

83
207



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO



Facultad de Estudios Superiores
"Cuautitlán"

**EVALUACION DE LA FUNCION HEPATICA EN EQUINOS
UTILIZADOS PARA LA PRODUCCION DE TRES SUEROS
HIPERINMUNES POR MEDIO DE PRUEBAS
BIOQUIMICO - CLINICAS**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :

CARLOS RUBEN ORTEGA SANCHEZ

ASESOR: M.C. JUAN CARLOS VALLADARES DE LA CRUZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

RESUMEN. 1
INTRODUCCION. 2
OBJETIVO. 7
MATERIAL Y METODOS. 8
RESULTADOS.15
DISCUSION.33
CONCLUSIONES.45
TABLA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS.46
LITERATURA CITADA.47

RESUMEN

Carlos Rubén Ortega Sánchez. Evaluación de la función hepática en equinos utilizados para la producción de tres sueros hiperinmunes por medio de pruebas bioquímico-clínicas; bajo la dirección de Juan Carlos Valladares de la Cruz.

En el presente estudio se evaluaron los cambios ocurridos en el funcionamiento hepático mediante pruebas bioquímicas en equinos destinados a producir sueros hiperinmunes durante el primer ciclo de producción. Se emplearon 30 caballos lotificados en tres grupos de diez animales cada uno, los grupos fueron destinados a producir suero antialacránico, antidiftérico y antitetánico. Se tomaron muestras sanguíneas para medir niveles de albúmina, globulinas, bilirrubinas directa e indirecta, fosfatasa alcalina sérica y transaminasa glutámico - oxaloacética de forma periódica durante el calendario de producción, encontrándose variaciones estadísticamente significativas en los valores estudiados con respecto a los valores basales antes del estudio. En la prueba de albúmina el grupo de tétanos fue el que presentó un descenso más notorio, en globulinas el grupo de tétanos mostró el mayor incremento, en bilirrubinas directa e indirecta el grupo de alacrán mostró el descenso más significativo, en fosfatasa los tres grupos mostraron tendencia similar sin variaciones extremas y en transaminasa el grupo de difteria mostró el valor más alto. Lo que sugiere lesión hepática inicial en el primer ciclo de producción.

INTRODUCCION

Los programas de medicina preventiva e inmunizaciones que desarrolla el Sector Salud en el país, requieren de la disposición oportuna de diversos tipos de vacunas, sueros, antígenos y otros productos biológicos de naturaleza semejante con la finalidad de prevenir, tratar y diagnosticar diversas entidades patológicas que afectan a la población humana (19).

El Instituto Nacional de Higiene, dependiente de la Gerencia General de Biológicos y Reactivos de la Secretaría de Salud, tiene como objetivo la producción de sueros hiperinmunes, vacunas y otros biológicos de diagnóstico que se emplean en medicina humana (16).

Los sueros hiperinmunes son biológicos que se obtienen del suero de animales previamente inmunizados contra una enfermedad específica y contienen anticuerpos que una vez concentrados y purificados pueden aplicarse al hombre y a los animales domésticos para el tratamiento inmediato de enfermedades de alta mortalidad y curso agudo (20).

Los sueros hiperinmunes se han empleado desde 1890, cuando un médico militar alemán llamado Emil von Behring pensó que no era necesario correr el riesgo de replicar las enfermedades al aplicar los microorganismos aún atenuados a una persona con el fin de que creara defensas contra dicha enfermedad, sugirió que se protegería también si se inyectara la "sustancia protectora" de un individuo previamente inmunizado a otro que la requiriera inmediatamente. Behring llamó a esta sustancia protectora

"antitoxina".

La primera aplicación de antitoxina a un niño que padecía difteria obtuvo un éxito tan sensacional que se adoptó inmediatamente el tratamiento, logrando reducir en forma drástica el índice de mortalidad por difteria. Von Behring recibió el premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1901 (1).

Los caballos son la especie de donde se obtienen sueros hiperinmunes, ya que cuentan con características zootécnicas óptimas como docilidad, rusticidad al medio ambiente, gran volumen sanguíneo, longevidad y peso, que hacen adecuada su utilización para la producción de biológicos en volúmenes adecuados (3,8,19,20).

Los equinos son sometidos a una serie de inmunizaciones con un antígeno particular, finalmente son muestreados para la evaluación del suero en un proceso denominado "sangría de prueba". Cuando el nivel de anticuerpos producidos es adecuado, se procede a la obtención de sangre para la sustracción del plasma ("sangría de cosecha" y "plasmaféresis") (16,19).

La sangría de cosecha resulta de la obtención de 8 l de sangre que se colecta por punción de de la vena yugular. La sangre colectada cae por gravedad en garrafones de 10 l de capacidad que contienen 0.5 l de una solución anticoagulante ACD^{*}; la sangre sedimenta y el plasma sobrenadante es colectado por sifoneo.

* Citrato de sodio 50 g, ácido cítrico 18 g, dextrosa 100 g
y agua apirogénica c. b. p. 1,000 ml.

Posteriormente, el paquete celular resultante es resuspendido en 0.5 l de solución salina fisiológica estéril, se pasa por filtros de tela y se reintegra al animal por transfusión en la vena yugular, en 20 minutos aproximadamente (15).

La combinación de las inmunizaciones constantes y los procesos de sangría de cosecha y plasmaféresis causan daños severos en el organismo; los órganos que se ven afectados con mayor severidad son el hígado, los riñones, el corazón y el bazo, encontrándose en ellos lesiones degenerativas, necróticas e inflamatorias. Las lesiones que se reportan con mayor frecuencia en las necropsias y estudios histopatológicos son hepatitis no supurativa, colangitis no supurativa, degeneración grasa y necrosis coagulativa de hepatocitos, siderofagocitosis e infiltración perivascular de polimorfonucleares y mononucleares, glomerulonefritis membranoproliferativa, glomerulitis membranosa, nefritis intersticial no supurativa y nefritis supurativa, necrosis coagulativa severa del músculo cardíaco derecho asociada a deficiencias de irrigación por trombosis, hemorragias subendocárdicas a nivel de ventrículo izquierdo, endocarditis severas, infiltración periarteriolar de polimorfonucleares y mononucleares en miocardio, degeneración fibrinoide, coagulación intravascular diseminada y presencia de células de la insuficiencia cardíaca en pulmón.

Estos problemas provocan una disminución en la vida media de los animales y disminuyen la producción de sueros (17).

Es necesario el estudio de los cambios progresivos que se presentan en la fisiología del animal por medio de pruebas seriadas que hacen evidentes las alteraciones de los diferentes órganos (7,13,15) para tratar de disminuir las lesiones provocadas en los animales hiperinmunizados, aumentar su promedio de vida y su productividad

El hígado representa uno de los centros metabólicos más importantes del cuerpo, es la estructura glandular más grande del organismo, determina del 2 al 5 % del peso corporal y es considerado de gran importancia en el mantenimiento de la salud. Esta glándula es responsable de gran cantidad de procesos bioquímicos, funciones metabólicas, sintéticas, secretoras y excretoras esenciales para la vida; su reserva funcional es tan grande, que el 80 % de órgano puede encontrarse destruido antes que se hayan detectado algunas anormalidades (2,11,12,14,15).

Entre las funciones normales del hígado se encuentran la secreción y excreción de bilis, metabolismo protéico y de carbohidratos, detoxificación de sustancias, producción de fibrinógeno, protrombina, heparina, almacenamiento de vitamina A, regulación del volumen sanguíneo y de la actividad reticuloendotelial. Los hepatocitos contienen multiplicidad de sistemas enzimáticos, que cuando ocurren daños hepáticos, las membranas celulares pueden hacerse permeables o incluso romperse por lo que las enzimas se difunden en el interior del torrente sanguíneo. El comportamiento de la actividad enzimática del suero sanguíneo ha sido utilizado por numerosos investigadores para detectar daño hepático.

La valoración del funcionamiento hepático por medio de pruebas bioquímicas puede ser un indicador del grado de daño hepático que se presenta en equinos sujetos a programas de inmunización para la producción de sueros hiperinmunes.

Las pruebas funcionales del hígado pueden ser clasificadas en las siguientes categorías (2,3,7,9,11,12):

1. Pruebas que dependen fundamentalmente de secreciones y excreciones hepáticas:

- a) Pigmentos biliares.
- b) Depuración de sustancias extrañas al suero.

2. Pruebas que dependen de funciones bioquímicas específicas:

- a) Pruebas del metabolismo de proteínas.
- b) Pruebas del metabolismo de carbohidratos.
- c) Pruebas del metabolismo de lípidos.

3. Pruebas en las que se evalúa la actividad enzimática del suero:

- a) Fosfatasa alcalina.
- b) Transaminasas.
- c) Otras enzimas

Por lo hasta aquí expresado, el presente trabajo pretende detectar las alteraciones que se presentan en el hígado de caballos sometidos a programas de inmunización para producción de sueros hiperinmunes, por medio de pruebas de laboratorio específicas realizadas en el suero.

OBJETIVO

Evaluar la presencia y el grado de daño hepático en equinos destinados a la producción de sueros hiperinmunes antialacránico, antidiftérico y antitetánico en su primer ciclo de producción por medio de las principales pruebas de funcionamiento hepático: determinación de albúmina, globulinas, bilirrubina directa e indirecta, fosfatasa alcalina sérica, y transaminasa glutámico - oxaloacética en el suero sanguíneo.

MATERIAL Y METODOS

1) Animales de experimentación:

Para el presente estudio se utilizaron 30 equinos de raza criolla, hembras, entre 5 y 6 años de edad, del Instituto Nacional de Higiene. Los animales fueron divididos en tres lotes, el lote 1 se utilizó para producción de suero antialacránico, el lote 2 para producción de suero antidiftérico y el lote 3 para producción de suero antitetánico. Como dato basal (testigo) se consideró el muestreo del día cero previo al tratamiento.

2) Inóculos:

Los biológicos empleados como inóculos son:

Para alacrán se usa un extracto crudo, salino de macerado de Telsons de alacranes de las siguientes especies:

Centruroides limpidus limpidus, *Centruroides noxius* y *Centruroides suffusus suffusus*; que geográficamente se distribuyen, en forma predominante, dentro de los estados de Guerrero, Nayarit y Durango respectivamente; a una dosis de 5 DL₅₀^{*} a 80 DL₅₀^{*} en 12 inóculos en 63 días (Cuadro 1) (10).

Para difteria se emplea toxoide diftérico obtenido a partir de toxina diftérica inactivada con formaldehído al 0.7 % proveniente de cultivos puros de *Corynebacterium diphtheriae*

^{*} DL₅₀ = Dosis Letal 50% en ratón blanco de 21 días de edad.

(10); las DL₅₀ (ratón) utilizadas van en aumento desde 100 hasta 600 en 8 inóculos en 73 días (Cuadro 2).

Para tétanos se ocupa toxoide tetánico obtenido a partir de toxina tetánica inactivada con formaldehído al 0.7 % proveniente de cultivos puros de *Clostridium tetani*; las Lf (unidades de floculación) utilizadas van en aumento desde 100 hasta 600 en 8 inoculaciones en 70 días.

3) Inoculación:

Los animales fueron inoculados según los calendarios que se muestran en los cuadros 1, 2 y 3.

En el lote 1 Alacrán se trabajó durante 72 días en los que se aplicaron 12 inóculos desde el día 0 hasta el día 63, el primero utilizó como adyuvante el completo de Freund, el segundo utilizó adyuvante incompleto de Freund y los 10 restantes Gel de Aluminio. Se muestrearon los animales en los días 0, 20, 48 y 69, el último muestreo programado para el día 72 fue imposible tomarlo debido a causas ajenas al control del experimento.

En el lote 2 Difteria se trabajó durante 84 días en los que se aplicaron 8 inóculos desde el día 0 hasta el día 73 empleando el primero adyuvante completo de Freund, el segundo adyuvante incompleto de Freund y los 6 restantes gel de aluminio. Los animales fueron muestreados en los días 0, 24, 59, 80 y 84.

En el lote 3 Tétanos se trabajó durante 84 días en los que se aplicaron 8 inóculos desde el día 0 hasta el día 70 empleando el primero adyuvante completo de Freund, el segundo adyuvante incompleto de Freund y los 6 restantes gel de aluminio. Los

animales fueron muestreados en los días 0, 34, 68, 80 y 84.

4) Sangría de cosecha y plasmaféresis:

Una vez confirmado el título de anticuerpos por pruebas de desafío se procedió a la obtención del suero sangrando a los caballos directamente de la vena yugular y recolectando la sangre en garrafones individuales con 0.5 l de ACD; la cantidad obtenida de cada caballo fue de 5 a 7 l de sangre en un periodo de 20 a 30 minutos aproximadamente, dependiendo del estado físico del animal. Este proceso se llevó a cabo durante dos días seguidos.

Los garrafones fueron llevados a un cuarto estéril y se dejaron sedimentar de 4 a 6 horas para después separar el plasma del paquete celular, a éste último se le agregó un litro de solución salina fisiológica y se agitó suavemente. el paquete celular resuspendido fue pasado por filtros de tela para retener los coágulos que accidentalmente se formaron en la recolección.

Los garrafones fueron cerrados con tapones de goma por los cuales pasan dos tubos de aluminio, uno para la entrada de aire al garrafón y el otro para el paso del paquete celular; éste en su extremo interno al garrafón tiene acondicionado un filtro de tela para evitar el paso de coágulos al torrente sanguíneo. Por gravedad se trasfundió a los equinos por punción de la vena yugular 5 horas después de finalizada la sangría de cosecha con un volumen aproximado de 3.5 l en un tiempo de 20 minutos.

5) Toma de muestras:

Se colectaron 20 ml de sangre por punción de la vena yugular y se dejó reposar sin conservador, a temperatura ambiente y cubierta de la luz para recolectar el suero 24 horas más tarde en un tubo de ensaye y congelarlo posteriormente; en los días 0, 20, 48 y 69 para el lote 1 Alacrán (Cuadro 1); en los días 0, 24, 69, 80 y 84 para los lotes 2 y 3, Difteria y Tétanos (Cuadros 2 y 3).

6) Técnica de laboratorio:

La evaluación del daño hepático fue realizada por pruebas de laboratorio, según la Gerencia General de Biológicos y Reactivos de la Secretaría de Salud: determinación de bilirrubinas directa e indirecta, determinación de proteínas totales y albúmina, determinación de fosfatasa alcalina y determinación de transaminasa glutámico - oxaloacética (TGO).

7) Análisis estadístico:

Los valores promedio de las pruebas en las diferentes muestras y en los diferentes lotes fueron evaluados mediante análisis de Friedman para valores no paramétricos (6) y posteriormente fueron analizados por análisis de varianza y mediante prueba de Tukey para detectar diferencias en los promedios de los valores obtenidos en cada uno de los momentos del estudio.

CUADRO 1. Sistema de inoculación y sangría para la obtención de suero hiperinmune Antialacránico.

CALENDARIO DE INMUNIZACION PARA EL GRUPO DE ALACRAN					
DIA	INOCULO NUMERO	DOSIS LD 50 *	SANGRIA	ADYUVANTE	DIA DE MUESTREO
0	1	5		Completo de Freund	1
6	2	5		Incompleto de Freund	
13	3	5		Gel de Aluminio	
20	4	10		Gel de Aluminio	2
27	5	15		Gel de Aluminio	
34	6	20		Gel de Aluminio	
41	7	25		Gel de Aluminio	
48	8	30		Gel de Aluminio	3
55	9	40		Gel de Aluminio	
57	10	50		Gel de Aluminio	
59	11	50		Gel de Aluminio	
63	12	80		Gel de Aluminio	
69			PRUEBA		4
71			COSECHA		
72			COSECHA		5

* Dosis letal 50 % (raton)

C. R. O. S. 1992

CUADRO 2. Sistema de inoculación y sangría para la obtención de suero hiperinmune Antidiftérico.

CALENDARIO DE INMUNIZACION PARA EL GRUPO DE DIFTERIA					
DIA	INOCULO NUMERO	DOSIS LD 50 *	SANGRIA	ADYUVANTE	DIA DE MUESTREC
0	1	100		Completo de Freund	1
14	2	100		Incompleto de Freund	
24	3	50		Gel de Aluminio	2
34	4	100		Gel de Aluminio	
53	5	150		Gel de Aluminio	
59	6	200		Gel de Aluminio	3
67	7	400		Gel de Aluminio	
73	8	600		Gel de Aluminio	
80			PRUEBA		4
83			COSECHA		
84			COSECHA		5

* Dosis letal 50 % (raton)

C. R. O. S. 1992

CUADRO 3. Sistema de inoculación y sangría para la obtención de suero hiperinmune Antitetánico.

CALENDARIO DE INMUNIZACION PARA EL GRUPO DE TETANOS					
DIA	INOCULO NUMERO	DOSIS LI *	SANGRIA	ADYUVANTE	DIA DE MUESTREO
0	1	100		Completo de Freund	1
14	2	100		Incompleto de Freund	
24	3	50		Gel de Aluminio	
34	4	100		Gel de Aluminio	2
41	5	150		Gel de Aluminio	
59	6	200		Gel de Aluminio	
66	7	400		Gel de Aluminio	3
70	8	600		Gel de Aluminio	
80			PRUEBA		4
83			COSECHA		
84			COSECHA		5

* Unidades de floculacion

C. R. O. S. 1992

RESULTADOS

Los valores promedio de cada prueba, en cada grupo para los diferentes días de muestreo se resumen en los cuadros 4, 5 y 6, y en las figuras 1 a 6.

El cuadro 4 muestra el comportamiento del grupo de Alacrán en el que se observa un descenso en los niveles de albúmina, incremento en los niveles de globulinas, valores con muy poca variación tanto para bilirrubina directa como para la indirecta, tendencia al ascenso en los valores de fosfatasa alcalina sérica y descenso en los valores promedio de transaminasa glutámico - oxaloacética.

El cuadro 5 muestra el comportamiento del grupo de Difteria en el que se observa un descenso en los niveles de albúmina, incremento en los niveles de globulinas, valores oscilantes en la prueba de bilirrubina directa, tendencia ascendente en la bilirrubina indirecta, valores con poca variación en fosfatasa alcalina sérica y un descenso en los primeros valores de la prueba de transaminasa glutámico - oxaloacética para finalmente elevarse.

El cuadro 6 muestra el comportamiento del grupo de Tétanos en el que se observa un descenso en los niveles de albúmina, un ascenso en los niveles de globulinas en los primeros muestreos y un descenso en el último, un descenso brusco inicial y un paulatino aumento en los muestreos finales en la prueba de bilirrubina directa, aumento en los valores de bilirrubina

indirecta, tendencia al descenso en la fosfatasa alcalina sérica y aumento en los valores de transaminasa glutámico - oxaloacética.

En el cuadro 7 se muestran los valores promedio globales por grupos en las seis pruebas realizadas.

Se aprecia en la prueba de albúmina que el grupo de Tétanos presenta el valor más bajo y Difteria el valor más alto, en globulinas quien muestra el valor más bajo es el grupo de Difteria y el que muestra el valor más elevado es Tétanos, en bilirrubina directa el grupo de Alacrán presenta el valor más bajo y Difteria el más alto, en bilirrubina indirecta el valor más bajo los presenta el grupo de Alacrán y el más alto el grupo de Tétanos, para la prueba de fosfatasa alcalina sérica el grupo de Tétanos presenta el valor más bajo y Alacrán el más alto, finalmente para transaminasa glutámico - oxaloacética el grupo de Difteria presenta el valor más alto y el grupo de Tétanos el más bajo.

CUADRO 4. Valores promedio de las pruebas de funcionamiento hepático en equinos sometidos a un programa de hiperinmunización para la obtención de suero Antilacranico.

DIA	QUIMICA			SANGUINEA		
	ALBUMINA g/dl	GLOBULINAS g/dl	BILIRRUBINA DIRECTA mg/dl	BILIRRUBINA INDIRECTA mg/dl	FOSFATASA ALCALINA mU/ml	TRANSAMINASA GLUTAMICO- OXALOACETICA U. Reitmar/ml
1 FRIEDMAN	SI	SI	NO	NO	SI	SI
2 ANDEVA-TUKEY						
3 0	A 4.01	B 2.77	AB 0.010	A 0.093	B 52.56	A 122.88
4 24	B 3.07	B 3.72	AB 0.012	A 0.064	A 84.32	B 64.67
5 59	B 2.83	A 5.25	A 0.016	A 0.040	A 87.06	B 68.52
6 80	B 2.58	A 5.13	B 0.008	A 0.066	A 96.25	B 65.35

- 1 - FRIEDMAN: Se acepta hipótesis alterna H1 = existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores. P = 0.05
- 2 - ANDEVA - TUKEY: Medias con la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes P = 0.05
- 3 Muestreo basal
- 4 Muestreo tomado después de dos inoculaciones
- 5 Muestreo tomado después de cinco inoculaciones
- 6 Muestreo tomado después de ocho inoculaciones

C.R.O.S. 1992

CUADRO 5. Valores promedio de las pruebas de funcionamiento hepatico en equinos sometidos a un programa de hipersensibilizacion para la obtencion de suero Antidifterico.

DIA	QUIMICA		SANGUINEA		FOSFATASA ALCALINA mU/ml	TRANSAMINASA GLUTAMICO- OXALOACETICA U. Reitman/ml
	ALBUMINA g/dl	GLOBULINAS g/dl	BILIRRUBINA DIRECTA mg/dl	BILIRRUBINA INDIRECTA mg/dl		
1 FRIEDMAN	SI	SI	NO	NO	NO	NO
2 ANDEVA-TUKEY						
3 0	A,B 3.64	A 3.19	A 0.071	A,B 0.214	A 91.3	A 115.1
4 24	A 3.81	A 3.23	A 0.099	A,B 0.249	A 85.9	A,B 102.7
5 58	B 3.03	A 4.09	A 0.078	B 0.111	A 89.7	A,B 99.4
6 80	A,B 3.60	A 3.70	A 0.109	A,B 0.236	A 77.1	B 72.7
7 84	A,B 3.23	A 4.55	A 0.068	A 0.426	A 83.2	A,B 87.4

1 - FRIEDMAN: Se acepta hipotesis alterna H1 = existen diferencias estadisticamente significativas entre los valores P = 0,05

2 - ANDEVA - TUKEY: Medias con la misma letra en la misma columna no son estadisticamente diferentes P = 0,05

3 Muestreo basal

4 Muestreo tomado despues de dos inoculaciones

5 Muestreo tomado despues de cinco inoculaciones

6 Muestreo tomado despues de ocho inoculaciones

7 Muestreo final tomado despues de dos sangrias de cosecha y sus respectivas plasmaferesis

C.R.O.S. 1992

CUADRO 6. Valores promedio de las pruebas de funcionamiento hepático en equinos sometidos a un programa de hiperinmunización para la obtención de suero Antitetánico.

DIA	QUIMICA SANGUINEA					
	ALBUMINA g/dl	GLOBULINAS g/dl	BILIRRUBINA DIRECTA mg/dl	BILIRRUBINA INDIRECTA mg/dl	FOSFATASA ALCALINA mU/ml	TRANSAMINASA GLUTAMICO- OXALOACETICA U. Reitman/ml
1 FRIEDMAN	SI	SI	NO	SI	NO	SI
2 ANDEVA-TUKEY						
3	A	A	A	B	A	B
0	3.48	4.36	0.119	0.234	110.4	11.6
4	A,B	A	B	B	A	A
34	2.94	5.29	0.044	0.233	87.7	86.89
5	A	A	A,B	B	A	A
66	3.17	4.63	0.059	0.159	76.8	76.75
6	A,B	A	A,B	A,B	A	A
80	3.03	5.23	0.093	0.348	73.1	63.10
7	B	A	A,B	A	A	A
84	2.36	2.53	0.076	0.601	85.1	64.07

1 - FRIEDMAN: Se acepta hipótesis alternativa H_1 = existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores. $P = 0.05$

2 - ANDEVA - TUKEY: Medias con la misma letra en la misma columna no son estadísticamente diferentes. $P = 0.05$

3 Muestra basal

4 Muestreo tomado después de tres inoculaciones

5 Muestreo tomado después de seis inoculaciones

6 Muestreo tomado después de ocho inoculaciones

7 Muestreo final tomado después de dos sangres de cosecha

y sus respectivas plasmaféresis

C.R.O.S. 1982

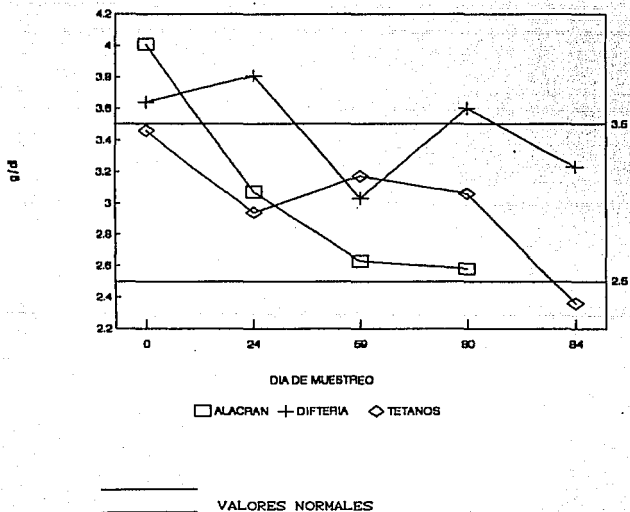
CUADRO 7. Valores promedio globales de las pruebas de funcionamiento hepatico en equinos sometidos a tres programas de hiperinmunizacion para la obtencion de suero Antialacranico, Antidifterico y Antitetanico.

GRUPO	1					
	QUIMICA			SANGUINEA		
	ALBUMINA	GLOBULINAS	BILIRRUBINA DIRECTA	BILIRRUBINA INDIRECTA	FOSFATASA ALCALINA	TRANSAMINASA GLUTAMICO-OXALOACETICA
	g/dl	g/dl	mg/dl	mg/dl	mU/ml	U. Reitman/ml
ALACRAN	B 3.07	A,B 4.22	B 0.011	B 0.065	A 87.44	B 80.36
DIFTERIA	A 3.46	B 3.75	A 0.085	A 0.248	A 86.58	A 97.10
TETANOS	B 3.00	A 4.69	A 0.077	A 0.312	A 80.05	C 60.35

1 Medias con la misma letra en la misma columna no son estadisticamente diferentes P = 0.05

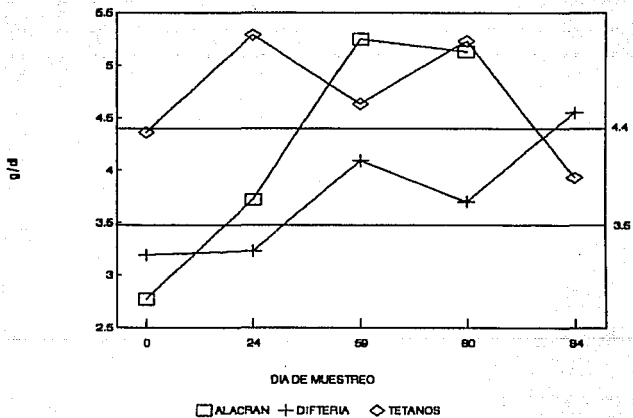
C.R.O.S. 1992

FIGURA 1. Valores promedio para la prueba de albúmina en los diferentes días de muestreo para los grupos de Alacrán, Difteria y Tétanos.



C. R. O. S. 1992

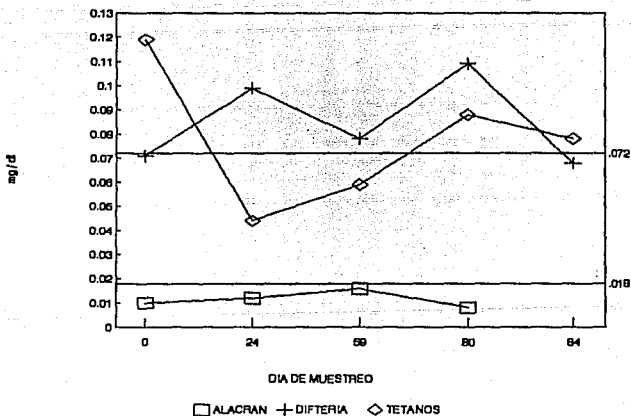
FIGURA 2. Valores promedio para la prueba de globulinas en los diferentes días de muestreo para los grupos de Alacrán, Difteria y Tétanos.



———— VALORES NORMALES

C. R. O. S. 1982

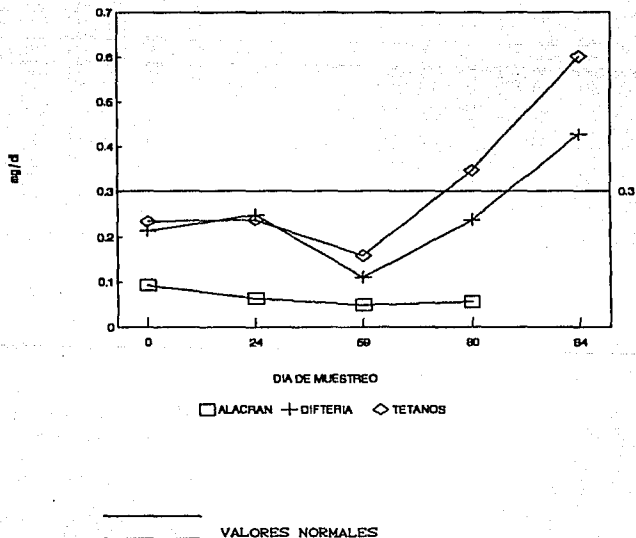
FIGURA 3. Valores promedio para la prueba de bilirrubina directa en los diferentes días de muestreo para los grupos de Alacrán, Difteria y Tétanos.



—————
 VALORES NORMALES

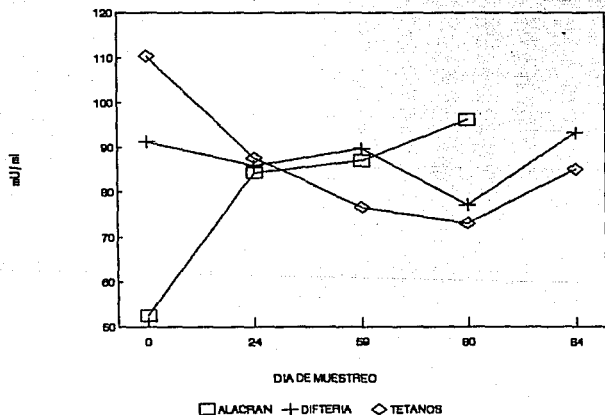
C. R. O. S. 1992

FIGURA 4. Valores promedio para la prueba de bilirrubina indirecta en los diferentes días de muestreo para los grupos de Alacrán, Difteria y Tétanos.



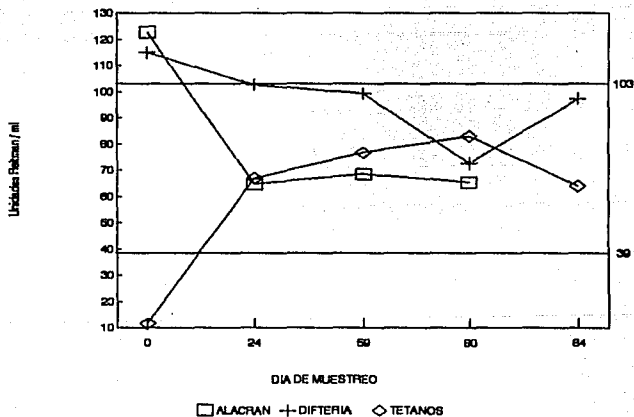
C. R. O. S. 1992

FIGURA 5. Valores promedio para la prueba de fosfatasa alcalina sérica en los diferentes días de muestreo para los grupos de Alacrán, Difteria y Tétanos.



C. R. O. S. 1992

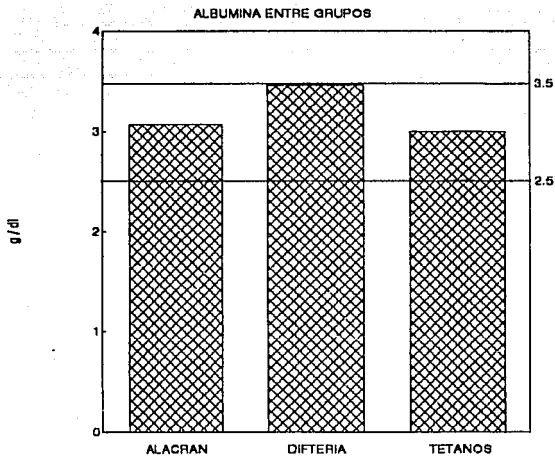
FIGURA 6. Valores promedio para la prueba de transaminasa glutámico - oxaloacética en los diferentes días de muestreo para los grupos de Alacrán, Difteria y Tétanos.



———— VALORES NORMALES

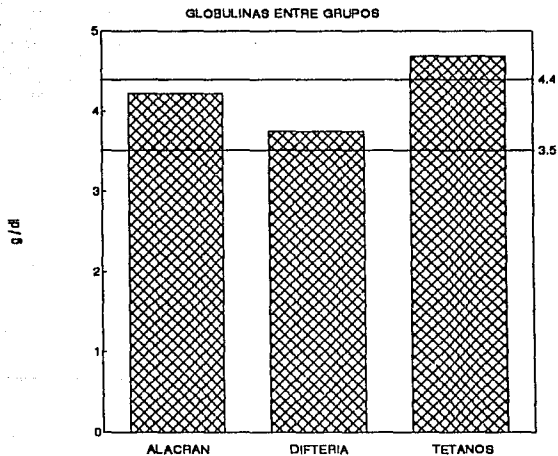
C. R. O. S. 1992

FIGURA 7. Valores promedio globales de los grupos de Alacrán, Difteria y Tétanos para la prueba de albúmina.



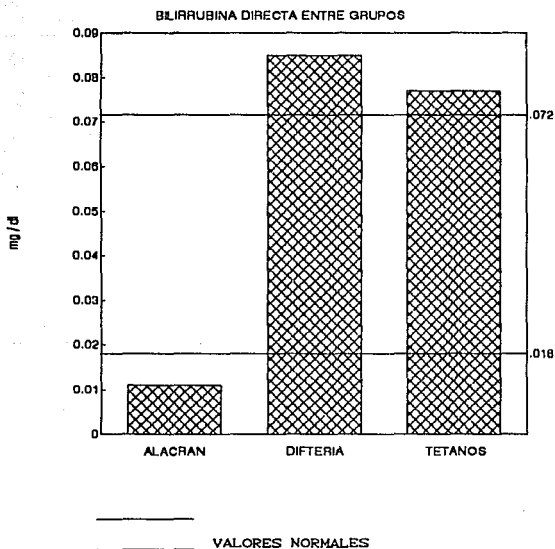
C. R. O. S. 1992

FIGURA 8. Valores promedio globales de los grupos de Alacrán, Difteria y Tétanos para la prueba de globulinas.



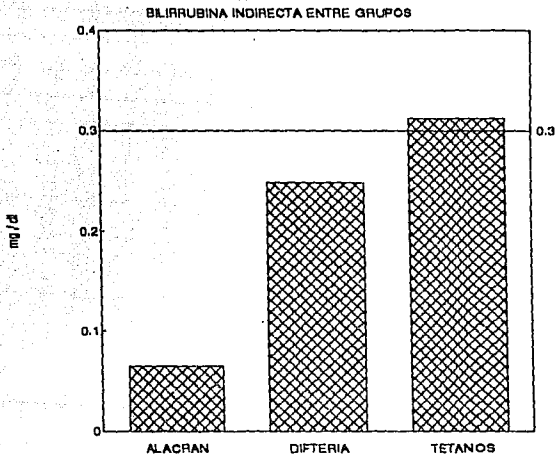
C. R. O. S. 1992

FIGURA 9. Valores promedio globales de los grupos de Alacrán, Difteria y Tétanos para la prueba de bilirrubina directa.



C. R. O. S. 1992

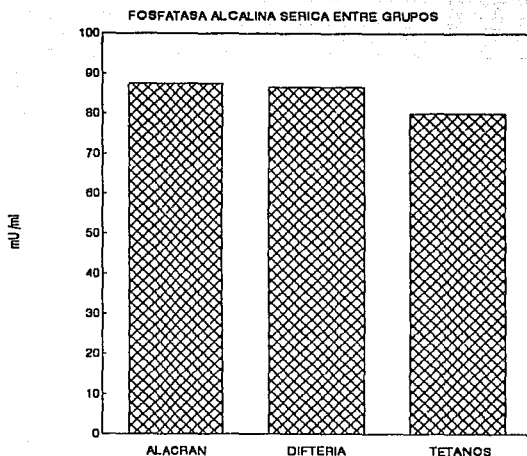
FIGURA 10. Valores promedio globales de los grupos de Alacrán, Difteria y Tétanos para la prueba de bilirrubina indirecta.



VALORES NORMALES

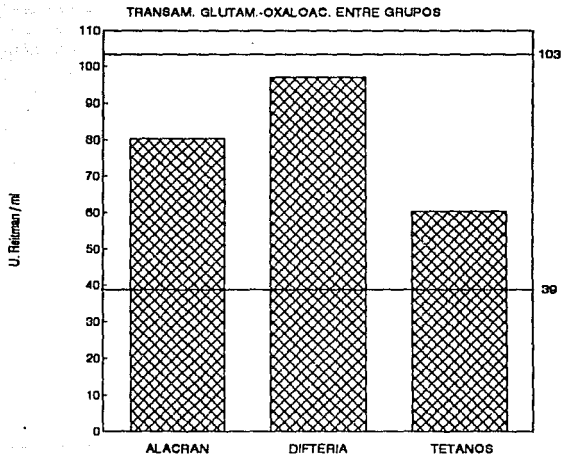
C. R. O. S. 1992

FIGURA 11. Valores promedio globales de los grupos de Alacrán, Difteria y Tétanos para la prueba de fosfatasa alcalina sérica.



C. R. O. S. 1992

FIGURA 12. Valores promedio globales de los grupos de Alacrán, Difteria y Tétanos para la prueba de transaminasa glutámico - oxaloacética.



————— VALORES NORMALES

C. R. O. S. 1992

DISCUSION.

La utilización de pruebas bioquímicas para la valoración del daño hepático son una herramienta muy utilizada y pueden ser útiles para la detección de alteraciones que se generan en los animales sometidos a inoculaciones múltiples para la elaboración de sueros hiperinmunes.

En el presente estudio, en el grupo de alacrán se encontraron variaciones estadísticamente significativas en los valores de albúmina, globulinas, bilirrubina directa, fosfatasa alcalina sérica y en la determinación de transaminasa - glutámico oxalacética; para la prueba de bilirrubina indirecta no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos durante el estudio.

El hígado es la fuente de toda la albúmina sérica, y la falla en la síntesis de estas proteínas puede disminuir su concentración sérica. Generalmente esta falla no ocurre sino hasta los estados terminales de la enfermedad; de esta forma, la determinación de los niveles de albúmina sérica no son muy útiles para detectar estados tempranos de enfermedad hepática (5).

El grupo de alacrán mostró que en la concentración de albúmina existe una tendencia al descenso desde el valor inicial superior al nivel máximo normal con respecto a los muestreos subsiguientes, aunque sin rebasar el valor mínimo normal reportado en la literatura. No obstante la diferencia es estadísticamente significativa entre el muestreo basal (día 0) y el resto de los muestreos (días 24, 50 y 80) (figura 1). La

disminución en la cantidad de albúmina puede ser compensatoria al aumento en los niveles de globulinas para mantener el equilibrio oncótico (3,14) en animales utilizados para producir sueros hiperinmunes. En enfermedades hepáticas crónicas los niveles de albúmina descienden y el animal tiende a la hipoproteïnemia por falta de síntesis protéica sérica. En el presente estudio no se afectó la producción de proteínas totales y ningún animal manifestó signología de insuficiencia hepática. Muestras posteriores podrían determinar si el comportamiento de descenso continúa para confirmar la presencia de daño hepático.

Los niveles de globulina sérica pueden incrementarse tanto en infecciones como en enfermedades hepáticas autoinmunes. Este incremento en los niveles séricos de globulinas asociado al decremento de albúmina sérica tenderá a disminuir la relación albúmina/globulina (5).

En los valores de la concentración de globulinas existe una tendencia al ascenso rebasando los niveles normales a partir del día 59 con diferencias estadísticamente significativas con respecto al valor inicial antes del periodo de inmunización (figura 2). Las variaciones observadas corresponden a lo esperado en un programa de hiperinmunización ya que los anticuerpos formados son gamma-globulinas (20).

Otro indicador de la función excretoria del hígado es la bilirrubina tanto la directa como la indirecta. Una hemólisis ocasionaría inicialmente un incremento de bilirrubina indirecta y un discreto ascenso de la bilirrubina directa. Una falla

hepática en la cojugación ocasionará un incremento en los niveles séricos de la bilirrubina indirecta mientras que una falla en la secreción producirá un ascenso en los niveles de la bilirrubina directa. Un bloqueo del flujo biliar, puede causar también un incremento de los niveles séricos de bilirrubina directa e indirecta (4).

Los valores séricos encontrados de bilirrubina directa muestran que existe una tendencia al ascenso sin alcanzar el valor mínimo normal, las variaciones encontradas no son estadísticamente significativas con respecto al valor del muestreo basal. Este grupo mostró en la totalidad de los muestreos valores por debajo de los mínimos normales (figura 3).

En la prueba de bilirrubina indirecta no se observaron alteraciones estadísticamente significativas (figura 4). En esta prueba se observa también el mismo comportamiento que en la anterior, mostrando valores muy bajos y parecidos entre sí.

El incremento de la actividad enzimática del suero es a menudo el primer cambio notable en enfermedad hepática. Las enzimas hepáticas se encuentran siempre dentro de los hepatocitos donde catalizan la mayor parte de los procesos biológicos. Cuando se daña el hepatocito y se pierde la integridad de las membranas, las enzimas son liberadas hacia el torrente sanguíneo. Las enzimas que se encuentran normalmente en altas concentraciones dentro de las células hepáticas exclusivamente pueden ser empleadas para el diagnóstico de enfermedades hepáticas ya que los cambios son más pronunciados.

Existen evidencias de que el incremento de ciertas enzimas en el suero no son tan significativas en grandes especies como en humanos y perros (5). La concentración sérica de algunas enzimas aumenta cuando las membranas celulares son alteradas (transaminasas y deshidrogenasa láctica), y otras aumentan cuando ocurren bloqueos de la excreción biliar (fosfatasa alcalina y gamma glutamil transferasa). Las enzimas más comunmente empleadas en problemas hepáticos son fosfatasa alcalina, transaminasa glutámico - pirúvica, transaminasa glutámico - oxaloacética, deshidrogenasa del sorbitol, deshidrogenasa láctica, deshidrogenasa del glutamato y gamma glutamil transferasa (5).

La fosfatasa alcalina es una enzima no específica, hidroliza muchos ésteres del ácido fosfórico y se encuentra presente en hígado, hueso, intestino, placenta y riñones. Se excreta por vía biliar, así que el incremento en la actividad sérica de fosfatasa alcalina sugiere obstrucción biliar (5).

Los valores séricos de fosfatasa alcalina encontrados en el grupo de alacrán muestran una tendencia al ascenso desde el muestreo basal (día 0) y el resto de los muestreos (días 24, 50 y 80). Esta tendencia ascendente conforme avanza el tiempo sugiere lesión hepática, sin embargo los valores referenciales citados en la bibliografía para fosfatasa sérica en equinos son muy variables (figura 5).

La transaminasa glutámico - oxaloacética comunmente se usa para indicar daño hepatocelular. Se encuentra presente en corazón, sistema músculo - esquelético y riñón, así que la

actividad sérica de transaminasa glutámico - oxaloacética se verá incrementada en daño hepático y muscular (4,5).

Los valores de transaminasa glutámico - oxaloacética en el suero de los equinos del grupo de alacrán muestran una tendencia al descenso, se aprecia que el valor inicial se encuentra por encima del rango normal y desciende sin rebasar el límite mínimo normal en los subsiguientes muestreos. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el muestreo basal (día 0) y el resto de los muestreos (días 24, 59 y 80).

En el grupo de difteria se observaron variaciones con diferencias estadísticamente significativas en los valores de albúmina y globulinas, para las pruebas de bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, fosfatasa alcalina sérica y transaminasa glutámico - oxaloacética no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al valor inicial antes del procedimiento de inoculaciones y sangrías.

En la prueba de albúmina existe una variación en los valores de los muestreos de los días 0, 24 y 80 que sobrepasan el límite máximo normal mientras que los valores de los días 59 y 80 se encuentran dentro del rango normal, la diferencia estadísticamente significativa se aprecia entre los valores de los días 24 y 59.

Los valores de la concentración sérica de globulinas muestran un incremento gradual con diferencias estadísticamente significativas. El comportamiento de este grupo corresponde al esperado ya que paulatinamente va aumentando la concentración de

globulinas hasta sobrepasar el valor máximo normal en el día 84 a pesar de haber pasado ya por dos sangrías de cosecha.

En la prueba de bilirrubina directa se observa que en los muestreos de los días 24, 50 y 80 el valor obtenido sobrepasa el valor máximo normal (figura 3), sin embargo, estos cambios no son estadísticamente significativos. El comportamiento global de todos los muestreos indican elevaciones y descensos alternados que podrían ser indicativos de lesión hepática aguda seguida de una rápida recuperación.

En la prueba de bilirrubina indirecta existe una tendencia al ascenso mostrando solo un ligero descenso en el muestreo del día 50. El valor del último muestreo es numéricamente mayor. Este cambio puede deberse bien a una lesión hepática, bien a una hemólisis intravascular pudiendo estar relacionada con la aplicación de dos plasmaféresis correspondientes a las dos sangrías de cosecha las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas.

En la prueba de fosfatasa alcalina sérica existe una tendencia oscilante sin manifestar diferencias estadísticamente significativas (figura 5). El valor más alto observado corresponde al día 84, último día del primer ciclo de producción. La tendencia al aumento de esta enzima en el suero sugiere lesión hepática inicial.

Los valores de los muestreos en la prueba de transaminasa

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

glutámico - oxaloacética manifiestan una tendencia descendente en los primeros cuatro muestreos con un incremento en el último (día 84) (figura 8). No existen causas reportadas de disminución en la concentración sérica de transaminasa glutámico - oxaloacética.

En los cinco muestros que se realizaron en los caballos del grupo de tétanos se apreciaron cambios que resultaron ser significativos estadísticamente. Estos cambios se apreciaron en las pruebas de albúmina, globulinas, bilirrubina indirecta y transaminasa glutámico - oxaloacética; en las pruebas de bilirrubina directa y fosfatasa alcalina sérica los cambios encontrados resultaron ser no significativos.

La concentración sérica de albúmina encontrada muestra una tendencia al descenso. Los primeros cuatro muestreos se encuentran dentro del rango de valores normales, el último muestreo rebasa el valor mínimo normal. La diferencia estadísticamente significativa se aprecia entre los valores de los días 0 y 66 con respecto al último muestreo (día 84). Los muestreos de los días 34 y 80 no muestran diferencias significativas con respecto a los otros valores ni entre ellos.

Los valores de la concentración sérica de globulinas muestran que los muestreos de los días 24, 59 y 80 se encuentran fuera del valor máximo normal mientras que los de los muestreos basal y final (días 0 y 84) se encuentran dentro del rango de los valores normales, siendo estas variaciones estadísticamente

significativas. Las globulinas aumentaron mientras duró el calendario de hiperinmunización, en el último muestreo se detectó una disminución debida probablemente a las sangrias de cosecha.

En la prueba de bilirrubina directa se observa una tendencia al ascenso pero sólo apartir del día 24 ya que entre éste y el primer muestreo se aprecia un marcado descenso. Los muestreos que sobrepasan el nivel máximo normal son los de los días 0, 80 y 84. Las diferencias no son estadísticamente significativas. Estas variaciones en los valores pueden deberse a periodos de lesión y recuperación hepáticas.

En la prueba de bilirrubina indirecta las diferencias estadísticamente significativas se observan entre los tres primeros muestreos (días 0, 34 y 66) y el último (día 84). El único muestreo que no es estadísticamente diferente a los demás es el del día 80. El marcado ascenso podría ser indicativo de daño hepático a consecuencia de los inóculos aplicados o por efecto de una hemólisis (2,3,14) relacionada con la plasmaféresis.

La concentración sérica de fosfatasa alcalina sérica muestra una tendencia al descenso desde el día 0 hasta el día 80 para posteriormente elevarse en el día 84. Estas variaciones no son estadísticamente significativas. La dirección ascendente de la concentración sérica de fosfatasa alcalina conforme avanza el tiempo sugiere lesión hepática (2,14) (figura 5).

Los valores de los muestreos en la prueba de transaminasa glutámico - oxaloacética muestran una tendencia ascendente desde el día 0 hasta el día 80 sin llegar a rebasar el nivel máximo normal, el valor del muestreo basal es el único que rebasa el valor mínimo normal, en el último muestreo (día 84) se observa un descenso que no sobrepasa el nivel mínimo normal. La diferencia estadísticamente significativa se observó entre el muestreo basal (día 0) y el resto de los muestreos (días 34, 66, 80 y 84) (figura 6); alteraciones en diversos órganos como sistema músculo - esquelético, daño al miocardio o enfermedades hemolíticas, además de lesión hepática, pueden provocar valores elevados en las transaminasas (2,3,14).

En cuanto al comportamiento observado en los valores globales promedio entre los tres grupos se puede mencionar lo siguiente:

En la prueba de albúmina se observa diferencia significativa entre el grupo de Difteria y los otros dos, aclarando que los valores promedio de los tres grupos se encuentran dentro del rango de valores normales. El valor promedio del grupo de Difteria es mayor que los valores promedio de los grupos de Alacrán y Tétanos.

En la prueba de globulinas se observaron diferencias significativas entre los grupos de Difteria y Tétanos encontrándose el valor medio más alto en el grupo de Tétanos y el más bajo en el de Difteria, el grupo de Alacrán no mostró

diferencia estadística con los otros grupos.

El valor promedio del grupo de Tétanos se encontró por encima del valor máximo normal, los valores de los grupos de Difteria y Alacrán se encontraron dentro del rango de valores normales.

En la prueba de bilirrubina directa también se observa diferencia significativa entre el grupo de Alacrán y los grupos de Difteria y Tétanos siendo éstos dos últimos mayores que el primero, el cual se encuentra debajo del valor mínimo normal en contraste con los grupos de Difteria y Tétanos que sobrepasan el valor máximo normal.

Para la prueba de Bilirrubina indirecta la diferencia significativa se encuentra entre el grupo de Alacrán y los otros dos, siendo más altos los valores promedio de los grupos de Difteria y Tétanos que el de Alacrán. El grupo de Tétanos sobrepasa el valor máximo normal y los otros dos se encuentran dentro del rango de valores normales.

Para la prueba de fosfatasa alcalina sérica no se observaron diferencias estadísticamente significativas, la bibliografía no reporta valores normales para esta prueba en equinos.

En la prueba de transaminasa glutámico - oxaloacética existen diferencias significativas entre los tres grupos, el valor promedio más alto se encuentra en el grupo de Difteria y el más bajo en el grupo de Tétanos. Todos ellos se encuentran dentro del rango normal de valores.

Los resultados globales de las diferentes pruebas en los

tres grupos nos indican la capacidad de cada inóculo de provocar lesión hepática y el grado en que son capaces de inducir una mayor o menor cantidad de anticuerpos.

No existe una disminución significativa de los niveles de albúmina en los tres grupos lo que indica que en el primer ciclo de producción no hay daño hepático severo que pueda reflejarse en descenso brusco de los niveles de albúmina.

Existe un aumento notable en los tres grupos de los niveles de globulinas pero el único grupo que rebasa los niveles normales es el de Tétanos, lo que sugiere que es el inóculo con mayor capacidad antigénica.

Se observa un descenso notable en los niveles de bilirrubina directa en el grupo de Alacrán mientras que los otros grupos rebasan el valor máximo normal, lo que sugiere una lesión hepática moderada.

En la prueba de bilirrubina indirecta el grupo de Difteria se mantuvo en un rango moderadamente alto y el grupo de Tétanos sobrepasa el valor máximo normal, lo que sugiere un grado mayor de toxicidad hepática del inóculo de Tétanos. La causa de la disminución en los valores de bilirrubina directa y bilirrubina indirecta en el grupo de Alacrán no ha sido determinada.

En la prueba de fosfatasa alcalina sérica se observa uniformidad en los valores globales de los tres grupos, sin embargo, no existen valores normales reportados en la bibliografía para esta prueba.

En la prueba de transaminasa glutámico - oxaloacética los valores globales de los tres grupos se encuentran dentro del rango de valores normales que cita la bibliografía, la

proximidad que muestra el valor del grupo de Difteria al límite superior sugiere mayor toxicidad hepática de éste inóculo con respecto a los otros dos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos de las diferentes pruebas realizadas para la valoración del daño hepático en equinos destinados a la producción de sueros hiperinmunes antialacránico, antidiftérico y antitetánico, indican que después de un periodo inicial con 12 inoculaciones para el grupo de alacrán, 8 para los grupos de difteria y tétanos y dos sangrías de cosecha con sus respectivas plasmaféresis para cada grupo, existen cambios que sugieren un daño hepático inicial.

Se considera que la aplicación masiva de antígenos y los procedimientos de sangría y plasmaféresis a los que son sometidos los caballos destinados a la producción de antisueros provocan alteraciones hepáticas por lo que es importante el estudio bioquímico y clínico de los mismos para detectar éstas alteraciones lo más temprano posible e implementar medidas que disminuyan las lesiones y prolonguen la vida productiva de los equinos, así como su eficiencia productiva.

Estudios seriados a intervalos determinados para evaluar la eficiencia inmunológica de los equinos, para evaluar el daño orgánico tanto hepático, como renal y cardiaco, con pruebas más específicas como biopsias hepáticas, pueden ayudar a prolongar la vida productiva de estos animales.

Se sugiere el seguimiento de los casos de los animales que fallezcan por medio de estudios de necropsia e histopatología para confirmar la(s) causa(s) de la muerte y el grado de lesión en los órganos del animal.

TABLA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolo o abreviatura (en orden de aparición)	Significado
l	litros
g	gramos
ml	mililitros
c. b. p.	cuanto baste para
DL ₅₀	Dosis Letales 50%
TGO	Transaminasa Glutámico - Oxaloacética
Lf	Unidade de floculación
g/dl	gramos/decilitro
mg/dl	miligramos/decilitro
mU/ml	miliUnidades/mililitro
U. Reitman/ml	Unidades Reitman/mili- litro

LITERATURA CITADA

1. Asimov, I.: Introducción a la ciencia II. (Ciencias biológicas); Ed. Orbis, S.A., España, 1985.
2. Benjamín, M.M.: Manual de patología clínica veterinaria. Ed. Limusa, México, 1984.
3. Coles, H.E.: Patología diagnóstica veterinaria. Ed. Interamericana, México, 1980.
4. Craig, A.M. and Pearson, E.G.: The diagnosis of liver disease in equine and food animal. Part 1. *Modern Veterinary Practice*. 10-16 (1980).
5. Craig, A.M. and Pearson, E.G.: The diagnosis of liver disease in equine and food animal. Part 2. *Modern Veterinary Practice*. 66-70 (1980).
6. Daniel, W. W.: Bioestadística. Ed. Limusa, México, 1985.
7. Doxey, L.D.: Veterinary clinical pathology. William Clowes and Sons, Great Britain, 1971.
8. Green, M.E. and Ward, M.G.: A simple method of plasmapheresis of the horse. *Lab. Animal Science*, Vol. 24: No. 6, 215-219 (1972).
9. Greemoldi, R.J. and Márquez, A.G.: Use of liver function test in veterinaty medicine. *Rev. Aust. Vet. Jou.*, Vol. 49: 795-801 (1977).
10. Hernández, S.J.: Departamento de sueros hiperinmunes del Instituto Nacional de Higiene; comunicación personal, 1982.
11. Hoe, L.M. and Wilkinson, J.J.: Liver function: A review. *Aust. Vet. Jou.*, Vol. 49, 645-653 (1973).

12. Hulcochea, J.A.: Pruebas de laboratorio usadas para detectar daño hepático en bovinos. Tesis de Licenciatura, *Fac. de Med. Vet. y Zool.*, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 1987.
13. Jubb, F.V. and Kennedy, C.P.: *Patology of domestic animals*. 2nd. ed. *Academic Press*. U.S.A., 1982.
14. Kaneko, J.J.: *Clinical chemistry of domestic animals*. 3th ed. *Academic Press*, U.S.A., 1984.
15. Larrade, C. y Barbosa, H.: Aspectos inmunológicos de la producción industrial de antitoxinas. *Ciencia Veterinaria*, Vol. 1, 44-49 (1976).
16. Parra, A.B.: Manual de procedimientos de la producción de sueros hiperinmunes en el Instituto Nacional de Higiene. *Instituto Nacional de Higiene, México*, 1985.
17. Reportes de las necropsias efectuadas en la sección de análisis clínicos y patología veterinarias de la Facultad de Estudios Superiores - Cuautitlán y Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1991.
18. Scarnell, J.: Recall of immunity in horses previously immunized with an aluminium based toxoid. *Veterinary Record*, 805-811 (1983).
19. Secretaría de Salubridad y Asistencia: Estadística de mortalidad en México. *Instituto de Salud Pública, México*, 1980.
20. Tizard, I.: *Inmunología Veterinaria*. 2da ed., Ed. *Interamericana, México*, 1984.