

Alteraciones histológicas en riñones de ratas, inducidas por dosis bajas del veneno de la serpiente *Bothrops asper*. Histological injuries in rat's kidneys induced to low dose of snake's poison *Bothrops asper*.

Reyes, Adriana: Universidad Simón Bolívar. Departamento de Estudios Ambientales. Laboratorio de genética de poblaciones. Sección invertebrados. Ecología de Vectores. Valle de Sartenejas. Edo. Miranda. Venezuela. Código postal 89000 adriserpientes@hotmail.com | **Aguilar, Liliana** | **Vargas Carmiña:** Universidad del Atlántico. Grupo de investigación Biología de Nutrientes. Departamento del Atlántico. Colombia | **Peinado Álvaro:** Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses seccional Barranquilla.

Resumen

El objetivo del trabajo fue demostrar que dosis bajas del veneno de *Bothrops asper* pueden causar patologías renales que se acentúan con el tiempo de exposición al veneno, especialmente a nivel glomerular. Se emplearon cinco grupos de ratas de cinco individuos cada uno, los cuales fueron inoculados con una dosis de veneno de 2.1µg/g de peso (por vía intraperitoneal), con adición de un grupo control, al cual se le inyectó solución salina. A los animales se les practicó la eutanasia secuencialmente (1, 48, 96, 144 y 288 horas). En cada tiempo se extrajeron los riñones del grupo seleccionado, para procesarlos con técnicas de coloración (HE – PAS). Con el diagnóstico histopatológico se evidenció en la primera hora glomérulos congestionados con tumefacción, después de 48 horas se presentó una glomerulonefritis, seguida de un colapso glomerular a las 96 horas. Las patologías se evidenciaron mas en los últimos períodos de experimentación; a las 144 horas se observó glomerulonefritis membranosa y proliferativa endocapilar culminando con la desaparición de la cápsula de Bowman y la estructura total del glomérulo a las 288 horas. Se concluye que cantidades bajas del veneno pueden causar patologías renales progresivas con el paso del tiempo.

Palabras claves: riñón | por patologías progresivas | dosis baja | veneno | *Bothrops asper* |

Abstract

Aim of this work was to demonstrate that low doses of *Bothrops asper* venom can cause pathologies that progress over time on the renal tissue, at the glomerular level especially. Five groups of rats consisting of five individuals were used and a single dose of poison 2.1µg/g in weight was injected. Control group was injected with saline solution. Euthanasia sequentially was practiced (1, 48, 96, 144 and 288 hours). In each time was extracted the kidneys of group selection, to procession with color's techniques (HE – PAS). Histopathological diagnostic evidenced congested glomeruli with swelling in the first hour, after 48 hours a glomerulonephritis was presented, followed by a collapsed glomerular at 96 hours. Pathologies in last experimentation period were evident; at 144 hours glomerulonephritis membranous and proliferative endocapilar culminating with the disappearance of the Bowman capsule was observed and finally the entire structure of the glomerulus to 288 hours. We conclude that very low quantities of poison can cause progressive renal disease over time.

Keywords kidney | progressive pathologies | low dose | poison | *Bothrops asper* |

INTRODUCCIÓN

En América Latina, cerca del 90% de las mordeduras de serpientes son ocasionadas por el género *Bothrops*^{6, 25}. En Colombia, *B. asper* (mapaná) es la especie causante del 70 al 90% de los cerca de 3.000 accidentes ofídicos informados cada año y muchos otros solo dejan secuelas²⁷. En el país, *B. asper* es conocida popularmente como mapaná, triple equis o barba amarilla, esta especie es la que inocula la mayor cantidad de veneno y la que presenta mayor potencia tóxica dentro de este género^{2, 5, 21, 26}. En el Departamento del Atlántico se presenta un gran número de casos por mordedura de esta serpiente y los municipios de mayor incidencia son Tubará, Luruaco, Sabanalarga y Puerto Colombia^{7, 20}.

Los efectos fisiopatológicos de los envenenamientos son complejos y varían de acuerdo al grupo zoológico al que pertenezca el ofidio agresor^{1, 9}. Existen diferencias en la proporción y composición química del veneno de serpientes pertenecientes a una misma

especie, que estén distribuida en diferentes áreas geográficas^{1, 23}. La edad de la serpiente parece que influye igualmente en las diferencias enzimáticas y de composición del veneno, según lo indican estudios¹⁶.

Desde el momento del nacimiento, las serpientes poseen una secreción salival que consiste en una mezcla compleja de sustancias, compuesta por una serie de enzimas y toxinas utilizada para la captura de la presa y digestión de la misma, estas secreciones también son utilizadas como un mecanismo de defensa, en los que ocasionalmente está implicado el hombre¹⁸.

El daño renal es una secuela asociada a distintos venenos ofídicos, en su etiología han sido señalados los efectos de agentes nefrotóxicos directos, el desarrollo de coagulación intravascular diseminada y la acción de enzimas proteolíticas y sustancias vasoactivas que actuarían sobre las células epiteliales tubulares^{2, 3, 4, 10, 11, 15, 17}. El veneno de las serpientes *Bothrops* inoculado a una dosis baja no ocasiona daños aparentemente visibles e inmediatos, sin embargo permanecen en la circulación renal las toxinas a concentraciones mayores que las alcanzadas en el plasma debido a la disposición de la circulación renal y a la función que este lleva a cabo^{13, 19}.

Se ha observado en riñón de ratas inoculadas con veneno de diferentes especies de *Bothrops*, necrosis tubular, degeneración granulohialina, lesiones del glomérulo, túbulos distales, túbulos colectores e intersticio que llevan en muchos de los casos a una insuficiencia renal aguda provocando la muerte cuando la cantidad de veneno inoculado es alta^{1, 5, 13, 22, 30}.

Los venenos de otras especies de *Bothrops* a dosis mínimas ocasionan histopatologías renales en los primeros momentos de exposición al veneno, presentándose degeneración hídrica en las células epiteliales de los túbulos, acompañados de cilindros hialinos en la luz tubular, dilatación de la luz y congestión renal y en horas posteriores se describe necrosis del epitelio tubular acompañado de daño glomerular¹⁴.

Todavía no existen reportes de los efectos nefrotóxicos observados en diferentes horas de exposición tras la inoculación de una dosis baja de veneno de *B. asper* originaria del Caribe colombiana. Por consiguiente el objetivo del presente trabajo, fue describir las alteraciones histopatológicas renales que produce el veneno de la *B. asper* a una dosis baja inoculada en ratas (*Rattus norvegicus*), a diferentes tiempos de exposición de hasta doce días, pues las concentraciones séricas circulantes oscilan entre siete a diez días²⁴.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajo con ratas hembras (*Rattus norvegicus*) adultas de 238 ± 50 g de peso, obtenidas del Bioterio de la Universidad del Norte (Barranquilla). Los animales fueron mantenidos en condiciones ambientales controladas con temperatura de 24 ± 2 °C, se les suministro dieta para conejos con acceso constante al agua *ad libitum*. Los animales fueron divididos en cinco grupos de cinco individuos cada uno, correspondientes a los diferentes tiempos de exposición al veneno: 1, 48, 96, 144 y 288 horas; después de la inoculación de 2.1µg/g de peso del animal. También se tuvo un grupo control de cinco ratones inoculados únicamente con solución salina.

A través del procedimiento de Screening de Smith⁵ se determinó la dosis baja a utilizar, partiendo de la menor concentración del rango de la DI_{50} hallada para *B. asper*, el cual consistió en administrar vía (im) gastrocnemio a grupos de tres individuos dosis de 2.1, 1.9, 1.7, 1.5, y 1.3 µg/gr. peso del animal, respectivamente, y un grupo control al que solo se le aplico solución salina. Después de 20 días todos los animales sobrevivieron a las dosis aplicadas, sin presentar anomalías físicas observables a simple vista, por tanto se escogió la dosis mayor para el trabajo, es decir, la de 2.1 µg /g peso del animal.

El veneno liofilizado utilizado fue obtenido de ejemplares adultos de *B. asper*, originarios de la Región Caribe Colombiana provenientes de un zocriadero comercial. Se realizó una solución madre de 0.25 g de veneno en un volumen total de 100 ml de solución salina. La inoculación del veneno se hizo en horas sucesivas el mismo día por vía (im) gastrocnemio. Después de la inoculación del veneno cada grupo se marcó y se observó hasta su respectivo tiempo de exposición y práctica de la eutanasia por dislocación cervical, realizándose inmediatamente la disección ventral donde se extrajeron y fijaron los dos riñones en formalina tamponada al 10 % con pH 7.2 por 24 – 48 horas y con formalina alcohólica al 10 %, en igual tiempo. Luego las muestras se deshidrataron con alcohol Isopropílico (85%, 90%, 95%, 100%) por 45 minutos. Se incluyeron en parafina (58-60°C) por tres horas, y una vez que solidificó se realizaron los cortes en un micrótopo marca Leitz de 4 a 8µ (micras). Los cortes realizados se recogieron en un baño de flotación con gelatina a una temperatura de aproximadamente 60 °C y se fijaron a portaobjetos. Luego los cortes se colorearon con hematoxilina – eosina (HE) y ácido periódico de Schiff (PAS). Las alteraciones histopatológicas presentes en el tejido se observaron por medio de los microscopios ópticos Leica Galen III y el microscopio Olympus con cámara incorporada a 40x²⁹.

RESULTADOS

Hasta el momento de su sacrificio todas las ratas estuvieron activas y no mostraron alteraciones en su comportamiento habitual. Las lesiones del tejido renal se presentaron a partir de la primera hora y se acentuaron hasta las 288 horas (Tabla.1). Después de inocular la dosis de veneno de *B. asper* se reveló la presencia de tumefacción en los glomérulos y congestión (Fig.1.A). Posterior a un lapso de 48 horas, se observó una fibrosis celular, congestión capilar y glomerulonefritis endocapilar difusa de etapa inicial, que se caracteriza por un ligero aumento celular a nivel de todos los glomérulos, con presencia de cilindros hialinos (Fig.1.B). Los animales sacrificados a las 96 horas, mostraron glomerulonefritis proliferativa endocapilar difusa en media luna, con desaparición de segmentos de la cápsula de Bowman, ligera hiper celularidad y colapso glomerular (Fig.1.C.). Transcurridas 144 horas de exposición al veneno se hicieron evidentes lesiones más pronunciadas donde se observa un colapso del glomérulo, proliferación mesangial con glomerulonefritis membranosa y proliferativa endocapilar (Fig.1.D.). A las 288 horas se observaron cilindros hialinos gigantes con dilatación tubular, infiltrado inflamatorio (a nivel vascular), hiper celularidad glomerular (en paredes de los capilares), con glomerulonefritis membrano-proliferativa, hiper celularidad y por último se evidencia la desaparición de la cápsula de Bowman (Fig.1.E, 1.F y 1.G). Estas observaciones contrastan con los cortes histológicos del grupo control, a los cuales no se les observaron daños renales (Fig.1.H).

Tabla 1. Alteraciones renales evidenciadas por el veneno de la *B. asper* en la mayoría de los riñones de ratas a través de las diferentes horas.

ALTERACIONES RENALES A TRAVÉS DE LAS HORAS	HE					PAS				
	1	48	96	14 4	28 8	1	48	96	14 4	28 8
Tumefacción en los glomérulos	X									
Congestión Glomerular	X	X	X	X	X	X	X			
Presencia de eritrocitos en el glomérulo		X	X							
Glomerulonefritis exudativa		X					X			
Glomerulonefritis endocapilar difusa		X	X					X		
Cilindros hialinos en los túmulos		X	X		X					X
Presencia de neutrófilos en el glomérulo			X		X					
Ligera hiper celularidad			X							
Colapso glomerular				X				X		
Glomérulo polinuclear				X						
Gloméruloesclerosis										X
Proliferación mesangial				X						
Glomerulonefritis proliferativa endocapilar				X					X	X
Glomerulonefritis membranosa				X					X	X
Desaparición de la Cápsula de Bowman					X			X		
Túbulos dilatados					X					
membrana basal del glomérulo gruesa					X					
Hiperplasia endotelial (Arteria)					X					
Hinchazón de las células en el glomérulo					X					
Discretas áreas de infiltrado inflamatorio					X					
Congestión tubular					X					
Fibrosis celular							X			

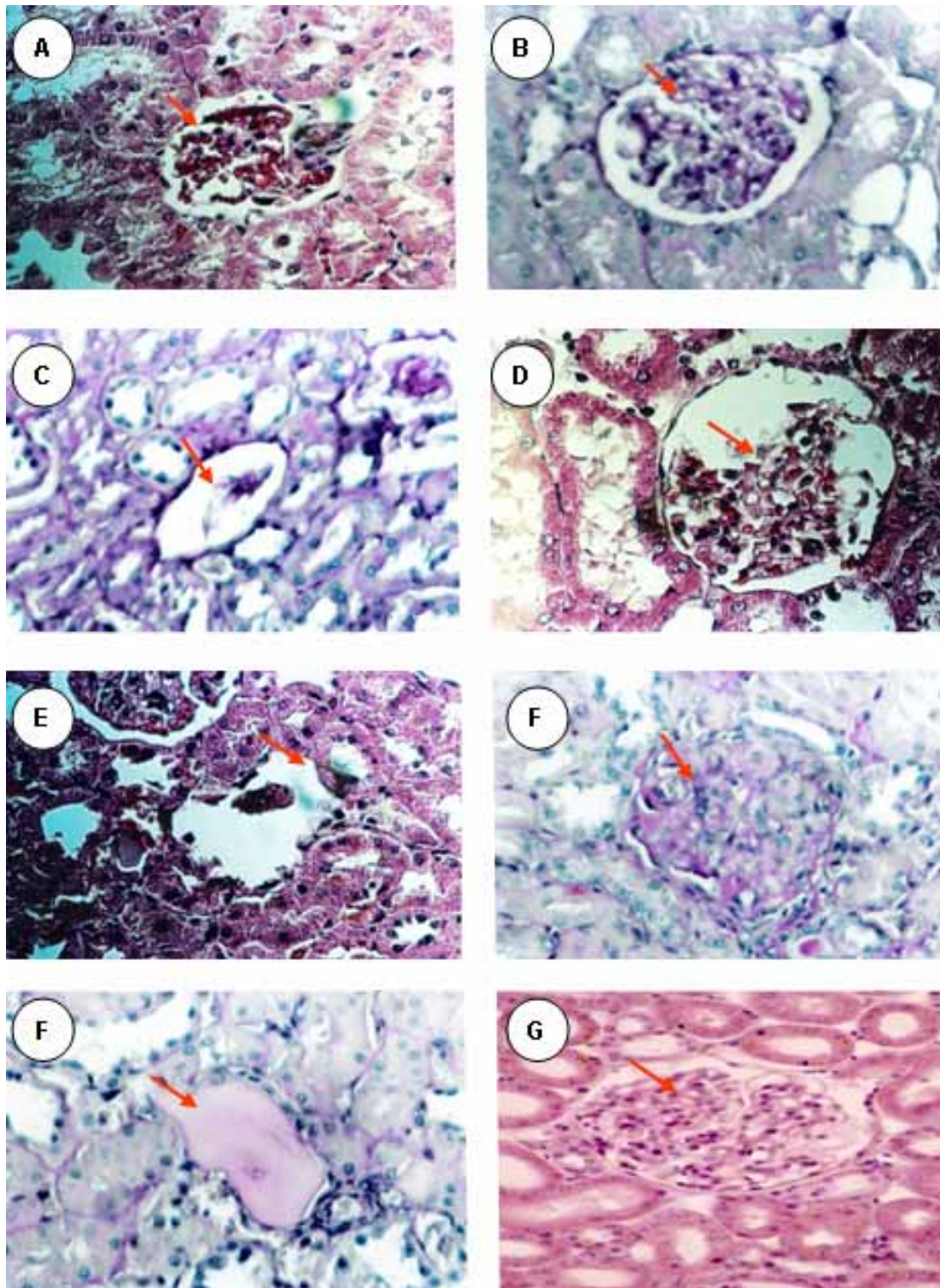


Figura 1. Cortes histológicos de riñones de ratas (*Rattus norvegicus*) después de una inoculación con 2.1 µg de veneno de la serpiente *Bothrops asper* a diferentes horas; A. 1 hora hay evidencia de glomérulos congestionados con tumefacción. HE; B. 48 horas presencia de glomérulo nefritis y congestión capilar en el glomérulo. PAS; C. 96 horas se observa colapso Glomerular. PAS; D. 144 horas Glomerulonefritis membranosa, neutrófilos y Eritrocitos. HE; E. 288 horas se evidencia desaparición de la capsula de Bowman y estructura total del glomérulo. HE; F. 288 horas se observa engrosamiento de la membrana basal con Glomerulonefritis membranoproliferativa. PAS; G. 288 horas hay cilindros hialinos gigantes en los túbulos. PAS; H. Riñón sin veneno. Glomérulo y túbulos normales. HE. 40x

DISCUSIÓN

Se demostró que una dosis baja de veneno de *B. asper* puede causar alteraciones renales progresivas de forma directa o indirecta en el transcurso de las horas subsiguientes a su administración. Los hallazgos patológicos se encontraron desde la presencia de cilindros hialinos, colapso glomerular, infiltrado inflamatorio, túbulos dilatados y varios tipos de glomerulonefritis hasta la desaparición de las cápsulas de Bowman en el riñón. Estas patologías concuerdan parcialmente con los informes de distintos investigadores en estudios similares realizados con la serpiente *B. asper* y otras especies de *Bothrops* de Argentina, Brasil y México, en los cuales se señala el daño glomerular y tubular del riñón, pero por la inducción de dosis altas del veneno administrado por la misma vía (im)^{4, 12, 13, 15}.

Los resultados evidenciaron progresión histopatológica a partir de las 48 horas de exposición al veneno hasta las 288 horas cuando finaliza el seguimiento, esto es posiblemente por una acumulación a nivel del glomerulo de enzimas proteolíticas que componen el veneno de *B. asper*⁵. El mecanismo de ciertas proteínas puede ser de acción directa sobre los factores de coagulación como la L-Arginina hidrolasa, que puede activar directamente al fibrinógeno y algunas pueden actuar sobre las membranas celulares y el endotelio vascular⁸. En este sentido, el veneno de *B. asper* es altamente hemotóxico, por su composición en metaloproteinasas que activan los factores X y II de la coagulación y sustancias parecidas a la trombina^{5, 8, 23, 30}.

La disposición de la circulación renal hace que sustancias tóxicas y de desecho se filtren en este órgano¹⁹ y por consiguiente se alcancen concentraciones altas de proteínas y otras sustancias que hacen parte del veneno, lo que provocaría más daño a nivel del glomérulo²¹. Por consiguiente, estos hallazgos histopatológicos podrían ocasionar con el transcurso del tiempo una insuficiencia en el filtrado glomerular crónica o a una enfermedad renal severa que puede llevar a la muerte, observación que puede ser de gran utilidad en el manejo, tratamiento y seguimiento de accidentes ofídicos por *B. asper* en asentamientos humanos de la Costa Norte de Colombia, teniendo en cuenta la similitud de las estructuras renales entre muchos grupos de vertebrados, en cuanto a su constitución anatómica y fisiológica²⁸.

La valoración del daño del tejido renal en este estudio fue únicamente histológica, aunque es conveniente ser valorado también fisiológicamente a través de indicadores fisicoquímicos y bioquímicos, urinarios o séricos. Sin embargo, estudio relatado en la literatura utilizando veneno Bothrópico en ratas, muestran que determinaciones en suero de creatinfosfoquinasa, creatinina y urea, fueron alteradas solamente las primeras seis horas de exposición al veneno, pero a las

12 horas vuelven a la normalidad hasta las 24 horas y continuaron normales hasta la cuarta semana de la inoculación. Pero con los cortes histológicos de los riñones se deduce un cambio de la función renal ya que se observaron lesiones degenerativas del epitelio tubular, no evidenciado a través de las técnicas clínicas convencionales¹⁴.

CONCLUSIONES

La inoculación de una dosis baja del veneno de la mapanà (*B. asper*), indujo a la progresión de alteraciones histológicas degenerativas en el riñón de las ratas (*R. norvegicus*), especialmente en el glomérulo. Los hallazgos histopatológicos se evidenciaron mejor con la técnica de laboratorio PAS.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Ángel R.** 1982. Serpientes de Colombia; Guía práctica para su clasificación y tratamiento del envenenamiento causado por sus mordeduras. *Rev Fac Agron* 36: 7-171.
2. **Badilla B, Chávez F, Poveda L, Jiménez S, Rodríguez G.** 2006. Efecto de plantas usadas etnomedicamente sobre la actividad hemorrágica y proteolítica inducida por *Bothrops asper*. *Rev Cubana Plant Med* 11: 1-7.
3. **Castro O, Gutiérrez J, Barrios M, Castro I, Romero M, Umaña E.** 1999. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpientes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. *Rev. Biol. Trop* 47: 597-607.
4. **Castro I, Burdmann EA, Seguro AC, Yu L.** 2004. Bothrops venom induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. *Toxicon* 43: 833-839.
5. **De Roodt A, Ramirez E, Paniagua J, Litwin S, Saucedo A, Dolab J., et al.** 2005. Toxicidad de venenos de serpientes de importancia medica en México. *Gac. Méd. Méx* 141: 13-21.
6. **De Roodt, Estévez J, Dolab J, Manzanelli M, Piñeiro N, Paniagua J, Urs A.** 2006. Características biológicas e inmunológicas del veneno de *Bothrops cotiara* (Serpentes: Viperidae). *Rev Biol Trop* 54: 889-901,
7. **Gobernación del Atlántico.** 2008 - boletines de prensa N° 1351. Encuentro de toxicología para manejo de picaduras de serpiente. Obtenido Octubre 15 de 2008. De www.atlantico.gov.co/prensa/ver_bol.asp
8. **Gutiérrez J, León G, Rojas G, Lomonte B, Rucavado A, Chaves F.** 1998. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 36: 1529-1538.
9. **Alape-Girón A, Sanz L, Escolano J, Flores-Díaz M, Madrigal M, Sasa M, Calvete JJ.** 2008. Snake venomomics of the lancehead

- pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *J Proteome Res* 7: 3556-71.
10. **Guzmán F, Villegas E, Villegas N, Márquez L.** 1999. Insuficiencia renal posterior a emponzoñamiento ofídico: Evaluación de la nefrotoxicidad del veneno de *Bothrops atrox* en la rata albina. *Med crit venez* 9: 13-7.
 11. **Havt A, Fonteles M, Monteiro H.** 2001. The renal effects of *Bothrops jaraacussu* venom and the role of PLA2 and PAF blockers. *Toxicon* 39: 1841-6.
 12. **Koscinczuk P, Levia L, Maruñak S, Acosta O.** 2001. Identificación de pigmentos urinarios en la intoxicación de ratas con veneno de *Bothrops neuwiedii* mediante cromatografía de filtración molecular. Congreso de Asociación Toxicológica Argentina (ATA), Rosario, 25 y 26 de septiembre.
 13. **Koscinczuk P, Teibler P, Borda J, Maruñak S, Acosta O.** 2004. Alteraciones histopatológicas del tejido renal inducidas por el veneno de la serpiente *Bothrops neuwiedii*, *Bothrops alternatus*, *Crotalus durissus terrificus* en ratas. Congreso de Asociación Toxicológica Argentina (ATA), Rosario, 25 y 26 de septiembre.
 14. **Koscinczuk P, Borda J, Maruñak S, Acosta O, Mussart N.** 2004. Daño renal en ratas inducido por veneno de *Bothrops diporus* de Argentina. *Medicina* 64: 320-324.
 15. **Koscinczuk P, Ortega H, Daillard B, Mussart N.** 2007. Valoración bioquímica, histopatológica e inmunohistoquímica del daño renal causado por veneno de *Bothrops neuwiedii* en ratas. *Rev Vet* 18: 14-19.
 16. **Málaga O, Pantigoso C, Morante Y, Heredia V, Cárdenas J, Yarlequé A.** 2000. Variaciones en la composición proteica, actividades enzimáticas y biológicas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (vipereidae) en relación con la edad. *Rev Per Biol* 7: 161-170.
 17. **Machado Braga MD, Costa Martins AM, Alves CD, de Menezes DB, Martins RD, Ferreira Barbosa PS, de Sousa Oliveira IM, Toyama MH, Toyama DO, Dos Santos Diz Filho EB, Ramos Fagundes FH, Fonteles MC, Azul Monteiro HS.** 2008. Purification and renal effects of phospholipase A(2) isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon* 51: 181-90.
 18. **Maruñak S, Ruíz Raquel, Teibler Gladys, Gay C, Leiva L, Acosta P.** 2006. Acción del veneno de *Bothrops jararacussu* de Argentina sobre la coagulación sanguínea. *InVet* 8: 1-12.
 19. **Molitoris B, Finn F.** 2001. Acute renal failure. A companion to Brenner and Rector's *The Kidney*. Ed. Molitoris BA. Philadelphia, p. 535.
 20. **Naissir L.** 2005. Accidente ofídico en el Atlántico. *Rev. Gente Caribe*. Edición 367, 5-6.
 21. **Otero R.** 1994. Manual de diagnóstico y tratamiento del accidente ofídico. Medellín. Ed. Univ. de Antioquia, Yuluka/Medicina, p. 87.

22. **Otero Rafael, Ángel R, Mejía M.** 1998. Toxinas y envenenamiento por animales, plantas y microorganismos. Primer simposio colombiano de toxinología. Ed. Ecográficas limitada. Medellín, p. 169-178.
23. **Saldarriaga MM, Otero R, Núñez V, Toro MF, Díaz A, Gutiérrez JM.** 2003. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon* 15: 405-11.
24. **Otero R.** 2002. Ventajas del huso de antivenenos de tipo IgG, F (ab^{''})₂ o fab en picaduras de escorpiones y mordeduras de serpientes. *Rev Pediatría* 37: 8 -16.
25. **Otero R, Silva J, Barona M, Toro M, Quintana J, Díaz A.** 2007. Accidente Bothrópico en Colombia: estudio multicéntrico de la eficacia y seguridad de Antivipmyn-Tri®, un antiveneno polivalente producido en México. *IATREIA* 20: 244-262.
26. **Otero R, León G, Gutiérrez JM, Rojas G, Toro MF, Barona J, Rodríguez V, Díaz A, Núñez V, Quintana JC, Ayala S, Mosquera D, Conrado LL, Fernández D, Arroyo Y, Paniagua CA, López M, Ospina CE, Alzate C, Fernández J, Meza JJ, Silva JF, Ramírez P, Fabra PE, Ramírez E, Córdoba E, Arrieta AB, Warrell DA, Theakston RD.** 2006. Efficacy and safety of two whole IgG polyvalent antivenoms, refined by caprylic acid fractionation with or without beta-propiolactone, in the treatment of *Bothrops asper* bites in Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100: 1173-82.
27. **Pereañez J, Jiménez S, Quintana J, Nuñez V, Fernandez M, Restrepo Y.** 2008. Inhibición de las actividades proteolítica, coagulante y hemolítica indirecta inducidas por el veneno de *Bothrops asper* por extractos etanólicos de tres especies de heliconias. *Vitae* 15: 157-164.
28. **Quino H, Velásquez M, Hurtado M, Urcia J, Hurtado A.** 1995. Ofidismo y falla renal. *Bol Soc Per Med Int* 8: 23-26.
29. **Stanley R, Ramzi C, Treviño V.** 1985. Patología estructural y funcional. Ed. interamericana. México, p. 1519.
30. **Teibler P, Acosta O, Maruñak S, Ruiz R, Koscinczuk P, Sánchez M, Mussart N.** 1999. Lesiones locales y sistémicas inducidas por veneno de *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) de Argentina, *Acta Toxicol Argent* 7: 7-10.

REDVET: 2009 Vol. 10, N° 9

Recibido 28.04.09 - Ref. prov. MAY050902 – Revisado 29.06.09 – Aceptado 17.07.09
Ref. def. 090912_RED VET - Publicado: 15.09.09

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090909.html>
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090909/090912.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> - <http://revista.veterinaria.org>