

BIBLIOGRAFÍA

1. ACKERMAN, L. (1986). Pemphigus and pemphigoid in dogs and cats. 2. A clinical survey. *Modern Vet. Pract.*, 67, 358-360.
2. BOURDEAU, P. (1992). La corticothérapie en dermatologie des carnivores. *Rec. Méd. Vét.*, 168, 627-644.
3. BRADLEY, G.A.; MAYS, M.B.C. Y CALDERWOOD-MAYS, M.B. (1990). Immunoperoxidase staining for the detection of autoantibodies in canine autoimmune skin disease; comparison to immunofluorescence results. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 26, 105-113.
4. CARLOTTI, D. (1989). Autoimmune mediated skin diseases. *J. Small Anim. Pract.*, 30, 223-227.
5. HALLIWELL, R.E.W. (1991). Rational use of shampoos in veterinary dermatology. *J. Small Anim. Pract.*, 32, 401-407.
6. HALLIWELL, R.E.W. Y GORMAN, N.T. (1989). Autoimmune and other immune-mediated skin diseases. En: *Veterinary clinical immunology*. W.B. Saunders, Philadelphia, 285-307.
7. HARVEY, R. (1991). Introduction to topical therapy. *In practice*, 13, 208-211.
8. KALAHER, K.M. (1992). The value of immunofluorescence testing. En: KIRK, R.W. Y BONAGURA, J.D., eds. *Current veterinary therapy. Small animal practice*. 11ª ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 503-505.
9. LAWSON, D.H.; LOWATT, G.E.; GURTON, C.S. Y HENNINGS, R.C. (1984). Adverse effects of azathioprine. *Adv. Drug React. Ac. Pois. Rev.*, 3, 161-171.
10. MULLER, G.H.; KIRK, R.W. Y SCOTT, D.W. (1989). Immunologic diseases. En: *Small animal dermatology*, 4ª ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 427-574.
11. SCHMEITZEL, L.P. (1991). Recognizing the cutaneous signs of immune-mediated diseases. *Vet. Med.*, 86, 138-163.
12. SCOTT, D.W.; WALTON, D.K.; LEWIS, R.M. Y SMITH, C.A. (1983). Pitfalls in immunofluorescence testing in dermatology. II. Pemphigus-like antibodies in the cat, and direct immunofluorescence testing of normal dog nose and lip. *Cornell Vet.*, 73, 275-279.
13. SCOTT, D.W.; WALTON, D.K.; MANNING, T.O.; LEWIS, R.M. Y SMITH, C.A. (1983). Pitfalls in immunofluorescence testing in canine dermatology. *Cornell Vet.*, 73, 131-136.
14. THOMPSON, J.P. (1989). Immunologic diseases. En: ETTINGER S.J., ed. *Textbook of veterinary internal medicine. Diseases of the dog and cat*. 3ª ed. Vol 2. W.B. Saunders, Philadelphia, 2297-2328.
15. TIZARD, I. (1987). Autoimmunity: specific diseases. En: *Veterinary immunology*. 3ª ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 337-355.
16. WERNER, L.L.; BROWN, K.A. Y HALLIWELL, R.E.W. (1983). Diagnosis of autoimmune skin disease in the dog: correlation between histopathologic, direct immunofluorescent and clinical findings. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 5, 47-64.

EXTRACTOS DE TRABAJOS PUBLICADOS EN OTRAS REVISTAS ESPECIALIZADAS

Mating and spawning of freshwater crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet) under laboratory conditions. (Apareamiento y oviposición del cangrejo de río (*Austropotamobius pallipes* Lereboullet) en condiciones de laboratorio).

CARRAL, J.M.; CELADA, J.D.; GONZÁLEZ, J.; SÁEZ-ROYUELA, M.; GAUDIOSO, V.R. 1994.

Departamento de Producción Animal, Universidad de León, Campus de Vegazana León, Spain.

Aquaculture and Fisheries Management, 25: 721-727. (1994)

RESUMEN

El estudio incluye datos sobre el apareamiento y la puesta del cangrejo de río *Austropotamobius pallipes* Lereboullet, obtenidos durante cuatro años consecutivos (1987-1990). Para ello, un total de 586 hembras, capturadas en poblaciones naturales, fueron trasladadas al laboratorio en diferentes fechas entre septiembre y octubre. Las densidades iniciales en la época de apareamiento fueron de 21 y 24 animales/m², siendo la relación machos:hembras de 1:2. Se obtuvieron elevados porcentajes de apareamiento (97.4-100%), excepto en 1989 (57.5%). En todos los años, la mayoría de los apareamientos (90%) se concentraron en un período de 8-12 días, con temperaturas medias del agua entre 12°C y 13.5°C. La oviposición tuvo lugar pocos días después del apareamiento (mínimo 2 días, máximo 14 días), a temperaturas medias del agua entre 8.2°C y 10.8°C. En los tres primeros años, casi el 100% de las hembras apareadas pusieron huevos. Sin embargo, en el cuarto año (1990), cuando la talla media de los cangrejos fue inferior, solamente el 72.4% de las hembras que se aparearon realizaron la oviposición. El número medio de huevos pleopodales fue 64 (máximo 220, mínimo 18). Su diámetro osciló entre 2.30 y 3.25 mm, (valor medio 2.78 mm.). El número de huevos pleopodales estaba correlacionado positivamente con la longitud del cefalotórax ($r=0.72$).

SUMMARY

The study includes mating and spawning data of freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* Lereboullet, obtained in four consecutive years (1987—1990). A total number of 586 wild-caught female were held under laboratory conditions at different dates in September—October. Initial densities at mating time were 21 and 24 crayfish/m² with a 1:2 male:female. ratio. High percentages of mating were obtained (974—100%) except in 1989 (57.5%). In all years, most of the matings (90%) were concentrated in a period of 8-12 days with mean water temperatures between 12°C and 13.5°C. Spawning took place a few days after mating (minimum 2

days, maximum 14 days) at mean water temperatures between 8.2°C and 10.8°C. In the first 3 years, almost 100% of mated females spawned. However, in the fourth year (1990), when the mean size of crayfish was smaller, only 72.4% of mated females spawned. The mean number of pleopodal eggs was 64 (maximum 220, minimum 18). Egg diameter ranged between 2.30 and 3.25mm (mean value 2.78mm). Pleopodal egg number was positively correlated with carapace length ($r= 0.72$).

The RTX haemolysins Apxl and Apxll are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. (Las hemolisinas RTX, Apxl y Apxll son factores de virulencia principales del patógeno porcino *Actinobacillus pleuropneumoniae*: demostración a partir de análisis mutacional).

RUBÉN I. TASCÓN, JOSÉ A. VÁZQUEZ-BOLAND, CÉSAR B. GUTIÉRREZ-MARTÍN, IGNACIO RODRÍGUEZ BARBOSA AND ELIAS F. RODRÍGUEZ FERRI.

Molecular Microbiology 14 (2), 207-216. (1994)

RESUMEN

Se investigó la implicación de las hemolisinas RTX (Apxl y Apxll) producidas por el microorganismo patógeno del cerdo *Actinobacillus pleuropneumoniae*, utilizando mutantes deficientes en hemolisina, construidos mediante un procedimiento de mutagénesis con un mini-Tn10. Se obtuvieron dos tipos de mutantes en la actividad hemolítica con inserciones únicas del transposón, a partir de una cepa del serotipo 1 productora tanto de Apxl como de Apxll. Un mutante presentaba una pérdida completa de la actividad hemolítica, como consecuencia de la falta de producción de Apxl y de Apxll. Otros mutantes manifestaban una actividad hemolítica más débil que el tipo salvaje y producían solamente Apxll. Las regiones cromosómicas flanqueantes al mini-Tn10 fueron clonadas y secuenciadas. En el mutante no hemolítico, el transposón se había insertado en el gen *apxB*, implicado en la exportación de las toxinas Apxl y Apxll. El mutante débilmente hemolítico resultó de la rotura del gen estructural para Apxl. Ambas mutaciones en el operón *apx* estaban asociadas con una pérdida significativa de la virulencia para ratones y cerdos, demostrando que las hemolisinas están implicadas en la patogenicidad de *A. pleuropneumoniae*. El mutante no hemolítico fue apatógeno y el mutante débilmente hemolítico retuvo alguna virulencia para los cerdos, sugiriendo que ambas hemolisinas Apxl y Apxll son necesarias para la expresión de la virulencia completa.

SUMMARY

The involvement of the RTX haemolysins (Apxl and Apxll) of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* in virulence was investigated using haemolysin-deficient mutants constructed by a mini-Tn10 mutagenesis procedure. Two types of haemolysin mutant with single insertions of the transposon were obtained from a serotype 1 strain producing both Apxl and Apxll. One presented a complete loss of haemolytic activity because of the absence of Apxl and Apxll production. The other displayed weaker haemolysins than the wild type and produced only Apxll. The chromosomal regions flanking mini-Tn10 were cloned and sequenced. In the non-haemolytic mutant, the transposon had inserted in *apxB*, a gene involved in the exportation of Apxl and Apxll. The weakly haemolytic mutant resulted from the disruption of the structural gene for Apxl. Both mutations in the *apx* operon were associated with a significant loss of virulence for mice and pigs, demonstrating that haemolysins are involved in *A. pleuropneumoniae* pathogenicity. The non-haemolytic mutant was apathogenic and the weakly haemolytic mutant retained some virulence for pigs, suggesting that both Apxl and Apxll are needed for full virulence.

Determination of Pentamidine in *Leishmania infantum* promastigotes by ion-paired chromatography. (Determinación de Pentamidina en promastigotes de *Leishmania infantum* mediante cromatografía líquida de pares iónicos).
B. RABANAL¹, R. G. DE ARRIBA¹, M. J. GARZÓN¹, R. M. REGUERA², R. BALAÑA-FOUCE², AND A. NEGRO^{1*}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

²Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología.

Universidad de León E-24071, León, Spain.

Journal of Liquid Chromatography 17, 2017-2029 (1994)

RESUMEN

La pentamidina es una diamidina aromática que ha mostrado recientemente ser un inhibidor del transporte de putrescina en protozoos parásitos. Para comprender dicho mecanismo se ha diseñado un método analítico de HPLC para determinar pentamidina en el interior de las Leishmanias.

Se han estudiado varios parámetros: composición de la fase móvil, pH, porcentaje de metanol y temperatura de la columna para la formación de pares iónicos con compuestos sulfónicos.

El procedimiento cromatográfico utiliza una columna de Nucleosil CX₁₈ de 5 µm, determinando el pico de pentamidina por su absorción ultravioleta a 261 nm. El pro-

cedimiento supone la limpieza de los extractos de *Leishmania infantum* crecidos con pentamidina mediante ultrafiltración con una membrana de polisulfona de 100,000 de tamaño de poro. El límite de detección encontrado para la pentamidina en extractos de *Leishmania infantum* fue 5,7 ng/ml.

SUMMARY

Pentamidine is an aromatic diamidine, which have recently been shown to be non-competitive inhibitors of putrescine uptake in parasitic protozoa. In order to understand the mechanism involved in Pentamidine uptake by parasitic protozoa cells, a HPLC analytical method for determination of pentamidine in *Leishmania infantum* promastigote cultures was developed.

The influence on the capacity factor of various characteristic parameters in the mobile phase such as pH, percentage of methanol and temperature of column is studied, taking into account that pentamidine can form ion-pairs with sulphonic compounds, the influence of the length of the lateral chain and concentration of various compounds of this type are also studied.

The results obtained in this study allow us to know the best chromatographic conditions for the determination of pentamidine in *Leishmania infantum* promastigotes and they can also be used for the optimization of analytical methods in order to determine pentamidine in other biological media or other complex mixtures.

The chromatographic procedure uses a reversed-phase column Nucleosil C₁₈ 5µm, the column effluent was monitored by ultraviolet-visible spectrophotometry at 261 nm. The procedure involves a simple method of the cleaning-up *Leishmania* promastigote extract samples cultured with pentamidine by ultrafiltration through a polysulfone membrane with 100,000 relative molecular mass cut-off. The method shows good recovery, precision and accuracy. The limit of detection for pentamidine is 5.70 ng/ml in *Leishmania* cells culture.

Fluorinated analogues of L-ornithine are powerful inhibitors of ornithine decarboxylase and cell growth of *Leishmania infantum* promastigotes (Inhibición del crecimiento de promastigotes de *Leishmania infantum* con inhibidores fluorados de la ornitina descarboxilasa).

R.M. REGUERA, R. BALAÑA FOUCE, J.C. CUBRÍA, M.L. ÁLVAREZ BUJIDOS AND D. ORDÓÑEZ.

Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología, Facultad de Veterinaria, Universidad de León; Campus de Vegazana, 24071 León (SPAIN)

Life Science 56 (4), 223-230 (1994)

RESUMEN

El efecto de varios análogos fluorados de la L-ornitina se ha medido en extractos citosólicos de *Leishmania infantum*. Los valores de EC₅₀ obtenidos de curvas dosis/respuesta fueron 38 µM, 2,62 µM y 4,64µM para el α-DFMO, Δ-MFMO y Δ-MFMOME respectivamente. La inhibición del crecimiento fue eficazmente revertida por putrescina exógena. La ornitina descarboxilasa obtenida en fase logarítmica fue caracterizada fisicoquímica y cinéticamente, mostrando una vida media larga (más de 24 horas). El valor de K_i para los análogos fluorados de la L-ornitina fueron estimados en 125 µM, t_{1/2} 3.5 min. para α-DFMO; 13.3µM, t_{1/2} 1.8 min. para Δ-MFMO y 4.3 µM, t_{1/2} 4 min. para Δ-MFMOME.

SUMMARY

Fluorinated analogues of L-ornithine have been tested on growth and L-ornithine decarboxylase arising from *Lishmania infantum* cytosolic extracts. EC₅₀ values estimated from dose/response curves were 38 µM, 2.62 µM and 4.64 µM for α-DFMO, Δ-MFMO and Δ-MFMOME respectively. Also the inhibition produced by all three compounds was effectively reverted by exogenous putrescine, from logarithmic phase cytosolic extracts was physicochemically and kinetically characterized, showing a long half-life (more than 24 h). Finally, the inhibitory effect of fluorinated analogues of Lornithine was analysed showing a time-dependent irreversible behavior, with K_i values estimated on 125 µM, t_{1/2} 3.5 min for α-DFMO; 13.3 µM, t_{1/2} 1.8 min for Δ-MFMO and 4.3 µM, t_{1/2} 4 min for Δ-MFMOME.

Putrescine uptake inhibition by aromatic diamidines in *Leishmania infantum* promastigotes (Inhibición del transporte de putrescina por diamidinas aromáticas en pro-mastigotes de *Leishmania infantum*).

R.REGUERA, R.BALAÑA FOUCE, J.C. CUBRIA, M.L. Álvarez BUJIDOS and D. ORDÓÑEZ*

Dpto. Fisiología, Farmacología y Toxicología, Ftad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana 24071 León, Spain

Biochemical Pharmacology 47 (10), 1859-1866 (1994)

RESUMEN

Se ha realizado un estudio del efecto inhibitor de una serie de diamidinas aromáticas sobre el crecimiento de cultivos de *L.infantum* y el transporte de putrescina. Los valores de EC₅₀ calculados mediante curvas dosis/respuesta fueron: 45 µM para el

DAPI, 80 μM para la dibromopropamidina, 165 μM pentamidina, 259 μM 2-OH-estilbamidina y 600 μM para la estilbamidina. Sin embargo la promamidina, fenamidina y amicarbalida no tuvieron efecto a una concentración de 1mM. Estos compuestos fueron analizados frente al transporte de putrescina obteniéndose las siguientes constantes cinéticas de inhibición: DAPI 15 μM , pentamidina 3 μM , dibromopropamidina 7 μM , 2 OH- estilbamidina 21 μM , estilbamidina 20 μM , propamidina 25 μM y fenamidina 95 μM . Sin embargo la amicarbalida no redujo de forma significativa el transporte de putrescina a la máxima concentración analizada.

SUMMARY

The effect of a series of aromatic diamidines has been tested on *Leishmania infantum* promastigotes in both culture growth and putrescine uptake. The EC_{50} values calculated by means of dose-response curves were 45, 80, 165, 259 and 600 μM for 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), dibromo propamidine, pentamidine 2-hydroxy stilbamidine and stilbamidine, respectively, although no inhibitory effects on cell growth were found at 1 mM propamidine, phenamidine and amicarbalide. When these compounds were kinetically analysed for putrescine uptake using Lineweaver-Burk plots, the K_i values reached were: DAPI, 15 μM ; pentamidine, 3 μM ; dibromo propamidine, 7 μM ; 2-hydroxy stilbamidine, 21 μM ; stilbamidine, 20 μM ; propamidine, 25 μM ; and phenamidine, 95 μM . Amicarbalide, however, was not able to reduce putrescine uptake to a significant extent, even at the highest concentration studied of 1 mM.

Bioavailability of levamisole administered by subcutaneous and oral routes in rabbits. (Biodisponibilidad oral y subcutánea del levamisol en conejos).

García, J.J., DIEZ, M.J., SIERRA, M., TERÁN, M.T.

Department of Physiology, Pharmacology and Toxicology, Veterinary Faculty, University of León, 24071, Spain

J. vet Pharmanol Therap 17, 135-140 (1994)

RESUMEN

Se determinó la biodisponibilidad oral y subcutánea del levamisol en conejos, administrándose a tres dosis: 12,5; 16,0 y 20,0 mg/kg. Después del análisis no compartimental los valores obtenidos fueron: $C_{\text{max}} = 3,54; 4,51$ y $5,39\mu\text{g/ml}$; $t_{\text{max}} = 12,0; 22,0$ y $20,0$ min; $F = 134,8; 105,4$ y $124,1\%$ respectivamente para cada una de las dosis después de la administración subcutánea. Después de la administración oral estos valores fueron: $C_{\text{max}} = 0,71; 1,32$ y $1,77\mu\text{g/ml}$; $t_{\text{max}} = 46,0; 96,0$ y $84,0$ min;

$F = 53,0; 62,0$ y $80,7\%$. La velocidad de absorción y la cantidad absorbida son diferentes significativamente entre las dos vías de administración excepto para t_{max} a la dosis de 12 mg/kg. Después del análisis compartimental, el modelo seguido por el levamisol fue bicompartimental abierto en 13 conejos y monocompartimental abierto en 2 conejos después de la administración subcutánea, mientras que después de la administración oral el modelo seguido fue bicompartimental en 9 conejos y monocompartimental en 6. Los valores de k_a fueron de 0,321; 0,145 y 0,145 min^{-1} después de la administración subcutánea y de 0,054; 0,023 y 0,027 min^{-1} después de la administración oral. No existieron diferencias significativas entre los valores de C_{max} , t_{max} y ACU calculados por análisis compartimental y no compartimental.

SUMMARY

The bioavailability of levamisole in rabbits was determined after subcutaneous and oral administration at three dose levels of 12.5, 16.0 and 20.0 mg/kg. After non-compartmental analysis the mean values obtained were: $C_{\text{max}} = 3.54, 4.51$ and $5.39\mu\text{g/ml}$; $t_{\text{max}} = 12.0, 22.0$ and 20.0 min; $F = 134.8, 105.4$ and 124.1% after subcutaneous administration for each dose, respectively, and $C_{\text{max}} = 0.71, 1.32$ and $1.77\mu\text{g/ml}$; $t_{\text{max}} = 46.0, 96.0$ and 84.0 min; $F = 53.0, 62.0$ and 80.7% after oral administration. The extent and rate of absorption from the two routes differed significantly, except for t_{max} at the 12.5 mg/kg dose. After compartmental analysis the pharmacokinetics of levamisole was characteristic of a two-compartment open model in 13 rabbits and of a one-compartment open model in two rabbits after subcutaneous administration, while it was two compartmental in nine and one compartmental in six rabbits after oral administration. The k_a values were 0.321, 0.145 and 0.145 min^{-1} after subcutaneous administration and 0.054, 0.023 and 0.027 min^{-1} after oral administration. There were no significant differences between the values of C_{max} , t_{max} and AUC calculated by compartmental and noncompartmental analysis.