

INDUCCIÓN NO HORMONAL DEL ESTRO EN LA PERRA (NOTA TÉCNICA)

Non Hormonal Estrus Induction in the Bitch (Technical Note)

Yanina Corrada, Alejandro Kovalivker y Cristina Gobello

*Instituto de Teriogenología, Area de Pequeños Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Nacional de La Plata. CC 296. Argentina.*

RESUMEN

En la especie canina es difícil el diseño de protocolos confiables de inducción de estros fértiles y la inducción hormonal de ciclos estrales ha demostrado tener resultados pobres. En el presente artículo de revisión se describen brevemente los principales reportes de inducción de celo con agonistas dopaminérgicos como la bromocriptina, cabergolina y metergolina. También se citan las hipótesis más relevantes con respecto al mecanismo de acción de los agonistas dopaminérgicos en la inducción de estros. Por último, se discute sobre la importancia de los agonistas dopaminérgicos en el mejoramiento de la eficiencia reproductiva en los caninos.

Palabras clave: Perra, inducción de estro, agonista dopaminérgico.

ABSTRACT

In dogs, it has been difficult to design reliable fertile estrus induction (EI) protocols and hormonal induction of estrus cycles have shown poor results. The main EI protocols including dopaminergic agonist drugs (bromocriptine, cabergoline and metergoline) are reviewed in this article. Hypotheses of the mechanism of action of dopaminergic agonists on EI are briefly described and a short discussion about the importance of dopaminergic agonists in canine reproduction performance is also included.

Key words: Femal dog, estrus induction, dopaminergic agonist.

INTRODUCCIÓN

En la especie canina es difícil el diseño de protocolos confiables de inducción de estros (IE) fértiles debido a la dificultad que existe en el entendimiento de los eventos hormonales que controlan la foliculogénesis. En la perra, la causa de la finalización del largo periodo de anestro fisiológico, y el comienzo de un nuevo ciclo estral no está bien comprendida. Asimismo, los patrones de secreción de las gonadotrofinas durante la transición de la fase inicial a la tardía del anestro resulta todavía controvertida en esta especie. La hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculoestimulante (FSH) han sido reportadas como las principales hormonas responsables del inicio de la foliculogénesis en la perra [5, 20, 27]. Recientemente se ha descrito en ciclos inducidos por el agonista dopaminérgico (AD) bromocriptina, un incremento en las concentraciones séricas de FSH sin un concomitante aumento de las de LH. Estos resultados indican que la bromocriptina aumenta la FSH a concentraciones que producen el desarrollo de los folículos ováricos [21].

La aplicación clínica de los protocolos de inducción de estros incluye el tratamiento de infertilidad debido a anestro primario y secundario [9]. Asimismo, la IE resulta de utilidad para criadores, quienes usualmente enfrentan el problema de la excesiva sincronización de los celos en sus reproductoras. Esto último ocasiona excesiva cantidad de cachorros para comercializar en ciertos periodos del año con merma de los mismos en los restantes periodos. Mediante la aplicación de un protocolo efectivo de IE también es posible planificar la preñez y parición de una hembra para que la misma acontezca en un momento conveniente para su dueño. Asimismo, la IE resulta de gran utilidad cuando se va a emplear alguna técnica de reproducción asistida. Se debe enfatizar que previo a la aplicación de la IE es necesario descartar otras etiologías de infertilidad, ya que la mayoría de los protocolos descritos han sido diseñados y probados en hembras reproductivamente normales.

La IE ha sido realizada tradicionalmente con gonadotrofinas o péptidos liberadores de gonadotrofinas que estimulan la liberación de gonadotrofina endógena por la hipófisis. Las gonadotrofinas que han sido utilizadas en el perro son: FSH, Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG = PMSG), LH porcina, Gonadotrofina Coriónica Humana (hCG) y Gonadotrofina de mujer menopáusica (hMG). Algunos de los métodos para la IE usando estas gonadotrofinas exógenas han incluido: 1) Administración seriada de FSH o eCG para inducir el desarrollo de folículos y el proestro, 2) Lo mismo que el anterior, pero seguido de LH o hCG para causar la ovulación de los folículos inducidos [39,40], 3) Protocolos similares pero precedidos de tratamientos estrogénicos usados para sensibilizar estrogénicamente al eje hipófisis- gonadal [4, 28, 33], y recientemente, 4) LH porcina purificada [34] y 5) hMG [38]. La administración frecuente o en forma de pulsos de Hormona Liberadora de Gonadotrofinas (GnRH) también ha sido usada para la IE [3]. Basados en los estudios de Okkens y col. [23], van Haften y col. [34], Jochle y col. [19] y Jeukenne y Vertegen [18], los AD como la bromocriptina (Parlodel, Sandoz Co, E Hannover, NY, USA) y la cabergolina (Galastop, Vetem'Centralvet s.p.a. Milán Italia) fueron recientemente incluidos como métodos disponibles con gran éxito en la IE en perras en varios países europeos (TABLA I). Los objetivos de este artículo de revisión son citar los principales reportes de IE con AD y describir brevemente las hipótesis más relevantes con respecto al mecanismo de acción de estas drogas.

Inducción de Estro con Agonistas Dopaminérgicos

En un primer reporte de IE con AD se describe la reducción del período interestro utilizando bromocriptina en 4 perras a razón de 20 g/kg 2 veces día, vía oral desde el día 1-5 luego del pico de LH, hasta el comienzo del siguiente proestro. El interestro se redujo significativamente en los animales tratados, comparado con un grupo control (123±23 vs. 245±8 días; [23]). En un estudio en el que se comparó la PMSG con un protocolo igual al anterior de bromocriptina, se encontró un

porcentaje de preñez de 60% [34]. También, se reportó en un estudio con 8 perras de raza beagle el acortamiento de la fase luteal en un 80% de su duración normal, luego de la administración de la misma dosis de bromocriptina. En este trabajo se demostró que la prolactina es el principal factor luteotrófico en la segunda mitad de la fase lútea de la perra [24].

En un primer estudio comparativo usando una dosis de 12,5mg/ perro de metergolina IM, cada 3 días, comenzando entre los 78 y 161 días post-proestro en 10 hembras beagle, el intervalo interestro promedio obtenido fue, significativamente menor que el del grupo control de perras (144 vs. 207 días) [14]. Todas las hembras incluidas en este protocolo ovularon y 9 quedaron preñadas. Asimismo fue comparado el tratamiento con PMSG, metergolina y metergolina conjuntamente con hCG, la metergolina sola mostró los mejores resultados, aunque la alta dosis usada (1mg/kg) provocó vómitos en los animales [14]. Un protocolo similar fue usado en 18 perras en anestro medio, tardío y anormalmente prolongado obteniéndose buenos resultados: donde 8 de 11 hembras respondieron después de un promedio de 9 días de tratamiento. Por otro lado, sólo una de 6 hembras que estaban en anestro medio, presentó el ciclo estral después de 9 días de tratamiento en otro estudio [2]. En un reporte, en el cual 12 perras beagle después de 17 días de recibir igual dosis de metergolina que en el trabajo previamente citado presentaron un periodo de celo, 9 quedaron preñadas, y el periodo interestro fue reducido en más de 2 meses [32]. Actualmente la metergolina es comercializada en forma oral (Contralac, Vibrac Laboratories. Carros, France). La alta dosis indicada en estos estudios, resulta costosa para el tratamiento de perros de gran talla. En otro estudio dosis menores de metergolina oral (0,1 mg/kg dos veces/día) fue administrada a 7 hembras beagle 100 días post-ovulación. Aunque el tratamiento indujo una significativa reducción de la concentración de la prolactina sérica, el intervalo interestro no se modificó [25].

La cabergolina (5g/kg/día) fue usada oralmente en 28 perras con anestro prolongado logrando un 100% de gestación

TABLA I
PRINCIPALES PROTOCOLOS DE INDUCCIÓN DE ESTRO CON AGONISTAS DOPAMINÉRGICOS EN LA PERRA.
(FIENI Y COL. 1999).

Drogas	Protocolo	Eficacia	Colaterales
Bromocriptina Parlodel ^R	Administración oral desde el comienzo del estro 20µg/kg/día durante 120 días	Reducción del interestro de 120 días promedio.	Vómitos los primeros días de tratamiento
Metergolina Contralac ^R	Administración 4 meses después de comenzado el estro 1mg/kg IM cada 3 días por 40 días	Reducción del interestro de 60 días	Sin efectos secundarios
Cabergolina Galastop ^R	Administración oral desde 3.5 a 6 meses después del principio del estro 5µg/kg/día 90-120 días después de pico de LH 120-160 después de pico de LH 160-200 después de pico de LH	Reducción significativa del intervalo interestro luego 4 semanas de tratamiento 3 semanas de tratamiento 1 semana de tratamiento	Sin efectos secundarios

después de 5 a 18 días de tratamiento [1]. En otro estudio se administró cabergolina y un placebo durante 14 días a partir de los 4, 5 ó 6 meses post-estro. Los resultados no mostraron diferencias significativas en el intervalo interestro entre los grupos [19]. La cabergolina se usó en un trabajo, en la misma dosis, desde el día 30 después del pico de LH reduciendo el intervalo interestro desde 216 a 66.5 días. Todas las perras tratadas fueron servidas pero ninguna quedó preñada probablemente a causa de una insuficiente involución uterina, del ciclo previo. De todas formas, este estudio demostró que es posible la EI no sólo durante la fase de anestro, sino también durante el diestro [18]. Catorce perras de laboratorio de raza beagle que fueron tratadas con la misma droga y dosis en anestro temprano, medio y tardío, tuvieron un intervalo interestro más corto que otro grupo de animales tomados como control. La IE fue más rápida en anestro tardío que en anestro temprano (promedio de días de tratamiento 6 vs. 20 días, respectivamente). Doce de las 14 perras tratadas quedaron preñadas, y tuvieron camadas normales. Los ciclos inducidos demostraron tener fertilidad y características hormonales normales [37]. En un estudio clínico en distintas razas se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en el trabajo anterior [12]. Por último, en un estudio en el cual se usaron los AD para terminar la preñez, se combinó la cabergolina a igual dosis que la mencionada anteriormente, con una administración diaria con cloprostenol (1g/kg) desde el día 25 luego del pico de LH, se encontró un significativo acortamiento del intervalo interestro (98 ± 41 vs. 200 ± 26 días) en las perras tratadas [35].

Los AD usados inhiben la secreción de prolactina regulando tanto la acción dopaminérgica (bromocriptina y cabergolina, [8, 16, 19]) como la acción serotoninérgica (metergolina). La metergolina es un antagonista serotoninérgico que disminuye los niveles de prolactina, también tiene un efecto dopaminérgico cuando se la usa a dosis altas [13]. Por lo tanto, se intuye que las tres drogas tienen el mismo mecanismo de acción. Aunque los niveles de prolactina son basales en perras en anestro [17], los AD causan IE en esta especie. El mecanismo preciso por el cual los AD acortan el anestro es aun desconocido. Quedando por determinar si se debe a un descenso de la prolactina por su efecto dopaminérgico o una acción dopaminérgica directa ya sea en el eje gonadotrófico o en los receptores gonadotróficos ováricos. Aunque parece que la prolactina tiene un efecto antigonadotrófico y/o disminuye la respuesta gonadotrófica ovárica en algunas especies [7, 17, 22], la exacta interacción entre la prolactina y las gonadotrofinas no se conoce en el perro. La ausencia de correlación entre la prolactina y la LH y los niveles séricos basales de la primera encontrados durante el anestro hacen pensar que la prolactina, no es relevante en la terminación del anestro de la perra [17, 27]. Mas aún, la reducción del intervalo interestro obtenido por el uso de altas dosis de metergolina y no con las usuales bajas dosis antiserotoninérgicas, sugieren un efecto que no depende de la inhibición de prolactina, sino de otras acciones dopaminérgicas [14, 25, 26]. Estudios llevados a cabo en ratas

demostraron que la administración de dopamina tiene un efecto estimulante en la síntesis de gonadotrofina por las neuronas del eje hipotálamo hipofisario [30]. Estos resultados coinciden con los trabajos previos que mostraban que la GnRH es producida por la eminencia media en respuesta a la administración central de dopamina [31]. Por otro lado, se ha postulado que los AD tienen un efecto directo en los ovarios [17]. Es posible que la cabergolina pueda madurar los receptores de gonadotrofina ováricos por su acción AD. Ciertamente, la IE hormonal tiene un efecto similar al descrito para los AD aunque sobrepasando el límite de estos receptores, con el uso de dosis hiperfisiológicas [15]. Se resume que, hasta el momento, la hipótesis del efecto estimulante directo de los AD ya sea liberando gonadotrofinas o actuando en el tejido ovárico, parece ser la más precisa.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Aunque la IE es requerida usualmente en la práctica profesional de reproducción canina no se ha difundido mucho su aplicación por la poca confiabilidad de la mayoría de los protocolos hormonales propuestos. Mas aún, es extremadamente difícil la comparación de los diferentes protocolos de hormonas hipofisarias o hipotalámicas debido a la desconocida anamnesis de las hembras que se incluyen en algunos de los trabajos y también al variado criterio para juzgar el éxito en los diferentes reportes de IE hormonal, por ejemplo: la inducción del comportamiento de estro, la evidencia de ovulación o la preñez a término. También hay problemas de disponibilidad, calidad y uniformidad de las preparaciones hormonales. Por otro lado, los distintos agonistas hormonales sintéticos, como la GnRH, suelen tener diferentes potencias. Las preparaciones comerciales de eCG, y probablemente de otras hormonas, pueden también tener diferentes biopotencias y dar como resultado una hiperestimulación ovárica, si se administran sin cuidado. Algunas preparaciones de gonadotrofinas usadas experimentalmente no se encuentran actualmente en el mercado en algunos países. Mas aún algunos estudios histológicos y ultrasonográficos han demostrado que con estos protocolos de IE la dinámica folicular difiere ampliamente de la de los estros espontáneos [6].

Aunque los AD no están disponibles en el mercado veterinario de muchos países, se pueden utilizar aquellos de uso humano. Considerando que las dosis indicadas para este propósito son bajas (bromocriptina y cabergolina), los protocolos de IE con AD no resultan costosos para animales de mediano y pequeño tamaño. Raramente, estos tratamientos presentan efectos secundarios y pueden ser administrados fácilmente en forma oral por los dueños. La cabergolina es el AD que ha demostrado tener mejores resultados. Cuanto más tardíamente se administra en el anestro, más eficiente y rápida es su respuesta. La principal indicación, es en el anestro prolongado, donde se llega a la IE rápidamente [9]. En reportes recientes se ha demostrado que el desarrollo folicular y la tasa de ovulación de los

estros inducidos por la cabergolina, son similares a los de los ciclos espontáneos [6]. Se concluye, que estos protocolos con AD se vislumbran como un método exitoso para mejorar la eficiencia reproductiva canina como ha sido observado en recientes estudios de laboratorio y clínicos [10, 11, 12, 29].

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARBEITER, K.; BARSCH E. Possibilities of oestrus induction in the bitch in than Ergoline derivate. **J. Vet. Med.** 35: 111-117. 1998.
- [2] BRUGER, O. Declechement des chaleurs chez la chienne et chez la chatte avec in antiprolactine: la metergoline. **These de Doctorat Veterinaire, Nantes** (France). 106. 1994.
- [3] CONCANNON, P.W. Induction of fertile oestrus in anoestrous dogs by constant infusion of GnRH agonist. **J. Reprod. Fertil.** 39: 149-160, 1989.
- [4] CONCANNON, P.W. Methods of rapid induction of fertile estrus in dogs. En: Kirk R.W. (Ed). **Current Veterinary Therapy XI**. W.B. Saunders. Philadelphia. 960-963. 1992.
- [5] CONCANNON, P.W. Biology of gonadotrophin secretion in adult female dogs. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 47: 3-27. 1993.
- [6] ENGLAND, G.; HEWITT, D. Follicular growth and ovulation in the bitch. (abstr). **Proceeding of EVSSAR Annual Symposium, Lyon** (France). 51. 1999.
- [7] EVANS, W.S.; CARLSEN, E.; HOK, Y. Prolactin and its disorders. En: Becker K.L. (Ed.). **Principles and practice of endocrinology and metabolism**. J.B. Lippincott Company, Philadelphia. 134-139. 1990.
- [8] FIENI, F.; VERSTEGEN, J.; HERAND, V.; ONCLIN, K. Physiologie de la prolactine pharmacologie des antiprolactiniques et applications chez la chienne. **Prat. Med. Chir. Anim. Comp.** 34: 187-199. 1999.
- [9] GOBELLO, C.; CASTEX, G.; CORRADA, Y. Treatment of primary and secondary anestrus in bitches with cabergoline. **J. Am. Vet. Med. Ass.** (en prensa)
- [10] GOBELLO, C.; CORRADA, Y.; CASTEX, G.; DE LA SOTA, L. Estrus induction in the bitch with the dopaminergic agonist cabergoline. **XXI Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinarios de Pequenos Animais**, Rio de Janeiro (Brazil). 67. 2000.
- [11] GOBELLO, C.; CORRADA, Y.; CASTEX, G.; DE LA SOTA, L. Shortening of interestrous intervals with cabergoline in the bitch. **Annual Symposium of European Society of Small Animal Reproduction**, Milan (Italy). 137- 138. 2001.
- [12] GOBELLO, C.; CASTEX, G.; DE LA SOTA, L.; CORRADA, Y. Estrus induction with dopaminergic agonists in the bitch. **International Working Dog Breeding Conference**. San Antonio, Texas (USA). 2001.
- [13] HAMON, M.; MALLAT, M.; HERBET, A.; MELSON, D.L.; AUDINOT, M.; GLOWINZKI, J. H3 Metergoline a new ligand of serotonin receptor in the rat brain. **Journal of Neurochemistry**. 36: 613-626. 1981.
- [14] HANDAJA KUSUMA, P.S.; TAINTURIER, D. Comparison of induction of oestrus in dogs using Metergoline, Metergoline plus human Chorionic Gonadotrophin, or Pregnant Mare Serum Gonadotrophin. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 47: 363-370. 1993.
- [15] HARVEY, M.A.; CAUVIN, A.; DALE, M.; LINDLEY, S.; BALLABIO, R. Effect and mechanism of the antiprolactin drug cabergoline on pseudoprenancy in the bitch. **Journal of Small Animal Practice**. 38: 336-339. 1997.
- [16] JANSSENS, L.A. Treatment of pseudopregnancy with bromocriptine, an ergot alkaloid. **Veterinary Records**. 119: 172-174. 1986.
- [17] JEFFCOATE, I.A. Endocrinology of aneestrous bitches. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 47: 69-76. 1993.
- [18] JEUKENNE, P.; VERSTEGEN, J. Termination of diestrus and induction of oestrus in diestrous non pregnant bitches by the prolactin antagonist cabergoline. **J. Reprod. Fertil.** 51: 59-66. 1997.
- [19] JOCHLE, W.; ARBEITER, K.; POST, K. Effects on pseudopregnancy, pregnancy and interoestrous intervals of pharmacological suppression of prolactin secretion in female dogs and cats **J. Reprod. Fertil.** 39: 199-207. 1989.
- [20] KOOISTRA, H.S.; OKKENS, A.C.; BEVERS, M.M.; POPP-SNIJDERS, C.; VAN HAATTEN, B.; DIELEMAN, S.J.; SCHOEMAKER, J. Concurrent pulsatile secretion of LH and FSH during different stages of the estrous cycle and anestrus in beagle bitches. **Biol. Reprod.** 60: 65-71. 1998.
- [21] KOOISTRA, H.S.; OKKENS, A.C.; BEVERS, M.M.; POPP-SNIJDERS, C.; VAN HAAFTEN, B.; DIELEMAN, S.J.; SCHOEMAKER, J. Bromocriptine-induced premature oestrus is associated with changes in pulsatile secretion pattern of FSH in beagle bitches. **J. Reprod. Fert.** 117: 387-393. 1999.
- [22] Mc NEILLY, A.S. Prolactin and the control of gonadotrophin secretion. **J. Endocrinology**. 115: 1-5. 1987.
- [23] OKKENS, A.C.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; WILLEMSE, A.H. Shortening of the interestrous interval of the cyclic dog by bromocriptine treatment. **Vet. Quat.** 7: 173-176. 1985.
- [24] OKKENS, A.C.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; WILLEMSE, A.H. Evidence of PRL as the main luteotrophic factor in the cyclic dog. **Vet. Quat.** 12: 193-201. 1990.

- [25] OKKENS A.C.; KOOISTRA, H.S.; DIELEMAN, S.J.; BEVERS, M. Dopamine agonistic effects as opposed to the prolactin concentrations as the influencing factor on the length of the anestrus in the dog (abstr.). **Proceedings of Third International Symposium on Reproduction of Dogs, Cats and Exotic Carnivores**, Utrecht. 36. 1996.
- [26] OKKENS A.C.; KOOISTRA, H.S.; DIELEMAN, S.J.; BEVERS, M. Dopamine agonistic effects as opposed to prolactin concentrations in plasma as the influencing factor on the duration of anoestrus in bitches. **J.Reprod. Fertil.** 51: 55-58. 1997.
- [27] OLSON, P.N.; BOWEN, M.D.; BEHRENDT, M.D.; OLSON, J.D.; NETT, T.M. Concentration of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. **Biol. Reprod.** 27: 1196-1206. 1982.
- [28] RENTON, J.P.; MUNRO, C.D.; HEATHCOTE, H.; CARMICHAEL, S. Some aspects of etiology, diagnosis and treatment of infertility in the bitch. **J. Reprod. Fert.** 61: 289-294. 1981.
- [29] ROTA, A.; ROMAGNOLI, S. One year of breeding management in a dog kennel. **Proceedings 4th International Symposium on Dog and Cat Reproduction**, Oslo. 83. 2000.
- [30] SONGYUN, L.; PELLETIER, G. Role of dopamine in the regulation of gonadotrophin releasing hormone in the male rat brain as studied by in situ hybridization. **Endocrinology.** 131: 395-399. 1992.
- [31] STEGER, R.W.; JOHNS, A. Handbook of pharmacologic methodologies for the study of the neuroendocrine system, CRC Press, New York. 68-71. 1985.
- [32] TAINTURIER, D.; HANDOJA KUSUMA, P.; FIENI, F.; BRUYAS, J.; ASCHER, F. Declenchement des chaleurs chez la chienne par in antiprolactine: la metergoline. **Prat. Med. Chir. Comp.** 29: 197-203. 1994.
- [33] THUN.; WATSON, P.; JACKSON, G.L. Induction of estrus and ovulation in the bitch using exogenous gonadotropins. **Am. J. Vet. Res.** 38: 483-486. 1977.
- [34] VAN HAAFTEN, B.; DIELEMAN, S.J.; OKKENS, A.C.; BEVERS, M.M.; WILLEMSE, A.H. Induction of estrus and ovulation in dogs by treatment with PMSG and / or bromocriptine. **J. Reprod. Fertil.** 39: 330-331. 1989.
- [35] VERSTEGEN, J.; ONCLIN, K. Induction de l' avortement chez la chienne et chez la chatte par la cabergoline, agoniste dopaminergique spécifique. **Am. Med. Vet.** 137: 251-259. 1996.
- [36] VERSTEGEN, J.; ONCLIN, K.; SILVA, L.; CONCANNON, P. Termination of obligate anestrus and induction of fertile ovarian cycles by administration of purified pig LH. **J. Reprod. Fertil.** 111: 35-40. 1997.
- [37] VERSTEGEN, J.; ONCLIN, K.; SILVA, L.; CONCANNON, P. Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. **Theriogenology.** 51: 597-611. 1999.
- [38] WANKE, M.; FARINA, J.; LOZA, M.; REBUELTO, M.; CONCANNON, P. Induction of estrus in bitches with normal and persistent anestrus using human menopausal gonadotropin (hMG). **Theriogenology.** 47: 935-942. 1997.
- [39] WRIGHT, P.J. The induction of oestrus and ovulation in the bitch using PMSG and HCG. **Australian Vet. J.** 56: 137-140. 1980.
- [40] WRIGHT, P.J. The induction of oestrus in the bitch using daily injections of PMSG. **Australian Vet. J.** 59: 123-124. 1982.