la alta letalidad producida en este modelo, por lo que a las 240 h, no se podría esperar la recuperación total de los animales, reflejada esta mediante la no disminución del peso corporal. Por otra parte tenemos que el número de animales que sobreviven en estos grupos fue altamente significativo, por tanto al tener mayor número de animales sobrevivientes, se espera un incremento de la diferencia entre el peso inicial y el final. También podemos destacar que la mayor disminución en los pesos fue obtenida en el grupo tratado con antibiótico y la MOO (1 mg/kg) que responde a la dosis más alta que fue estudiada, mientras que en la dosis de 0,4 mg/kg de MOO fue de un 16 %. Por tanto, se pudiera plantear que las dosis de la MOO más efectiva fue la más baja. A diferencia de esto, tenemos que en el grupo tratado con antibiótico solamente, la disminución del peso corporal de los animales no fue estadísticamente significativa, esto pudiera estar influenciado por la cantidad de animales que finalizaron el experimento, ya que la sobrevivencia de este grupo fue solo de un 33 %, mientras que en los grupos tratados con antibiótico y MOO estuvo entre un 77 y 66 % de sobrevivencia.

Este estudio demostró la efectividad de la combinación del tratamiento con ozono y un antibiótico de última generación. También se demostró que la aplicación única de la mezcla ozono/oxígeno de forma terapéutica por vía intraperitoneal en este modelo de sepsis no debe ser utilizado, por lo que valoramos realizar otros estudios con dosis diferentes y analizar otras vías de administración del gas.

Bibliografía

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker, CG, Carcillo J and Pinsky RM. The epidemiology of severe sepsis in the United States: analyses of incidence, outcome and associated cost of care. *Crit Care Med* 2002; 29: 1303-1310.
2. Añel RL and Kumar A. Experimental and emerging therapies for sepsis and septic shock. *Expert Opin Investing Drugs* 2001; 10(8): 1471-1485.
3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348:1546-54.
4. Ziegler EJ, Fisher CJ, Sprung CL et al. Treatment of gram-negative bacteriemia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. *N Engl J Med* 1991; 324:429-436.
5. Greenman RL, Schein RMH, Martin MA et al. A controlled clinical trial of ES murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis. *JAMA* 1991; 266:1097-1102.
6. Fischer CJ, Opal SM, Dhainaut J-F et al. Influence of an antitumoral necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. *Crit Care Med* 1993; 21:318-327.
7. Fisher CJ, Slotman GJ, Opal SM. Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: A randomized, open-label, placebo controlled multicenter trial. *Crit Care Med* 1994; 22:12-21.

8. Bocci V: Ozonization of Blood for the therapy of viral diseases and Immunodeficiencies. A hypothesis. Medical Hypotheses 1992;39:30-34.
9. Bocci V, Luzzi E, Corradeschi F, Paulesu L, Rossi R, Cardaioli E et al. Studies on the biological effects of ozone: 4 Cytokine production and glutathione levels in human erythrocytes. J Biol Regulat Homeost Agents 1993;7:133-138.
10. Bocci V, Luzzi E, Corradeschi F, Silvestri S. Studies on the biological effects of ozone: 6 Production of transforming growth factor by human blood after ozone treatment. J Biol Regulat Homeost Agents 1994;8:108-112.
11. Schulz S, Zamora Z, Mutters R, Menendez S, Bette M. Repetitive pneumoperitoneum with ozonized oxygen as a preventive in letal polymicrobial sepsis in rats. European Surgical Research 2003;35:26-34.
12. Zamora ZR, Borrego, López OY, Delgado R, Gonzalez R, Menéndez S, Schulz S and Hernández F. Effects of ozone oxidative preconditioning on Tumor Necrosis Factor-alpha release and antioxidant-prooxidant intracellular balance in mice during endotoxic shock. Mediat Inflamm 2005;14(1):16-22.
13. Zamora ZB, Borrego A, López OY, Delgado R, Menéndez S, Schulz S and Hernández F. Inhibition of Tumor Necrosis Factor-alpha release during endotoxic shock by ozone oxidative preconditioning in mice. Arzneim-Forsch Drug Res 2004;54(2):906-909.
14. Bette M, Nüsing MR, Mutters R, Zamora Z, Menendez S, Schulz S. Efficiency of tazobactam/piperacillin in letal peritonitis is enhanced after preconditioning of rats with O₃/O₂-pneumoperitoneum. Shock 2006;25(1):23-29.
15. North DS, Fish DN, Redington JJ. Levofloxacin, a second-generation fluoroquinolone. Pharmacotherapy 1998;18(5):915-935.
16. Davis R, Bryson HM. Levofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy. Drugs 1994;47(4):677-700.
17. Preston SL, Drusano GL, Berman AL, Fowler CL, Chow AT, Dornseif B et al. Pharmacodynamics of levofloxacin: a new paradigm for early clinical trials. JAMA 1998;249(2):125-129.
18. Yagel SK, Barret JF, Amaratunga DJ, Frosco MB. In vivo oral efficacy of levofloxacin for treatment of systemic pseudomonas aeruginosas infections in a murine model of septicemia. Antimicrob Agents Chemother 1996;40(12):2894-2897.

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria (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> o en **REDVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Se dispone de la posibilidad de recibir el Sumario de cada número por **correo electrónico** 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> y **REDVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Veterinaria Organización S.L.® - (Copyright) 1996-2007- E_mail: info@veterinaria.org