



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DETERMINACIÓN DE FUNCIONALIDAD HEPÁTICA
EN EQUINOS FINA SANGRE DE CARRERA (FSC)
MEDIANTE PRUEBAS DE COAGULACIÓN.**

DANIELA FERNANDA DÍAZ PEÑA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: ENRIQUE A. PINTO PEÑA.

SANTIAGO, CHILE
2006

ÍNDICE

Resumen	2
Summary	3
Introducción	4
Revisión Bibliográfica	6
Objetivos	32
Material y Métodos	33
Resultados	40
Discusión	62
Conclusión	67
Bibliografía	68
Material Complementario	77

RESUMEN

Como el hígado es el sitio donde se sintetizan la mayoría de las proteínas de la cascada de la coagulación, una hemostasis anormal puede ser consecuencia de una insuficiencia hepática, convirtiéndose así, los factores de coagulación en una buena herramienta para la evaluación de funcionalidad hepática en equinos.

El propósito de este estudio fue determinar valores de referencia para Fibrinógeno (Fb), Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (TTPA) y Tiempo de Protrombina (TP) en caballos Fina Sangre de Carrera (FSC), y establecer si factores como sexo y edad influyen en la cuantificación de dichas pruebas. Para ello se seleccionaron equinos clínicamente sanos (n=80) de 1 a 5 años de edad provenientes de haras e hipódromos de la Región Metropolitana, sometidos a normas de manejo, alimentación y entrenamiento habituales para la especie.

Las pruebas de coagulación se realizaron en un coagulómetro semiautomático, para Fb se utilizó método de Clauss, para TTPA el método de tiempo de cefalina más activador y para TP el método de Quick.

Se determinó la distribución de los datos y se calculó los valores de referencia con un intervalo de confianza de 95%. Para Fb se encontraron diferencias significativas entre edades, por esta razón se determinó realizar valores de referencia para equinos de 1 a 2 años y otro intervalo para equinos mayores de 3 años. Para TTPA y TP se determinó valores de referencia para la muestra completa.

Los valores de referencia obtenidos de este estudio proveen valiosa información para la evaluación de parámetros de coagulación, evaluación de funcionalidad hepática y para comparaciones interlaboratorios.

Palabras claves: Factores de coagulación, equinos, funcionalidad hepática, valores de referencia.

SUMMARY

As the liver is the site where are synthesized most of proteins of the cascade of the coagulation, an abnormal hemostasis can be consequence of a hepatic insufficiency, becoming thus, the coagulation factors in a good instrument for the evaluation of hepatic functionality in equines.

The purpose of this study was to determine reference values for Fibrinogen (Fb), Prothrombin Time (PT), Activated Partial Thromboplastin Time (ATTP) in Thoroughbred horses, and to establish if factors as sex and age influence in the quantification of these tests. Therefore, were selected clinically healthy equines (n=80) of 1 to 5 years of age originating of haras and racecourse of Metropolitan Region, maintained under habitual norms of handling, feeding and training for Thoroughbred horses.

The coagulation tests were performed in a semiautomatic coagulometer, for Fb was used Clauss method, ATTP cephalin add activator time method and PT Quick method.

Data distribution was determined and reference intervals were calculated with a 95% confidence interval. For Fb were significant differences among ages, thereby it determined to develop values of reference for equines of 1 to 2 years and another one for equines of 3 years. For ATTP and PT were determined values of reference for the complete sample.

Reference intervals obtained on the study provide valuable information for assessing coagulation parameters, evaluation of hepatic functionality and for interlaboratory comparisons.

Key Words: Coagulation factors, equines, hepatic functionality, reference values.

INTRODUCCIÓN

El hígado tiene un papel crítico en una amplia variedad de funciones metabólicas, secretorias, excretorias y de almacenamiento, por lo cual frente a una enfermedad, insuficiencia o falla hepática, presenta una amplia variedad de signos clínicos.

Desafortunadamente, la mayoría de los signos son inespecíficos y tienen una alta variabilidad dependiendo de la extensión y duración de la enfermedad hepática, ya que requiere de la pérdida de por lo menos el 60-80% de su masa funcional para presentar signología.

Muchas veces una enfermedad hepática no está acompañada necesariamente de una insuficiencia hepática, por ello es importante diferenciar alteración de insuficiencia hepática, ya que esto conlleva a un cambio en el pronóstico del paciente. En insuficiencia ó enfermedad hepática crónica el pronóstico suele ser desfavorable, asociándose frecuentemente con fibrosis; en cambio en un proceso patológico agudo o alteración aún existe posibilidad de regeneración, por ello se hace necesario que el clínico dedicado a la medicina interna de equinos se apoye en pruebas de laboratorio, que le permitan visualizar el grado de falla y/o alteración de la funcionalidad hepática. Dichas pruebas serán útiles siempre que se cuente con intervalos de referencia (“valores normales”), que permitan determinar o inferir el grado de alteración patológica del proceso en curso.

El acelerado desarrollo de las ciencias de laboratorio, ha puesto a disposición de los Médicos Veterinarios métodos rápidos, sensibles y específicos, los que aún no cuentan con intervalos de referencia actualizados y que reflejen de mejor manera la situación de nuestro país. Las pruebas de coagulación en el laboratorio clínico veterinario, son un ejemplo de la falta de valores de referencia (métodos validados y actualizados, número de individuos adecuado y clínicamente sanos), presentando una amplia dispersión dependiendo del autor que se consulte; además, podrían estar influenciados por el ambiente, raza, manejo y/o entrenamiento.

En el presente estudio, se determinó los valores de referencia para los factores de coagulación que reflejan funcionalidad hepática: Tiempo de protrombina (expresado como porcentaje de actividad), Tiempo de tromboplastina parcial activada y Fibrinógeno, en equinos Fina Sangre de Carrera (FSC);

ya que al estar sintetizados en hígado la mayoría de los factores implicados en la cascada de la coagulación, representará fielmente tanto integridad como funcionalidad hepática, entregando así una herramienta, no sólo diagnóstica, sino pronóstica de utilidad al Médico Veterinario. Además se evaluó si factores como sexo y edad influyen en la cuantificación de dichas pruebas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En un estudio retrospectivo de la casuística del Servicio de Análisis Clínicos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE, Corrientes, Argentina), detallando datos obtenidos en alrededor de 15.000 animales, donde más del 20% de los pacientes fueron equinos, el porcentaje de afecciones hepáticas llega a un 24,3% ocupando el segundo lugar de enfermedades más frecuentes detectadas en equinos **(Coppo y Mussart, 2000)**.

En un caballo normal la mayor parte del hígado se encuentra a la derecha del plano medio, situado oblicuamente por detrás de la cara abdominal del diafragma, principalmente dentro de la caja torácica. Se extiende en sentido craneal desde el sexto o séptimo espacio intercostal y caudalmente hasta la decimoquinta costilla a nivel del riñón derecho. El hígado equino tiene cuatro lóbulos: derecho, izquierdo, medio y caudado. La superficie o cara visceral del hígado es cóncava e irregular y contiene el área (hilio) a través de la cual emerge el conducto hepático y penetran vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios (tríada portal). La bilis, producida por los hepatocitos, es excretada dentro de los canalículos biliares y sale a través de conductos biliares. Los conductos biliares corren adyacentes a las ramas de la vena porta y la arteria hepática, convergen y se unen en el hilio para formar el conducto hepático que drena dentro del duodeno proximal. El flujo biliar en el caballo es continuo debido a que no tiene una vesícula biliar o esfínter para regular el flujo en el sitio de entrada del conducto hepático al duodeno **(Dyce *et al.*, 2002)**.

El hígado recibe el 20% del gasto cardiaco y tiene dos aportes sanguíneos separados, la arteria hepática y la vena porta. La arteria hepática, rama del tronco celiaco, transporta un pequeño volumen sanguíneo con alto contenido de oxígeno y alta presión, desde el corazón hacia el hígado para sostener su actividad metabólica. La vena porta entra al hígado transportando sangre baja en oxígeno desde los órganos abdominales. La microcirculación hepática está constituida por vasos intrahepáticos <300 μm ., llamados sinusoides, canales vasculares distensibles, fenestrados, recubiertos por células endoteliales y macrófagos (células de Küpffer), es principalmente a este nivel donde se efectúa la regulación del flujo hepático y donde ambos sistemas – venoso y arterial – se fusionan. Esta red microvascular constituye una gran área para el intercambio de sustancias entre la

sangre y los hepatocitos. La sangre de los sinusoides drena dentro de las venas centrales y luego a las venas hepática y cava caudal **(Glasinovic, 2001)**.

El hígado está innervado tanto por el sistema simpático como parasimpático (nervios aferentes y eferentes). Los nervios hepáticos autónomos juegan un rol importante en la regulación metabólica y hemodinámica mediática del hígado. La estimulación de paquetes nerviosos alrededor de la arteria hepática y vena portal, principalmente vía α receptores, causa un incremento de la salida de glucosa y lactato, una disminución en la absorción de oxígeno, una disminución en la perfusión sanguínea combinada con una redistribución intrahepática y un vaciamiento de norepinefrina a la vena hepática. Los nervios hepáticos también juegan un rol a largo plazo en la inducción de enzimas y contribuyendo a la especialización de los hepatocitos **(Jungermann y Katz, 1989)**.

El hígado está rodeado casi completamente por una cápsula serosa (peritoneo visceral). Bajo esta membrana serosa se encuentra una cápsula fibrosa (cápsula de Glisson) que está compuesta de tejido conectivo denso fibroso blanco (DWFCT). El tejido conectivo de la cápsula se extiende en los lóbulos del hígado, como tejido conectivo interlobular, envolviendo individualmente a cada lóbulo hepático, sirviendo de sostén al estroma **(Banks, 1980)**. Extensas áreas de tejido conectivo interlobular aparecen a lo largo de cualquier sección de hígado, estas soportan, vasos linfáticos, ramas de la arteria hepática, ramas de la vena porta y conductos biliares. Estos grupos de vasos y ductos, junto con el respectivo soporte de tejido conectivo son llamados canales o áreas portales **(Frappier, 1998)**.

El "clásico lóbulo" hepático se describe como una estructura poligonal de parénquima rodeando la vena hepática central, esta típica forma está limitada por tejido conectivo, con zonas portales en las esquinas de los polígonos. Este modelo fue aceptado por más que un siglo, aunque esta estructura lobular guarda gran importancia en las descripciones morfológicas de condiciones patológicas, no puede explicar varias alteraciones funcionales e histológicas, indicando que la unidad funcional y anatómica del hígado es el acino hepático, modelo más útil que fue propuesto a principio de este siglo, el cuál fue deducido de la observación de que en muchas glándulas la unidad estructural se orienta alrededor de un conducto excretor central. Este modelo postula que la corriente sanguínea

fluye linealmente dentro de una estructura parenquimatosa, que exhibe una disminución radial de concentraciones de sustrato y de hormonas alrededor del eje vascular de los vasos aferentes **(Rappaport, 1976; Jungermann y Katz, 1989; Tennant, 1997)**.

Los hepatocitos son el principal tipo celular del hígado y en conjunto ocupan al menos el 70% de su volumen. Como todas las células de origen epitelial, el hepatocito es funcionalmente polarizado y la membrana plasmática contiene tres dominios o regiones morfológica y funcionalmente separados. El dominio o región sinusoidal es equivalente a la región basolateral de otras células epiteliales. El contacto entre hepatocito está dado por la región intercelular que contiene desmosomas y gap junctions. La región canalicular es responsable de muchas de las funciones de excreción del hígado y de la fase inicial de la formación de bilis. Los hepatocitos están dispuestos en láminas de una sola célula separados por sinusoides. Estos sinusoides hepáticos difieren de otros capilares en dos importantes aspectos, primero, los hepatocitos normalmente no descansan sobre una membrana basal convencional, están separados de las células endoteliales por el espacio perisinusoidal de Disse. Segundo, las fenestraciones en las células de revestimiento sinusoidal permiten la formación de linfa hepática en el espacio de Disse que tiene un contenido proteico mucho mayor que la linfa formada en lechos capilares convencionales, el cual es un ultrafiltrado de plasma caracterizado por su bajo contenido proteico **(Tennant, 1997)**.

Una significativa heterogeneidad estructural se ha demostrado entre los hepatocitos periportales del acino hepático (Zona 1, aferente o proximal), los hepatocitos de la zona media (Zona 2) y los hepatocitos perivenosos o centrolobulillares (Zona 3, pericentral, eferente o distal). Siguiendo la circulación sanguínea son distinguibles al menos dos zonas, la zona periportal perfundida con sangre rica en oxígeno, sustratos y hormonas, y la zona perivenosa irrigada con sangre baja en oxígeno, sustratos y hormonas, pero rica en dióxido de carbono (CO₂) y otros productos del metabolismo **(Jungermann y Katz, 1989)**. Es predecible que existan diferencias en la concentración de solutos entre los hepatocitos localizados en la entrada (zona 1) y en la salida (la zona 3) del acino, ya que la perfusión en este, ocurre de manera secuencial. Sin embargo, la distribución y el transporte de solutos por los hepatocitos de cada zona acinar también parecen estar influenciados por otros factores aparte de la perfusión secuencial de sangre. La concentración de receptores en hepatocitos en cada zona, la presencia de grupos químicos específicos en las moléculas entrantes y el ligamiento

de solutos a proteínas plasmáticas, son todos factores con los cuáles se modifica esta interacción y la concentración celular lograda de solutos en cada zona acinar (**Gumucio, 1983**). Las concentraciones de glucosa y aminoácidos, que vienen principalmente desde la vena hepática portal, son más altas en sinusoides periportales durante la digestión, lo que estaría asociado con importantes diferencias metabólicas, ya que las enzimas de la glicólisis y gluconeogénesis tienen diferente actividad entre las distintas zonas del acino hepático (**Tennant, 1997**).

También existen diferencias en las fenestraciones del endotelio sinusoidal entre las zonas periportales y centrolobulillares, ha sido demostrado mediante microscopía electrónica (SEM, scanning electron microscopy) que el diámetro es inversamente proporcional a la frecuencia de fenestraciones entre estas dos zonas, lo que puede explicar la conducción selectiva de grandes complejos moleculares como los quilomicrones encontrados en hepatocitos periportales (**Braet y Wisse, 2002**).

El hígado tiene un papel crítico en una amplia variedad de funciones en el organismo. La mayoría de los nutrientes absorbidos desde el tracto gastrointestinal pasan directamente al hígado vía circulación portal, éstos son metabolizados a energía, transformados en otra clase de nutrientes y exportados a tejidos periféricos, o bien almacenados en éste. El hígado es capaz de ajustar la carga de carbohidratos, proteína y lípidos desde el tracto gastrointestinal, mantener niveles sanguíneos constantes de nutrientes entre ingestas, así como en respuesta a necesidades especiales. Además de este rol en la homeostasis y metabolismo de nutrientes, el hígado está envuelto en la excreción, detoxificación y metabolismo de sustancias tanto endógenas como exógenas; así como en la hematopoyesis y la síntesis de proteínas (**Barton y Morris, 1998**).

En el hígado son expresados dos transportadores de membrana de glucosa. GLUT-2 es el transportador de glucosa primario y parece estar expresado en la membrana plasmática de todos los hepatocitos. La K_m (Michaelis constant) de GLUT-2 para glucosa es 15 a 20 mM, una concentración de glucosa que puede ser alcanzada o excedida en la vena portal hepática durante y después de la ingesta. Por consiguiente, la velocidad de entrada de glucosa en estos tejidos es proporcional a los niveles de glucosa sanguínea. La elevada K_m de GLUT 2 asegura también que la glucosa entre rápidamente en las células hepáticas sólo cuando es abundante. Si el nivel de glucosa sanguínea fuese

exiguo, la glucosa entraría preferentemente en el cerebro y otros tejidos porque sus sistemas de transporte tienen una K_m menor que la del hígado. Bajo estas condiciones, la glucosa es transportada dentro de los hepatocitos para la síntesis de glicógeno, aminoácidos y triglicéridos. Entre comidas, la concentración de glucosa decrece en la vena porta a niveles de la circulación periférica aproximadamente a 5 mM. Durante este período, la concentración de glucosa en los hepatocitos es relativamente mayor a la sangre sinusoidal y GLUT-2, facilita el transporte de glucosa desde el citoplasma de los hepatocitos a los sinusoides y por último a la circulación sistémica para suplir los requerimientos energéticos de otros tejidos. A su vez, el transportador GLUT-1 está presente sólo en la membrana plasmática de los hepatocitos más centrales y su afinidad por glucosa es mucho mayor (K_m 1-2 mM) que la de GLUT-2. Curiosamente, el gen para GLUT-1 es transcrito y trasladado por hepatocitos a través del acino, sin embargo, por medio de mecanismos de control post-transcripcional, este es insertado en la membrana plasmática de sólo los hepatocitos centrales **(Tennant, 1997)**.

Otra función importante del hígado es la producción de bilis, que está constituida principalmente por ácidos biliares conjugados, fosfolípidos, colesterol y bilirrubina conjugada. Los ácidos biliares son agentes fisiológicos importantes requeridos para la disponibilidad del colesterol, así como para la absorción de vitaminas y grasas. Son sintetizados, conjugados y excretados exclusivamente por el hígado, las zonas 1 y 2 del acino hepático serían el sitio primario de la síntesis de estas sales y su conversión desde colesterol requiere 15 diversos pasos enzimáticos **(Chiang, 1998)**. La bilirrubina es un pigmento que se produce por degradación enzimática del grupo Hem, aproximadamente un 80% deriva de la remoción de eritrocitos en etapa de envejecimiento desde la circulación por el sistema retículo endotelial **(Jungermann y Katz, 1989)**. La bilirrubina no conjugada, insoluble, se liga a albúmina y es transportada hacia hígado, donde se conjuga en los hepatocitos. En los caballos más del 50% de la bilirrubina es conjugada con glucosa. Luego se excreta en forma activa hacia los conductos biliares **(Johnston, 1998)**.

El hígado es el sitio exclusivo de síntesis de albúmina, la más abundante proteína plasmática. Su degradación se realiza principal pero no exclusivamente en hígado, se degrada también en sitios como músculo, riñón y piel. La degradación en hígado de la albúmina se ve favorecida por las

fenestraciones del endotelio de las células que permiten pasar casi todas las proteínas plasmáticas directamente al espacio de Disse y a la superficie sinusoidal de los hepatocitos. En la circulación general, la albúmina tiene dos grandes funciones, es el principal determinante de la presión oncótica del plasma y es la principal proteína transportadora para metabolitos endógenos hidrofóbicos y xenobióticos, sustancias que al ligarse a la albúmina quedan en una solución acuosa estable en el plasma (**Tennant, 1997**).

El hígado juega un rol crítico en la remoción de amoníaco desde la sangre, éste se produce primariamente en el tracto gastrointestinal por acción de las bacterias colónicas y las enzimas mucosas sobre las proteínas. Luego es llevado a hígado, vía portal, para su conversión a urea. (**Johnston, 1998**). La mayoría del amoníaco entra al hígado por difusión, principalmente a los hepatocitos de las zonas 1 y 2, sólo pequeñas cantidades de amoníaco alcanzan la zona 3, por ende la concentración de amoníaco en los sinusoides periportales es mayor en comparación con los sinusoides centrolobulillares. Dentro del acino hepático están involucrados dos procesos enzimáticos complementarios, la síntesis de amoníaco a urea en hepatocitos periportales y de amoníaco a glutamina en hepatocitos centrolobulillares (**Tennant, 1997**).

Aproximadamente el 40 a 60% del Cobre (Cu) dietario es absorbido a la sangre por la mucosa del intestino delgado. La albúmina y transcupreína transportan el Cu en sangre hasta el hígado, el cuál es el sitio de síntesis de ceruloplasmina, estas proteínas transportan el cobre a tejidos blanco en el organismo. El cobre sobrante se elimina por la vía biliar a través de una proteína transmembrana, la ATPasa tipo-P transportadora de cobre (ATPasa7B), localizada en el polo biliar del hepatocito (**Nagano et al., 1998**).

Las enzimas para la metabolización de drogas (tóxicos) tales como la citocromo P450 están localizadas principalmente en la zona 2 y 3 del acino hepático. Esto podría explicar por que los tóxicos inducen daño hepatocelular preferentemente en hepatocitos perivenosos (**Jungermann y Katz, 1989**). Comparado con los adultos, los caballos jóvenes tienen menos habilidad para metabolizar hidrocarburos aromáticos y menos capacidad conjugativa, que puede generar alto riesgo cuando la exposición a toxinas requiere metabolización por estos sistemas enzimáticos (**Lakritz et al., 2000**).

Los lipopolisacáridos bacterianos endógenos (LPS) son glicolípidos encontrados en abundancia en la membrana externa de todas las bacterias Gram (-) y tienen la habilidad de producir una vigorosa respuesta inflamatoria **(Ouellette et al., 2004)**. Dado que las bacterias Gram (-) normalmente colonizan el colon, el cuerpo ha desarrollado fuertes mecanismos de defensa que regulan estrechamente la entrada y procesamiento de los LPS. El hígado juega un rol central en este proceso en virtud de su habilidad dual de no sólo limpiar los LPS, sino también de responder energéticamente a los LPS. La gran mayoría de los LPS que entran al huésped en condiciones normales y patológicas es a través del tracto gastrointestinal, el hígado se encuentra estratégicamente localizado, siendo la barrera final para prevenir que bacterias gastrointestinales y sus productos, entren al flujo sanguíneo sistémico. En estudios experimentales en animales sanos, los LPS son sacados de circulación dentro de pocos minutos después de una inyección intravenosa y la mayoría es encontrado en hígado **(Su, 2002)**.

Las células de Küpffer componen aproximadamente el 70% del total de la población de macrófagos del organismo, se presume que son la primera barrera contra una bacteremia o endotoxemia portal, impiden que bacterias y endotoxinas entren a la circulación sistémica removiéndolas desde la sangre venosa portal. Una vez activadas, las células de Küpffer producen citoquinas, las cuáles pueden regular la función de hepatocitos y células endoteliales vía interacción paracrina o pueden ser liberadas a la circulación sistémica. Por otro lado, las células de Küpffer son potentes limpiadores de mediadores inflamatorios sistémicos y derivados del sistema gastrointestinal, sustancias tóxicas y citoquinas, de esta manera, juegan un rol crucial en la extensión o limitación de la respuesta inflamatoria sistémica **(Dhainaut et al., 2001)**.

Debido a su compromiso en muchos procesos metabólicos, el hígado está sujeto a la lesión de numerosas infecciones y alteraciones metabólicas y tóxicas **(Jhonston, 1998)**. En herbívoros la principal causa de hepatitis crónica y cirrosis parece ser la ingestión de micotoxinas, particularmente aflatoxinas, y plantas tóxicas, particularmente alcaloides de pirrolizidina de plantas como *Senecio sp.*, *Crotalaria sp.* y *Heliotropum sp.* **(van den Ingh, 2004)**.

La exposición a estas toxinas puede ocurrir directamente por la ingestión en el campo de plantas, o por el consumo de heno contaminado. Estudios recientes demuestran que los caballos necesitan

consumir más de 200 mg. de alcaloide por kilo de peso corporal antes de que se induzca una enfermedad hepática grave, por lo general mortal **(Rose y Hodgson, 1995)**.

Los problemas surgen principalmente cuando el forraje, cubos, pellets o granos están contaminados y el animal es incapaz de seleccionar y evitar la ingestión de estas plantas. En California, *Senecio vulgaris* es un contaminante común de heno de alfalfa de primer corte, mientras que *Amsinckea intermedia* es más frecuente encontrarla en henos de pasto (grass hays) tales como heno de avena cortado en primavera **(Smith, 1983)**. En Chile se ha descrito alrededor de 300 especies de *Senecio sp.*, pero sólo *Senecio erraticus* a sido reportado como tóxico para bovinos, caballos y ovinos **(Araya, 1990)**. La ingestión de grandes cantidades de forraje altamente contaminado puede presentar signología clínica dentro de unas semanas, aunque la exposición a niveles bajos de consumo es más frecuente y debe pasar un período de varios meses para que los signos clínicos de enfermedad hepática crónica aparezcan **(Smith, 1983)**. En caballos traídos al Hospital Veterinario de la Universidad Austral de Chile, en los que se diagnosticó seneciosis, correspondían según anamnesis, a animales que habían permanecido consumiendo la planta por varios años consecutivos **(Araya, 1990)**.

La endotoxemia o los lipopolisacáridos bacterianos endógenos (LPS) por sí mismos no son hepatotóxicos en bajas concentraciones, sin embargo, su habilidad para estimular una respuesta inflamatoria puede ser responsable de su patogenicidad en hígado, este último responde a los LPS con producción de citoquinas e intermediarios reactivos de oxígeno (radicales superóxido, radicales hidroxilos, peróxido de hidrógeno) **(Su, 2002)**. Las endotoxinas asociadas a shock reducen la perfusión de la mucosa intestinal, llevando a disfunción y pérdida de la barrera intestinal funcional, contribuyendo a la inflamación sistémica, anormalidades cardiovasculares y falla orgánica. La exposición a LPS resulta en múltiples efectos fisiopatológicos, involucrando una liberación sistémica de mediadores inflamatorios y coagulación incontrolada en equinos **(Ouellette et al., 2004)**. En estudios in vivo e in vitro se ha demostrado que factor de necrosis tumoral α (TNF α) e interleuquina 1 (IL1) son liberados en respuesta a los LPS, primariamente por las células de Küpffer **(Su, 2002)**.

Otro tipo de intoxicación estaría dado por la acumulación de cobre en hígado, pero parece poco probable que los niveles dietarios recomendados de 25 - 50 mg/kg tengan efectos deletéreos (**Harris et al., 1995**), ya que, los caballos tienen alta resistencia a la toxicidad crónica por cobre y pueden tolerar niveles hasta 800 mg/kg (**Cromwell, 1997; Harris et al., 1995**). Por el contrario, un bloqueo de los ductos biliares, con la consiguiente falla en la eliminación de cobre hacia la vía biliar, provocaría un acúmulo de este metal en el interior de los hepatocitos donde se liga a la metalotionina (MT1A es una pequeña proteína intracelular capaz de quelar varios metales pesados, incluyendo cobre) (**Spee et al., 2005**). El Cu sufre una degradación incompleta dentro del lisosoma, formando un polímero insoluble y rico en Cu activado. Este compuesto desencadena una peroxidación lipídica lisosomal que conduce a la necrosis celular, la fagocitosis de este cobre reactivo por células de Küpffer amplifica el daño hepático (**Klein et al., 1998**). Se induce también un descenso en la síntesis de la apoceruloplasmina (molécula precursora de la ceruloplasmina). El cobre finalmente se libera hacia la sangre una vez desbordada la capacidad del hígado (**Spee et al., 2005**).

La insuficiencia hepática crónica también puede resultar de colangitis, abscesos hepáticos u obstrucciones biliares (**Rose y Hodgson, 1995**). Tanto colangiohepatitis, como colelitiasis primarias son infrecuentes causas de enfermedad hepática y obstrucción biliar en equinos (**Peek y Divers, 2000**).

La hepatitis crónica y cirrosis se refieren a una lesión primaria del parenquimal hepático con muerte hepatocelular, fibrosis e inflamación. Sin embargo, inflamación y fibrosis y en algunos casos muerte celular no son restrictivos de desórdenes parenquimatosos primarios, ya que también pueden ser vistos en desórdenes primarios biliares y circulatorios. La diferenciación en general es posible a través de un cuidadoso examen histológico y la evaluación en conjunto de lesiones del parénquima, biliares y vasculares presentes en el hígado afectado (**van den Ingh, 2004**).

La hepatitis crónica se caracteriza por necrosis o apoptosis hepatocelular, un infiltrado inflamatorio mononuclear o mixto, regeneración y fibrosis. La proporción y distribución de estos componentes varían ampliamente y es necesario incluir en el diagnóstico la actividad y estado de la enfermedad así como la posible etiología. La actividad de la enfermedad es determinada por la cantidad de inflamación y extensión de la apoptosis y necrosis hepatocelular la cuál puede estar presente como un

patrón focal o difuso en el interior del lóbulo. La fase de la enfermedad y así el posible pronóstico, está determinado por la extensión y patrón de la fibrosis y la posible pérdida de arquitectura (**van den Ingh, 2004**).

La fuente principal de ese tejido fibroso son las células estrelladas hepáticas (HCSs), que en condiciones fisiológicas, se encuentran en el espacio de Disse, donde son mantenidas inactivas (fenotipo no-fibrogénico), encargadas principalmente del almacenamiento de retinoides y la remodelación de la matriz extracelular, que ocurre predominantemente como una consecuencia de la acción de una familia de enzimas llamadas metaloproteinasas (MMPs), éstas son secretadas dentro del espacio extracelular como proenzimas, las cuáles luego son activadas por mecanismos de clivaje específicos. Las enzimas activas son alternadamente inhibidas por una familia de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs 1 al 4). Por esta combinación de mecanismos, la degradación de matriz extracelular es estrechamente regulada, lo cuál previene un daño tisular involuntario (**Arthur, 2000**).

La fibrosis se puede presentar como necrosis de hepatocitos en áreas que unen espacios porta entre sí (porto-portal), espacios porta con venas centrolobulillares (porto-central) y centro-central (venas centrolobulillares entre sí), acompañada de colapso y condensación de la red reticular o por directa activación de las HSCs (**van den Ingh, 2004**). Estudios del rol de las HSCs en este proceso y un más detallado conocimiento de su biología celular llevan a importantes preguntas acerca de la validez del modelo de “sólo progresión” de la fibrosis, ya que actuales evidencias indican que es dinámica y que puede ser bidireccional (involucrando fases de progresión y regresión) y que además de incrementar la síntesis de colágeno, este proceso patológico involucra grandes cambios en la regulación de la degradación de la matriz (**Arthur, 2000**). Cuando se remueve el ambiente habitual del espacio de Disse, en sitios lesionados del hígado, por exposición a toxinas hepáticas, colestasis, infección viral o invasión tumoral, las HCSs abandonan su función habitual y comienzan a proliferar, son activadas a un fenotipo profibrinogénico miofibroblástico, de esta manera se convierten en las principales productoras de colágeno tipo I y tipo III y de proteínas no colágenas de la matriz extracelular (**Ramm et al., 2000**). La producción y depósito perisinusoidal de todas esas proteínas se lleva a cabo en forma descontrolada, debido a la disminución de la capacidad de HCSs para producir metaloproteinasas que degraden el colágeno (**van den Ingh, 2004**).

La fibrosis es una respuesta común y no específica a una injuria hepática y aunque asociada generalmente a hepatopatías crónicas, esta puede ser detectada 7 días después de una toxicosis aguda por pirrolizidina en caballos (**Durham *et al.*, 2003a**). Es vista tradicionalmente como un proceso patológico progresivo involucrando múltiples eventos celulares y moleculares que conducen en última instancia al excesivo depósito de proteínas en la matriz extracelular. Cuando este proceso es combinado con una inefectiva regeneración y reparación, existe una gran alteración de la arquitectura normal y el resultado final es la cirrosis (**Arthur, 2000**).

Aunque existen múltiples causas y morfologías de cirrosis hepáticas, todas las formas de cirrosis son caracterizadas por una defenestración del endotelio sinusoidal y la presencia de una membrana basal subendotelial. Además, se ha demostrado que la desaparición de la barrera normal de filtración en hígados cirróticos da lugar a un intercambio bidireccional deteriorado entre la sangre sinusoidal y las células parenquimales. Antes del establecimiento de la fibrosis, la defenestración parece ser reversible al remover la hepatotoxina, pero se vuelve irreversible después de la formación de la membrana basal subendotelial (**Braet y Wisse, 2002**).

En cirrosis se pueden distinguir dos categorías morfológicas, cirrosis micronodular, con nódulos regulares de menos de 3 mm (el tamaño de un lóbulo normal) y cirrosis macronodular con nódulos irregulares mayores a 3 mm (sobre varios centímetros). Mientras la forma micronodular desarrolla alteraciones difusas regulares y fibrosis del acino, la cirrosis macronodular desarrolla grandes áreas irregulares de necrosis con colapso secundario y el desarrollo de conexiones vasculares porto-centrales (**van den Ingh, 2004**).

El hígado es un órgano que parece estar dotado con una notable habilidad compensatoria y regenerativa. Desafortunadamente, estas capacidades compensatorias pueden retrasar la presencia clínica de la enfermedad hepática hasta que el proverbial “demasiado tarde” se haga realidad, con el inicio de signos clínicos más profundos. Aunque incluso los casos severos del coma hepático pueden recuperarse, muchos no, debido a los avanzados cambios del hígado, que van más allá de las capacidades regeneradoras del órgano (**Byars, 2003**). El hígado tiene tal capacidad de reserva funcional que puede presentar aproximadamente tres cuartas partes de su parénquima inactivo antes de presentar signos clínicos de disfunción (**Blood y Radostits, 1992; Rose y Hodgson, 1995**).

Los signos clínicos y los hallazgos clinicopatológicos asociados con la insuficiencia hepática se refieren a la incapacidad del órgano para realizar sus múltiples funciones. Sin considerar la causa y tiempo de evolución de la enfermedad hepática, a menudo los signos clínicos de la insuficiencia se desarrollan en forma súbita, dificultando el establecimiento de la relación con una causa posible **(Johnston, 1998)**. La severidad de los signos clínicos y el curso de la enfermedad hepática son variables dependiendo del patrón, localización, tasa y extensión del daño hepático, el que puede ser reversible o irreversible, siendo afectado por procesos focales, generalizados, agudos, crónicos, inflamatorios, anatómicos o funcionales **(Barton y Morris, 1998)**.

La ictericia ocurre como resultado del acúmulo de bilirrubina en el plasma y otros tejidos. La coloración ictericia de las membranas mucosas y de la esclerótica se evidencia cuando la concentración sérica de bilirrubina excede los 3 mg/dl y es marcada cuando las concentraciones superan los 12 mg/dl **(Johnston, 1998)**. Su presentación es casi siempre marcadamente elevada en enfermedad hepática aguda pero, en general, es sólo ligeramente elevada o ausente en enfermedades crónicas hepáticas **(Smith, 1983)**.

La fotosensibilización se desarrolla en alrededor del 25% de los caballos en áreas no pigmentadas que están expuestas a la luz solar **(Smith, 1983)**. La filoeitrina, una porfirina derivada de la clorofila, es producida por las bacterias intestinales y excretada principalmente en las heces. De manera normal, la porción de la filoeitrina que se absorbe hacia la circulación portal es eliminada con efectividad por el hígado y luego excretada con la bilis. En la insuficiencia hepática, la filoeitrina pasa a circulación sistémica y se acumula en la piel, donde absorbe la energía radiante del sol, produciendo radicales libres, causando inflamación y necrosis de la piel despigmentada. El sitio afectado con mayor frecuencia es el hocico, aunque se puede afectar cualquier zona cutánea del cuerpo **(Johnston, 1998)**.

Como el hígado es el sitio donde se sintetizan la mayoría de las proteínas de la cascada de la coagulación, una hemostasis anormal puede ser consecuencia de una insuficiencia hepática. Los signos clínicos pueden variar desde petequias o equimosis, hemorragia posterior a un trauma o venipuntura, hasta hemorragia espontánea como epistaxis, melena, hemoptisis, hematuria o hematomas **(Mammen, 1992; Barton y Morris, 1998; Johnston, 1998)**. El defecto hemostático primario es un tiempo de protrombina (TP) prolongado, pero otros análisis tales como, fibrinógeno

(Fb), tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) y función plaquetaria, también pueden presentar anomalías (**Dodds, 1993; Tennant, 1997**). Los pacientes con cirrosis hepática tienen un amplio espectro de anomalías, todos los factores procoagulantes e inhibidores están disminuidos, lo que refleja el deterioro de la síntesis de proteínas. Pueden ser identificadas moléculas anormales de fibrinógeno y protrombina, así como las plaquetas, tanto cuantitativamente como cualitativamente y la mayoría de los pacientes desarrolla coagulación intravascular diseminada (DIC) (**Mammen, 1992**).

Debido a la importancia de la función hepática en el mantenimiento de la glicemia, la insuficiencia hepática puede producir una profunda hipoglicemia que puede contribuir con la encefalopatía hepática. Las funciones neurológicas pueden variar desde depresión, somnolencia, temblores musculares, ataxia y caminatas en círculos compulsivos o sin rumbo. Puede observarse una demencia de grado importante, actitudes como presionar la cabeza contra objetos y arrojar patadas violentas. En ocasiones estos signos pueden ser confundidos con un cólico (**Johnston, 1998**).

La causa de la encefalopatía no está clara, pero puede ser resultado de concentraciones de glucosa sanguínea muy bajas, elevación de los valores de amoníaco sanguíneo o alteraciones en las proporciones de aminoácidos en el sistema nervioso central. Este desbalance puede provocar una falla en la homeostasis de los neurotransmisores o de la producción de falsos neurotransmisores (**Rose y Hodgson, 1995**). Si el amoníaco no se metaboliza por completo ingresa a la circulación sistémica. El mecanismo por el cual el amoníaco ejerce su neurotoxicidad no se conoce con certeza, pero la reacción de distribución del amoníaco libre, la fracción más tóxica, dependen del pH sanguíneo y de la concentración de potasio. Aunque en los caballos con insuficiencia hepática es frecuente que se produzca un incremento en el nivel de amoníaco sanguíneo, la gravedad de los signos clínicos no siempre se correlaciona con dichas concentraciones. En humanos, los altos niveles de amoníaco sanguíneo estimulan la producción de glucagón en las personas que padecen insuficiencia hepática. Esto lleva a un incremento de la gluconeogénesis hepática a partir de aminoácidos. Para mantener la glicemia normal se inicia la secreción de insulina; esto estimula la captación y el metabolismo de aminoácidos de cadena ramificada por parte de los músculos. La disminución de la relación entre aminoácidos de cadena ramificada y aminoácidos aromáticos en el

plasma desde un valor normal de $\leq 1,5-4:1$ puede provocar una disfunción neurológica grave. Los aminoácidos aromáticos no se metabolizan con facilidad en el hígado enfermo y se acumulan e interfieren con la neurotransmisión normal **(Johnston, 1998)**.

El rol primario del hígado en la remoción de LPS puede ser demostrado en pacientes con falla hepática. La endotoxemia es frecuente en pacientes con cirrosis y el grado de endotoxemia está correlacionado con el grado de falla hepática **(Su, 2002)**. La signología de endotoxemia en equinos se resume en un nuevo concepto o condición clínica, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), ya que las respuestas patobiológicas tales como, severa disminución en el número de plaquetas, hipoglicemia, acidosis metabólica, desórdenes en la hemostasis acompañados de cianosis en las mucosas visibles, oliguria acompañada de proteinuria y función gastrointestinal anormal, pueden ser manifestaciones de coagulación intravascular diseminada (DIC) hasta síndrome de disfunción multiorgánico (MODS), por lo tanto la respuesta clinicopatológica de equinos a los LPS indica que la naturaleza del SIRS está dada por la progresiva hipercitoquinemia que desencadena en un shock séptico **(Oikawa y Yamaoka, 2003)**.

La temperatura, pulso y frecuencia respiratoria son usualmente normales en equinos, sin embargo, en estados terminales de falla hepática, pueden estar elevados. Anorexia y pérdida de peso está usualmente presente pero puede ser notada simplemente como disminución de la ingesta más que emaciación **(Smith, 1983)**. También se puede evidenciar dolor abdominal debido al rápido incremento del tamaño de hígado **(Johnston, 1998)**.

La insuficiencia hepática en el caballo usualmente deriva en signos reconocibles los que pueden llevar a un diagnóstico clínico de insuficiencia hepática, sin embargo, frecuentemente persiste una adecuada función hepática a pesar de la presencia de un grado medio o moderado de enfermedad hepática llevando a una hepatopatía subclínica, el diagnóstico por tanto de esto si requiere más procedimientos diagnósticos **(Durham et al., 2003b)**.

El diagnóstico a menudo se basa en la anamnesis, examen clínico y análisis bioquímicos, constituyendo así la trilogía en la cual debe apoyarse el Médico Veterinario para elaborar el

diagnóstico, efectuar un correcto pronóstico, evolución y respuesta al tratamiento del paciente **(Coppo y Mussart, 2000)**.

Nuestra profesión en la actualidad tiene ventajas comparativas de ayuda diagnóstica en la determinación de enfermedad hepática. Mas allá de los análisis químicos de rutina, los exámenes especializados son cada vez más accesibles, aun así la enfermedad hepática en caballos continua siendo un difícil desafío clínico en la práctica equina **(Byars, 2003)**.

Varios análisis clinicopatológicos derivados de exámenes de sangre han sido útiles en el establecimiento de diagnosis y prognosis de hepatopatías en caballos, sin embargo, los resultados de las pruebas clinicopatológicas no siempre correlacionan con el grado de enfermedad hepática o el desenlace del caso **(Durham *et al.*, 2003b)**.

Las pruebas de laboratorio pueden ser divididas en dos grandes categorías, enzimas séricas derivadas de hígado y pruebas de funcionalidad hepática **(Smith, 1983)**. La actividad enzimática hepática sérica proporciona una medida del daño hepatocelular activo. La medición de los niveles circulantes de productos que normalmente se producen y excretan por el hígado y la determinación del tiempo de depuración de determinadas sustancias brindan información valiosa respecto de los cambios en la capacidad funcional **(Johnston, 1998)**.

Las alteraciones más comunes en los valores de la bioquímica sérica incluyen la elevación de enzimas como transaminasa oxalacética (AST), gama-glutamil transferasa (GGT), sorbitol dehidrogenasa (SDH), fosfatasa alcalina (FA), lactato dehidrogenasa (LDH), útiles sólo en una hepatopatía aguda ya que en una enfermedad hepática crónica suelen estar en niveles normales debido a que no existe un daño activo, pero la funcionalidad hepática si se encuentra alterada **(Rose y Hodgson, 1995; Durham *et al.*, 2003b)**.

La actividad de FA no es específica de hepatopatía, sin embargo, los aumentos persistentes en la actividad sérica de esta enzima ocurren con mayor frecuencia en la enfermedad hepática crónica que involucra una obstrucción biliar **(Johnston, 1998)**.

Los caballos presentan niveles mayores de bilirrubina sérica no conjugada que otras especies. Por tanto, el plasma equino normal tiene un índice icterico más alto. Un 10 al 15% de caballos normales pueden presentar una coloración amarillenta en las membranas mucosas y esclerótica, limitando el valor diagnóstico clínico en las ictericias importantes. El incremento de la concentración de bilirrubina suele preceder a la ictericia clínicamente detectable. Como la bilirrubina conjugada tiene más afinidad por el tejido conectivo que la forma no conjugada, es de esperar un grado de ictericia importante en enfermedades hepáticas colestásicas, así como, cuando el metabolismo energético de los hepatocitos es interrumpido, en ambos casos, se limita la excreción de bilirrubina conjugada hacia bilis y aumenta su concentración plasmática. Por otro lado, cualquier situación que provoque una disminución en la ingesta de comida, produce un aumento en la concentración plasmática de bilirrubina no conjugada. La hiperbilirrubinemia asociada con insuficiencia hepática aguda alcanza concentraciones superiores a 10 mg/dl. Es de esperar un mayor aumento no proporcional de la fracción no conjugada, pero la concentración de la forma conjugada puede aumentar debido a una obstrucción intrahepática. La bilirrubina total aumenta en la hepatopatía aguda por la disminución de su captación, conjugación, excreción y el aumento de la producción del grupo hem debido a una mayor destrucción eritrocitaria. Los caballos que padecen insuficiencia hepática crónica presentan una elevada concentración de bilirrubina total, sin embargo, los aumentos son variables y a menudo menores que en una enfermedad aguda. Aun cuando en una enfermedad hepática crónica no aumente la bilirrubina total, la relación entre la fracción conjugada y ésta, se encuentra notablemente aumentada, cambio que es importante desde el punto de vista diagnóstico (**Johnston, 1998**). Bilirrubinuria también ha sido observada en la mayoría de los caballos con enfermedad hepática y confiere un color verde-café a la orina (**Smith, 1983**).

Como los ácidos biliares se absorben con eficiencia y recirculan a través del hígado 38 veces al día, son indicadores sensibles de enfermedad hepática en el caballo. La concentración normal de ácidos biliares es menor de 15 $\mu\text{mol/L}$, cuando excede este valor puede indicar enfermedad hepática. Al parecer éstos serían más útiles en el diagnóstico de enfermedades crónicas, ya que durante la fase aguda puede permanecer funcional la suficiente cantidad de parénquima que permita la reexcreción del ácido (**Johnston, 1998**). El estado alimenticio del equino (referido a la presencia o ausencia de alimento) afecta las concentraciones séricas de ácidos biliares, ya que en ayuno los niveles de ácidos

biliares son significativamente menores a los observados en condiciones de post ingesta de alimento, ya que durante la noche la recaptación hepática disminuye siendo mínima por la mañana, aumentando proporcionalmente al incremento de alimento en el lumen intestinal, hasta sobrepasar la capacidad de captación hepática lo que se refleja en el aumento de las concentraciones de ácidos biliares en sangre periférica (**Rudolph et al., 1998**). No se observa diferencia significativa por efecto de la edad y el sexo en equinos, tampoco los distintos aportes de materia grasa en las dietas, influirían en las concentraciones séricas de ácidos biliares (**Rios et al., 2002**), lo que se explica por que la ausencia de vesícula biliar obligaría a los ácidos biliares a estar continuamente ciclando por la circulación portal, no siendo afectados por el tipo de dieta (**Hoffman et al., 1987**). Debido a lo anterior, se sugiere tener en consideración el momento de la toma de muestra cuando se utilicen los ácidos biliares como metodología diagnóstica para alteraciones hepáticas (**Rios et al., 2002**).

Aunque el amoniaco es de importancia patológica en el desarrollo de la encefalopatía hepática, su determinación es difícil. El manejo de la muestra es crucial y las concentraciones normales varían mucho. Por estas razones en los equinos no se evalúan los niveles séricos en forma rutinaria. Las pruebas de tolerancia al amoniaco se utilizan en otras especies para evaluar la función hepática, pero en la práctica de la medicina equina tienen un valor limitado y requieren de más investigaciones. La urea es un producto del metabolismo hepático del amoniaco, en consecuencia, cuando el metabolismo del amoniaco está impedido, la concentración del nitrógeno ureico sanguíneo (NUS) puede disminuir (**Johnston, 1998**). Niveles de NUS bajo 9 mg/dl son claramente un signo consistente en caballos con enfermedad hepática crónica severa, así como en caballos con falla hepática crónica agudizada (**Smith, 1983**).

La mayoría de los caballos con enfermedad hepática tienen una glicemia normal, sin embargo, si la función hepática está perjudicada en grado suficiente, es factible observar hipoglicemia importante. A menudo, concentraciones inferiores a 20 mg/dl están acompañadas por signos de encefalopatía que se controlan ante la administración endovenosa (EV) de 50 a 100 g de glucosa (**Johnston, 1998**).

Aunque el hígado es responsable de la producción de proteínas, hipoalbuminemia e hipoproteinemia no son una característica común en caballos con enfermedades hepáticas severas (**Parraga et al., 1995**).

Por ende, en contraposición con otras especies, edema y ascitis rara vez ocurren en caballos con enfermedad hepática crónica **(Smith, 1983; Johnston, 1998)**.

La hipoalbuminemia puede presentarse en el periodo final de una enfermedad hepática, aunque esta disminución se produce junto con un aumento de β y/o γ globulinas, manteniendo normales la concertación plasmática de proteínas totales. De esta manera es de gran importancia conocer la concentración de estos componentes dentro del valor correspondiente a las proteínas totales **(Johnston, 1998)**.

La excreción de la bromosulfoftaleína (BSF) es útil para determinar la función hepática en los caballos, en especial cuando se sospecha la presencia de una enfermedad hepática oculta y los resultados de otras pruebas llevan a confusión. El tiempo de depuración normal varía entre 2 y 3,7 minutos, tiempos mayores a 5 minutos se consideran anormales. Invariablemente, la depuración de este colorante es prolongada en los animales que presentan un grado de ictericia importante, por lo tanto esta prueba rara vez es empleada en caballos con concentraciones de bilirrubina sérica superiores a 6 mg/dl.. Como el descenso inicial de la curva de depuración es independiente de la dosis se administra 1 g, por vía EV, a caballos adultos (450 kg.). Se toman muestras de sangre heparinizadas de una vena distinta a la de la inyección y luego se muestrea cada 3 a 4 minutos durante 15 minutos posteriores a la inyección. Aunque su disponibilidad se encuentra limitada, la BSF es el colorante utilizado con mayor frecuencia para la evaluación de la función hepática. Se ha estudiado la depuración del verde de indocianina, tanto en caballos alimentados como en ayuno, pero el uso clínico de la tintura para el diagnóstico de la insuficiencia hepática no se ha publicado **(Johnston, 1998)**. Sin embargo, con el advenimiento de técnicas para medir las concentraciones de bilirrubina sérica y, más recientemente, las concentraciones de ácidos biliares séricos, la utilidad de la valoración de la excreción de BSF ha disminuido **(Rose y Hodgson, 1995)**.

Se puede obtener información diagnóstica y pronóstica al considerar la pérdida de hepatocitos, fibrosis, alteraciones de la arquitectura, regeneración y reparación, siendo la biopsia percutánea de hígado considerada como la prueba diagnóstica antemortem más sensitiva y específica en casos de sospecha de hepatopatías en equinos y humanos, sin embargo, en algunos casos ha sido demostrada

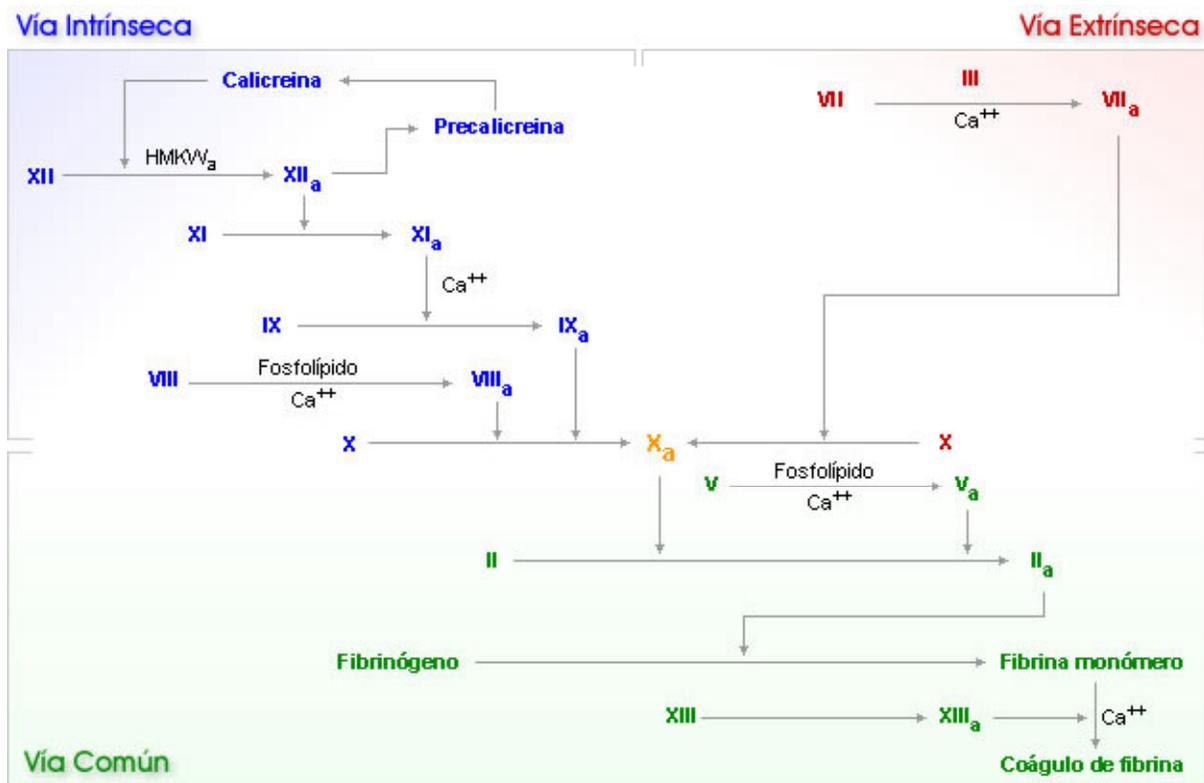
su carencia de sensibilidad, aún cuando fueron colectadas múltiples biopsias. El valor pronóstico de la biopsia hepática en el caballo no ha sido muy investigada, sin embargo, muchos autores sugieren que una marcada fibrosis periportal es un indicador de pobre pronóstico (**Durham et al., 2003a**). En los caballos con hepatopatía se produce con mayor frecuencia un compromiso hepático difuso. Por lo tanto, las lesiones observadas por medio de la biopsia hepática por lo general se correlacionan bien con las existentes en todo el órgano. En ocasiones, pueden presentarse lesiones focales; en estos casos el diagnóstico por ultrasonografía puede ser de utilidad en la detección y posterior realización de biopsias guiadas de las lesiones identificadas (**Johnston, 1998**). El abordaje se realiza a través del duodécimo a decimocuarto espacio intercostal derecho, justo ventral a la línea trazada entre la tuberosidad coxal y la punta del hombro. Se rasura un área de piel y se prepara asépticamente. Se inyecta anestésico local subcutáneamente (5ml), hacia los músculos intercostales. Se hace una pequeña incisión con bisturí, se inserta una aguja de biopsia y se dirige craneal y ventralmente. La aguja se pasa a través del diafragma y de 10 a 13 cm dentro del parénquima del hígado. Después de la recolección, las muestras se deben colocar en formalina para el subsecuente examen histopatológico. Se puede dejar que la herida de la piel cicatrice por segunda intención o bien, puede suturarse (**Rose y Hodgson, 1995**). Las muestras no sólo se remiten para el informe histopatológico sino también para realizar cultivos bacteriológicos cuando se sospecha de colangitis supurativa. Los clásicos hallazgos histológicos de enfermedad hepática crónica debido a toxicidad por alcaloide de pirrolizidina son fibrosis, hepatomegalocitosis, proliferación de conductos biliares (**Smith, 1983**). Las principales contraindicaciones para biopsia de hígado son la evidencia de coagulopatías y sospecha de abscesos en el hígado (**Rose y Hodgson, 1995; Smith, 1983**).

La imagen ultrasonográfica puede ser usada para identificar ciertas anormalidades del hígado equino, identificar un apropiado sitio para la biopsia y ayudar en la determinación del pronóstico (**Durham et al., 2003b**). Nos permite visualizar el órgano para determinar tamaño y realizar una valoración subjetiva de su textura, desplazamiento, presencia de abscedación, canalículos dilatados y disrupciones nodulares del tejido capsular y parenquimal, estas últimas son más características de la presencia de una neoplasia (**Byars, 2003**). Los transductores sectoriales de 3,3 – 3,5 MHz son los más útiles. El tamaño del hígado varía entre individuos, pero se le considera normal si se visualiza una cuña moderada de bordes netos. Con frecuencia, las venas hepática y porta pueden identificarse en el hígado normal, no así el brillo ecogénico del sistema biliar. La enfermedad biliar obstructiva

produce hepatomegalia, observándose en la ultrasonografía una cantidad de parénquima hepático superior al normal. Se presenta dilatación de los conductos biliares. En ocasiones, dentro de los conductos distendidos se ven regiones focales hiperecoicas, indicativas de colelitiasis **(Johnston, 1998)**. En enfermedades inflamatorias, como abscesos y hepatitis, se visualiza inflamación difusa que puede mostrar un parénquima hipoeicoico y los abscesos pueden aparecer como masas focales hiper o anecoicas que están bien circunscritos **(Biller, 2000)**. Considerada como una herramienta invaluable, la utilización de la ultrasonografía transcutánea, tiene ciertas restricciones y no puede emplearse en todo su potencial debido, al menos en parte, a las limitaciones inherentes al tamaño del órgano que debe ser examinado, la localización de estructuras específicas dentro de la cavidad abdominal las cuales interfieren con la evaluación ultrasonográfica, como la presencia de gas en las estructuras intestinales, los pulmones y las costillas **(Gerlach y Ferguson, 2003)**.

El examen y el tratamiento laparoscópico en equinos han alcanzado considerable aceptación en años recientes. A pesar de haber hecho muchos avances en los usos rutinarios de esta modalidad, aún quedan muchas preguntas sin responder como resultado de las limitaciones anatómicas inherentes a la especie. Basado en las restricciones descritas anteriormente, para laparoscopia y ultrasonografía, es lógico considerar la posibilidad de combinar estas dos modalidades para maximizar su potencial en medicina veterinaria. El concepto de laparoscopia ultrasonográfica (LUS), está muy bien establecido desde hace un tiempo considerable en medicina humana. Ésta involucra la utilización de los principios de una cirugía poco invasiva combinada con la ultrasonografía, por lo que la cabeza ultrasonográfica en forma de una sonda se inserta a través de un trocar laparoscópico y se coloca directamente sobre el órgano a ser examinado. Aún así, la capacidad de alcanzar varias porciones del hígado con la sonda ultrasonográfica varía de acuerdo con el tamaño y la edad del equino a pesar del hecho de que la cámara laparoscópica proporciona acceso visual a la mayoría de las regiones **(Gerlach y Ferguson, 2003)**.

Con respecto a los factores de coagulación, las pruebas más representativas, TTPA, TP y Fb, evalúan en conjunto vía intrínseca, extrínseca y común de la coagulación, constituyéndose de esta forma en un referente indirecto de la integridad y funcionalidad hepática, al descartar procesos que afectan en forma directa estas pruebas **(Blood y Radostits, 1992)**.



Los mecanismos de coagulación de humanos y otros animales son extraordinariamente similares, pero sólo pocos estudios han comparado sistemáticamente función plaquetaria, coagulación y fibrinólisis entre especies o han realizado una comparación fidedigna utilizando humanos como referencia (**Dodds, 1997**), ya que se han obtenidos bajos resultados cuando fueron usadas curvas estándar de plasma de referencia humano (**Gentry y Christopher, 2001**).

En humanos la asociación de anomalías hemostáticas con enfermedad hepática está bien establecida. Incluso se indica que, el tiempo de protrombina correlaciona estrechamente con la severidad del daño hepatocelular y es un mejor indicador pronóstico que los niveles de bilirrubina sérica. En la mayoría de los animales con perfiles hemostáticos anormales, estaban prolongados tanto el tiempo de protrombina como el de tromboplastina parcial activado. Estos resultados son similares a los encontrados en perfiles de coagulación de animales con enfermedad hepática. Por lo que también existiría una asociación entre alteraciones hemostáticas y hepáticas en animales (**Gentry y Christopher, 2001**).

Un gran factor a considerar en el entendimiento de la hemostasis es el efecto del estrés fisiológico sobre la coagulación, fibrinólisis y función plaquetaria. Alteraciones de la hemostasis normal ocurren durante la vida fetal y neonatal, con la edad, sexo, cambios hormonales, preñez, raza, ejercicio, variación diurna, obesidad y grupos sanguíneos, aunque la significancia de muchos de estos cambios o factores es desconocida, algunos afectan la interpretación de pruebas diagnósticas o sitúan al paciente en riesgo de sangramiento o trombosis **(Dodds, 1997)**.

En pacientes con cirrosis, se han reportado niveles sanguíneos disminuidos de formas cimógenas de factores VII, X, V y protrombina, lo cuál se puede deber no sólo a la severidad de la cirrosis sino también, al menos en parte, al consumo de estos cimógenos por la vía extrínseca de la coagulación, ya que la severa sepsis puede estimular esta vía **(Plessier et al., 2003)**.

En enfermedad hepática, protrombina es la proteína procoagulante que más común y severamente se ve reducida **(Gentry y Christopher, 2001)**. Es un factor de la coagulación dependiente de vitamina K, en el hepatocito sufre una gamma carboxilación amino-terminal, la enzima responsable de este proceso (carboxilasa) requiere como cofactor vitamina K **(Arock y Pieroni, 2001)**. Su concentración se puede reducir ante una extensa necrosis hepática o cuando una cantidad insuficiente de bilis alcanza el intestino delgado no permitiendo la absorción intestinal de vitamina K **(Johnston, 1998)**.

El tiempo de protrombina mide la actividad de los factores de coagulación I, II, V, VII y X en plasma luego de la activación con tromboplastina tisular y recalcificación. Las tromboplastinas comerciales más comúnmente usadas son hechas de extracto de cerebro de conejo, aunque laboratorios de investigación pueden preparar sus propios homólogos de extractos de cerebro. A pesar del extracto de cerebro usado, es esencial que plasmas normales homólogos sirvan como ensayos controles, ya que frecuentemente ocurren interpretaciones erróneas cuando el plasma control y plasma del paciente son de diferentes especies. Plasmas animales usualmente coagulan muy rápido (menos de 10 segundos) cuando son activados con extracto comercial de cerebro de conejo. Por tanto se hace difícil detectar deficiencias menores, ya que el ensayo sólo se prolongaría por 1 o 2 segundos. Este problema puede ser solucionado diluyendo el reactivo comercial hasta el tiempo de coagulación de los rangos controles entre 10 a 15 segundos. Con este ajuste, deficiencias moderadas producen un alargamiento de 2 a 5 segundos del tiempo de coagulación **(Doods, 1997)**.

El propósito fundamental de un test diagnóstico es discriminar entre individuos afectados y no afectados (**Durham et al., 2003c**). Combinaciones de pruebas pueden efectivamente discriminar entre caballos sanos y con enfermedad hepática confirmada, el TP es de extrema utilidad en enfermedades del hígado ya que se presenta marcadamente elevado cuando existen alteraciones hepáticas, correlacionado con TTPA se podría distinguir entre una hepatopatía incipiente y una severa enfermedad hepática (**Dodds, 1997**).

El TTPA realizado en plasma activado sobre caolín o ácido eláxico es un indicador confiable de la vía intrínseca de la coagulación, evaluando los factores XII, XI, IX, VIII y factores de la vía común X, V (**Blood y Radostits, 1992**). El TTPA varía en las diferentes especies, con las fuentes de tromboplastina utilizadas, con el método y con el tipo de instrumentos usados para determinar el punto final. Además, la dilución de plasmas animales para enlentecer el proceso de coagulación en el TTPA ha dado resultados variables. Son entonces esenciales plasmas homólogos como controles. Una variante simple del TTPA es el tiempo de coagulación activado (TCA) que mide la actividad de la vía intrínseca de sangre entera. La ventaja de usar esta prueba es que se requiere sólo sangre entera, activador y calcio y depende de la activación sobre las plaquetas suministradas por la muestra. Entonces, el TCA es sensible para cambios significativos en el conteo plaquetario. Esto ha sido utilizado exitosamente en animales menores y mayores como un test de exploración, aunque el TTPA es aún preferido por la mayoría de los laboratorios (**Doods, 1997**).

El nivel sérico de fibrinógeno es normal en muchos caballos con enfermedad hepática. Sin embargo, ante un daño hepatocelular grave, las concentraciones séricas de fibrinógeno pueden ser inferiores a 100 mg/dl.. Como las enfermedades colestásicas primarias pueden estar acompañadas por una relativa disminución de la función hepatocelular, las concentraciones de fibrinógeno sérico pueden estar normales o aumentadas en casos de colelitiasis (**Johnston, 1998**).

El fibrinógeno es usualmente informado para demostrar bajas concentraciones plasmáticas en asociación con enfermedad hepática, pero en un reciente estudio, se encontró que caballos con fibrinógeno plasmático elevado tenían mayor tasa de mortalidad que caballos con bajos valores, siendo la concentración promedio de fibrinógeno plasmático significativamente mayor en no sobrevivientes que en sobrevivientes (4,3 versus 3,2 g/l) (**Durham et al., 2003b**).

Las concentraciones de fibrinógeno pueden ser cuantificadas por varios métodos, incluyendo ensayos biológicos, físicos e inmunológicos. Un método físico práctico para uso clínico en medicina humana y veterinaria está basado en precipitación por calor y en la coagulabilidad de la trombina. Las muestras de plasma son colocadas en tubos de microhematocrito y la cantidad de precipitado formado después de calentar los tubos por 3 a 9 minutos a 56°C es cuantificado por micrómetro ocular. Los métodos biológicos son más exactos, como el ensayo de Ratnoff-Menzie que mide el peso de coágulos secos recalcificados. Otra técnica común son los ensayos inmunológicos de fibrinógeno, los cuáles cuantifican el inmunoprecipitado formado con sueros antifibrinógeno específicos (**Doods, 1997**).

El método de precipitación del microhematocrito de Millar *et al.* en 1971 y de Schalm *et al.* en 1975 se ha comparado con un método que emplea una proteína coagulable de referencia (**Ratnoff y Menzie, 1957**), en la determinación del fibrinógeno sérico en el caballo. El método Millar fue más exacto y preciso y mostró una correlación más positiva con el método de referencia que el método de Schalm. El método de Millar fue recomendado como procedimiento simple y relativamente exacto para la determinación de fibrinógeno en plasma, determinación que puede ser utilizada como indicador adicional de diagnóstico y pronóstico en la investigación de enfermedades en el caballo (**Campbell et al., 1981; Brugmans et al., 1998**).

En equinos, se han realizado dichos análisis en trabajos de investigación de ciertas patologías, pero en general escasean trabajos para establecer “valores de referencia” y determinar la utilidad relativa de cada prueba (**Blood y Radostitis, 1992**).

Una población es una colección de individuos o artículos que tienen algo en común. Por ejemplo, se puede decir que la población de perros sanos consiste en todos los perros que están libres de enfermedad. Si un perro determinado pertenece o no a la población de perros sanos depende de la habilidad del investigador para determinar si ese perro está libre o no de enfermedad (**Farver, 1997**).

Una población puede ser descrita por características cuantificables frecuentemente llamadas observaciones o medidas. Si fuese posible registrar una observación para cada miembro en la población, lo más probable es que demostraría que no todos los miembros de la población tienen el

mismo valor para dicha observación. Esto refleja la inherente variabilidad en poblaciones. Para una medición dada, la lista de posibles valores que pueden ser asumidos, con la correspondiente frecuencia con la cuál cada valor aparece en la población relativa al número total de elementos en la población, es referida como, la distribución de las mediciones u observaciones en la población. Cada distribución poblacional puede ser descrita por medidas conocidas como parámetros. El promedio, mediana y moda son tres miembros de la clase de parámetros que describen el centro de la distribución. La desviación estándar, varianza y rango son ejemplos de parámetros que proveen información sobre la dispersión de la distribución. La forma de la distribución también es importante. Algunas distribuciones son simétricas con respecto al centro, mientras que otras distribuciones son asimétricas, siendo inclinada a la derecha o izquierda (**Farver, 1997**).

El concepto de valor de referencia se aplica al obtenido de aquellos individuos clínicamente sanos provenientes de una población definida y con descripción precisa, donde se selecciona una muestra aleatoria de referencia numéricamente adecuada, desde la cual se obtienen valores para elaborar una curva de distribución. De esta curva se obtienen límites e intervalos de referencia, los que se utilizan como patrones de comparación (**Braun et al., 1983**).

Desde el punto de vista clínico la significación estadística no resuelve todas las interrogantes que hay que responder ya que la asociación estadísticamente significativa puede no ser clínicamente relevante y, además, la asociación estadísticamente significativa puede no ser causal. En definitiva podemos encontrar asociaciones "estadísticamente posibles y conceptualmente estériles". A pesar de las limitaciones de la estadística, el término "estadísticamente significativo" invade la literatura médica, el considerar el término significativo implica utilizar términos comparativos de dos hipótesis. Los tests de hipótesis son pruebas de significación estadística que cuantifican hasta que punto la variabilidad de la muestra puede ser responsable de los resultados de un estudio en particular (**Pita y Pertega, 2001**).

El estado de "salud absoluta" no existe, algún grado de patología está presente en cada individuo, este concepto está implícito en la definición de "valores de referencia", que son derivados de mediciones de presuntas poblaciones sanas, el nivel de salud de la población puede ser específico basados en el criterio usado para inclusión o exclusión de individuos a esta población sana (**Sunderman, 1975**).

La normalidad o salud son términos difíciles de definir en cualquier especie, pero en ninguna es quizás tan difícil como en el equino (**Gerber *et al.*, 1975**), ya que la hematología y bioquímica clínica del equino son únicas en muchos aspectos en comparación con otras especies domésticas (**Schalm *et al.*, 1975**).

Se debe tener en cuenta que los equinos FSC como todos los mamíferos domésticos atraviesan por distintos estadios fisiológicos, (crecimiento, gestación, lactancia, entrenamiento, envejecimiento) que conllevan a modificaciones en su organismo (**Coppo, 2001**). Si bien los valores hematológicos no están ajenos a estos cambios, las pruebas de coagulación podrían también estar sujetas a dichos cambios, por ende es importante conocer cual es la real influencia de estos factores, ya que al utilizar un examen como ayuda diagnóstica, es posible que se atribuya significado patológico a resultados que reflejan sólo un cuadro normal para determinado estado fisiológico (**Irvine, 1958**).

Producto de lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo determinar los valores de referencia para las pruebas de coagulación, para equinos FSC; y de esta forma evaluar funcionalidad hepática, entregando información esencial para el Médico Veterinario Internista.

OBJETIVOS

a.- Objetivos generales:

- Estimar valores e intervalos de referencia para pruebas de funcionalidad hepática en equinos Fina Sangre de Carrera (FSC).

b.- Objetivos Específicos:

- Establecer valores de referencia para Fibrinógeno (Fb), Tiempo de Protrombina (TP) y Tiempo de Tromboplastina parcial activada (TTPA) en equinos FSC.
- Establecer, basados en los valores referenciales obtenidos para Tiempo de Protrombina, porcentajes de actividad de protrombina que reflejen funcionalidad hepática (Recta de Thivolle).
- Entregar los resultados para TP con su correspondiente razón internacional normalizada (INR) que hace posible las comparaciones interlaboratorios.
- Determinar si factores como sexo y edad influyen en la cuantificación de pruebas de funcionalidad hepática (pruebas de coagulación).

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se utilizaron equinos provenientes de haras (Haras Cordillera y Haras Puerta de Hierro) e hipódromos de la Región Metropolitana (Club Hípico e Hipódromo de Santiago), sometidos a normas de manejo, alimentación y entrenamiento habituales para equinos Fina Sangre de Carrera (FSC).

Determinación de grupos de trabajo:

Se establecieron 4 grupos:

Grupo I:	H:1	Equinos hembras de 1 a 2 años, sin entrenamiento previo.	E:1
Grupo II:	M:1	Equinos machos enteros de 1 a 2 años, sin entrenamiento previo.	
Grupo III:	H:3	Equinos hembras de 3 a 5 años, en entrenamiento y compitiendo.	E:3
Grupo IV:	M:3	Equinos machos de 3 a 5 años, en entrenamiento y compitiendo.	

Con un tamaño mínimo de 15 individuos para cada grupo, constituidos por ejemplares clínicamente sanos determinados mediante anamnesis, examen clínico y exámenes de laboratorio que se detallan a continuación:

1. Hemograma y velocidad de hemossedimentación (VHS).
2. Perfil Bioquímico:
 - Transaminasa oxalacética (GOT, AST).
 - Bilirrubina total y directa.

Cada equino tiene su ficha de registro y un número correspondiente (Anexo N°3).

Obtención de muestras de sangre:

Todas las muestras se tomaron en ayuno y antes de realizar cualquier tipo de actividad física. La extracción se realizó por venipuntura yugular, teniendo especial atención en la proporción volumen / anticoagulante, ya que es punto crítico en las pruebas de coagulación:

- 1 tubo con citrato (tapa celeste) 1,8 ml para pruebas de coagulación.
- 1 tubo con EDTA (tapa lila) 5 ml para hemograma.
- 1 tubo sin anticoagulante (tapa roja) 5 ml para perfil bioquímico.

Las muestras se trasladaron al laboratorio en menos de 1,5 horas desde que se realizó la extracción. No se requirió mayor tiempo de traslado, por ende tampoco de centrifugación.

Los análisis de las muestras se realizaron en el Laboratorio de Química Clínica Especializada, División Veterinaria, el cuál cuenta con métodos validados y aseguramiento de calidad, a través de control de calidad interno y rondas de ensayo interlaboratorios internacionales-España mensuales.

Los análisis realizados para determinar los parámetros de funcionalidad hepática, fueron fibrinógeno sérico (Fb), tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA).

Métodos:

1. Hemograma:
 - Recuento elementos figurados, se utilizó autoanalizador ADVIA 60[®] Bayer.
 - Fórmulas leucocitarias, se realizaron al microscopio con tinción Giemsa.
 - VHS se realizó por método de Westergreen en Micro Sed System (Auto e.s.r. Analyzer).

2. Bioquímica sanguínea: Todas las pruebas de bioquímica sanguínea se realizaron en equipo automatizado (Selectra II[®]).

- GOT (AST): Método UV optimizado (International Federation of Clinical Chemistry, IFCC) 37°C.
 - Bilirrubinas: Método DPD (Diclorofenildiazonio).
3. Pruebas de coagulación: Todas las pruebas de coagulación se realizaron en coagulómetro semiautomático Amelung KC – 1A® :

Control de Calidad: Para todas las pruebas se utilizaron dos plasmas control valorados (C1 y C2) antes de analizar las muestras, para verificar los resultados. Controles Grifolds®.

Muestra: La manipulación inicial de la muestra fue igual para las tres pruebas:

Se mezcló nueve partes de sangre recién extraída con una parte de citrato de sodio 0,11 mol/l (3,8%). Se centrifugó durante 10 minutos a 1500 g tan pronto como llegaron las muestras a laboratorio. Se transfirió el plasma a un tubo de plástico limpio usando una pipeta con punta de plástico. Se conservó la muestra refrigerada, menos de 1 hora hasta su procesamiento.

- **Fibrinógeno sérico:** Método de Clauss (Método de referencia según NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)). El fundamento de la prueba es que cuando se adiciona trombina a un plasma citratado se forma un coágulo. El tiempo de coagulación es proporcional a la concentración de Fb de la muestra.

Reactivo: DG- FIB de Grifolds®.

Muestra: Además del manejo descrito anteriormente, la muestra de plasma para determinación de Fb se debió diluir a razón de 1/10 (0,1 ml de plasma + 0,9 ml de tampón de Orwen).

Método: Se llevó a temperatura ambiente tanto muestras como reactivos, luego se pipeteó 0.2 ml de muestra diluida (1/10) y se incubó por 2 minutos a 37°C, se midió el tiempo desde que se adiciona el reactivo (0,1 ml), el equipo semiautomático tiene lectura óptica de la formación del coágulo.

Resultados: se obtuvieron interpolando el tiempo de coagulación obtenido (segundos) en la curva de calibración a la concentración correspondiente de Fb en mg/dl.

Curva de Calibración: se utilizó plasma de referencia (DG-REF), se empleó la misma curva de calibración que para humanos ya que su rango es tan amplio que alcanza a interpolar cualquier valor.

- **Tiempo de tromboplastina parcial activado:** Método del tiempo cefalina más activador. La prueba de TTPA se basa en la activación del plasma citratado por parte de un activador de la fase de contacto (ácido eláxico) en presencia de factor III plaquetario o en presencia de un equivalente de los fosfolípidos plaquetarios (Cefalina). Posteriormente se agregan iones de calcio en exceso, por lo tanto el tiempo de prueba será proporcional a los factores de coagulación implicados presentes en la muestra.

Reactivo: DG- APTT LA de Grifolds®.

Método: Se llevó a temperatura ambiente tanto muestras como reactivos. Se preincubó cloruro de calcio 0,025 M a 37°C. Luego se pipeteó 0.1 ml de muestra más 0,1 ml del reactivo (DG-APTT LA) se mezcló y se incubó por 3 minutos a 37°C, se midió el tiempo desde que se adiciona el cloruro de calcio (0,1 ml), el equipo semiautomático tiene lectura óptica de la formación del coágulo.

Resultado: se reportan en segundos.

- **Tiempo de protrombina:** Método de Quick (Tiempo de Quick (TQ)). Es el tiempo de coagulación a 37°C de un plasma citratado en presencia de tromboplastina tisular y calcio.

Reactivo: DG- PT de Grifolds® con un índice de sensibilidad internacional (ISI) de 1,17, que es expresión numérica de la sensibilidad del reactivo de tromboplastina que se utilizó, a partir del cuál es posible calcular la razón internacional normalizada (INR) que constituye la forma

correcta de expresar los resultados del tiempo de protrombina ($INR=(TM/TN)^{1.5}$), donde TM es el tiempo medido en segundos y TN tiempo promedio en segundos.

Método: Se preincubó el reactivo a 37°C. Se pipeteó 0.1 ml de muestra y se incubó por 2 minutos a 37°C, se midió el tiempo desde que se adiciona el reactivo (0,2 ml), el equipo semiautomático tiene lectura óptica de la formación del coágulo.

Resultados: Los resultados se entregaron en segundos.

Para expresar los resultados como porcentaje de actividad de protrombina se debe construir una curva de calibración (recta de Thivolle) respecto a un plasma testigo (calibrador) a partir del cuál se han hecho diluciones.

Curva de Calibración: Se puede preparar un pool de plasma normal fresco (PNF) de por lo menos 5 donantes sanos o utilizar plasma de referencia (DG-REF), como para equinos no se dispone de este último se preparó un pool.

Se realizaron diluciones sucesivas a partir del primer tubo de PNF con tampón de Owren (DG-Owren) como sigue:

Tubo	1	2	3	4
DG-Owren	--	1ml	1ml	1ml
Mezclar bien y transferir	2ml PNF	1ml Tubo 1	1ml Tubo 2	1ml Tubo 3
% de actividad	100%	50%	25%	12,5%

Las mediciones para cada punto de la curva se realizaron por duplicado.

Se representó la curva con la media de los tiempos obtenidos en un gráfico (recíproco lineal).

Análisis Estadístico:

Los valores obtenidos de las distintas pruebas de coagulación fueron procesados, mediante los programas computacionales, InfoStat-p (versión 2004), SAS (Statistical Analysis System, versión 2000) y Microsoft®Excel (versión 2000). Así los resultados se informan como: media, mediana, desviación estándar, varianza, coeficiente de variación, mínimos, máximos e intervalos de confianza.

Para eliminar los datos aberrantes, se truncó la muestra en tres desviaciones estándar de la media (3S).

Para verificar si existen diferencias estadísticamente significativas e interacción entre los efectos de sexo y edad de los grupos en estudio se realizó un análisis de varianza, de diseño factorial 2 x 2, mediante procedimientos de Modelos Lineales Generales (GLM) del programa de análisis estadístico SAS.

Modelo estadístico a utilizar:

$$y_{ijk} = \mu + S_i + E_j + I_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

y_{ijk} = característica de interés (Fb, TTPA, TP).

μ = promedio poblacional.

S_i = efecto sexo.

E_j = efecto edad.

I_{ij} = interacción entre sexo y edad.

ϵ_{ijk} = error residual.

El método de Análisis de Varianza para comparación de promedios parte del supuesto inicial de que no existe diferencia entre los promedios y que los resultados de la muestra son producto exclusivamente del azar (hipótesis nula) siendo su nivel de significancia $p < 0,05$. Si los valores de p son menores a 0,05 se opta por la hipótesis alternativa, aceptando que existen diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de los valores nominales.

Si existen diferencias estadísticamente significativas como resultado del análisis de varianza, se realizó una prueba de Tukey para comparaciones múltiples a fin de verificar que grupo del estudio está generando las diferencias evidenciadas.

Para realizar un análisis de varianza se deben cumplir los siguientes supuestos:

1.- Normalidad de los datos: supuesto que se comprueba mediante una prueba de Shapiro-Wilks modificado.

Un valor de p menor al nivel de significancia nominal de la prueba, en este caso menor a 0,05 conduce al rechazo de la hipótesis nula (muestra proveniente de una población de distribución normal).

2.- Homogeneidad de varianzas: supuesto que se comprueba mediante una prueba de homogeneidad de varianzas múltiples de Bartlett.

La hipótesis nula (igualdad de varianzas) se rechaza si el cálculo del estimador de la prueba es más grande que el valor crítico, siendo el nivel de significancia nominal de $p < 0,05$. En este caso, para heterogeneidad de varianzas, se procede a la transformación logarítmica de los datos.

Si no se cumplen los supuestos para el Análisis de Varianza, se realizó un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis. Si existen diferencias estadísticamente significativas como resultado del análisis de varianza no paramétrico, se realizó una prueba de Dunn a fin de verificar que grupo del estudio está generando las diferencias evidenciadas (**Siegel, 1956**).

RESULTADOS

La muestra se estructuró como sigue:

Tabla 1: Valores para Fibrinógeno (Fb), Tiempo de Protrombina (TP) y Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (TTPA) en equinos hembras de 1 a 2 años, sin entrenamiento previo (Grupo H:1).

Número Ficha	Nombre	Fibrinógeno (mg/dl)	TP (seg)	TTPA (seg)
1	Piedra Roja	200	9,0	34,6
2	Universitaria	192	9,3	31,8
4	Katalina	260	9,6	30,6
5	Noticiada	211	9,7	37,1
8	Dilución	213	9,8	37,0
10	Venecia Giulia	220	11,3	38,8
11	Terra Mater	242	10,8	42,5
12	Provócame	176	10,0	26,3
13	Striccia	232	10,0	34,3
14	Mi Catalina	244	8,6	29,3
15	María Jacinta	215	11,2	46,2
16	Sublimación	284	10,1	37,9
17	Kcheena	246	11,3	36,8
41	La Flautista	215	11,5	41,6
42	Miligrame	192	11,8	46,3
43	French Laundry	212	11,4	41,3

Tabla 2: Valores para Fibrinógeno (Fb), Tiempo de Protrombina (TP) y Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (TTPA) en equinos machos enteros de 1 a 2 años, sin entrenamiento previo (Grupo M:1).

Número Ficha	Nombre	Fibrinógeno (mg/dl)	TP (seg)	TTPA (seg)
18	Alicantina	182	10,6	44,5
19	Mochuelo	182	10,9	47,3
20	Habi	226	10,9	48,8
21	Acosador	254	10,8	41,0
22	Roquete	206	10,7	41,8
23	Tovar	232	10,9	36,3
24	Cheek	214	10,8	44,7
25	Eben Azisse	224	11,7	42,4
26	Remolona Soñada	216	11,3	44,1
27	Dancing Lady	217	11,2	44,2
28	Real Regent	208	10,2	41,0
30	As de Pick	324	11,4	45,3
31	Grande Choche	248	11,2	41,7
32	Barjan	242	11,6	45,5
33	Prima Donna	238	10,1	47,1
34	Parapente	187	11,1	49,2
35	Frattina	192	11,4	47,0
36	Willy	190	11,1	46,0
37	Súper Súper	188	11,3	30,5
38	El Javi	236	11,1	48,8

Tabla 3: Valores para Fibrinógeno (Fb), Tiempo de Protrombina (TP) y Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (TTPA) en equinos hembras de 3 a 5 años, en entrenamiento y compitiendo (Grupo H:3).

Número Ficha	Nombre	Fibrinógeno (mg/dl)	TP (seg)	TTPA (seg)
44	Chica Puntuda	160	10,7	34,7
45	Por Ti Negrita	252	9,4	25,6
46	Venecia Contigo	195	10,5	33
47	Bois de Fer	166	11,8	46,3
48	Lily Rubin	176	11,0	41,9
50	Baroness	184	11,0	35,5
51	Briboncilla	191	11,0	38,4
52	Resiembra	192	11,8	40,9
53	Alsabaj Eljer	117	11,0	41,1
54	Ikki	154	10,6	36,8
55	Javiera María	188	11,0	40,9
56	Bella Toscana	220	10,1	33,1
57	Juras	141	11,0	38,4
58	Chick to Chick	164	11,1	46,4
59	Paleóloga	162	11,0	38,8
60	Parmigiana	204	11,4	33,1
61	Bejarana	159	11,2	36,7

Tabla 4: Valores para Fibrinógeno (Fb), Tiempo de Protrombina (TP) y Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (TTPA) en equinos machos de 3 a 5 años, en entrenamiento y compitiendo (Grupo M:3).

Número Ficha	Nombre	Fibrinógeno (mg/dl)	TP (seg)	TTPA (seg)
62	Llego y Se Fue	145	12,4	27,7
63	Mithril	160	11,6	39,8
64	Tiotayo	242	9,4	27,6
65	Súper Cayo	184	11,1	29,9
66	Betito	254	11,3	41,3
67	Spillo	194	11,5	46,0
68	Peschid'oro	238	11,1	41,1
69	Seré un Líder	180	10,6	38,6
70	Petrol Wolf	150	10,5	46,8
71	Lucky Up	173	13,1	47,1
72	Amigo Nuestro	158	9,6	25,5
73	Silón	214	9,7	40,2
74	Tan Fácil	138	11,2	37,7
75	Río Hondo	176	11,2	33,8
76	Husoret	161	11,8	42,3
77	Tiene Poderes	147	11,1	33,5
78	Diametral	222	11,2	31,7
79	El Jinete Polaco	155	11,2	43,5
80	Kalule	158	11,0	37,4
81	Markham	154	12,1	40,8
82	As de Bastos	165	11,1	27,9
83	Prima igual	156	10,3	43,7
84	Bastían	163	10,9	35,9
85	Ski Lord	167	10,2	39,2
86	Cachenchito	145	12,3	35,5
87	Globus	169	10,7	43,3
88	Highland	165	11,0	36,1

Con estos nuevos límites, ningún dato queda fuera de rango, lo que determina que no existe otro dato aberrante dentro de la muestra.

Se sometió los datos a una prueba de Normalidad Shapiro-Wilks modificado, aceptando la hipótesis nula para distribución normal de la muestra, al obtener en la prueba un $p=0,1724$. Luego, se realizó una prueba de Bartlett para igualdad de multivarianzas. El valor de p en esta prueba fue de 0.846 , por tanto, no hay evidencia que existe heterogeneidad de varianzas.

Tabla 6: Análisis de Varianza para Fb.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	34680,62	3	11560,21	13,72	<0,0001
Sexo	467,13	1	467,13	0,55	0,4589
Edad	33429,55	1	33429,55	39,66	<0,0001
Sexo*Edad	101,95	1	101,95	0,12	0,7290
Error	63210,85	75	842,81		
Total	97891,47	78			

Donde:

F.V = factor de variación

SC = suma de cuadrados

gl = grados de libertad

CM = cuadrados medios

F = valor del estimador

p-valor = probabilidad que H_0 sea verdadera con p nominal >0.05

Del análisis anterior se concluye que hay diferencia por edad en la muestra, no hay diferencias estadísticamente significativas por sexo y tampoco existe interacción entre edad y sexo.

Tabla 7: Prueba de Tukey para Fb con un 95% de confianza.

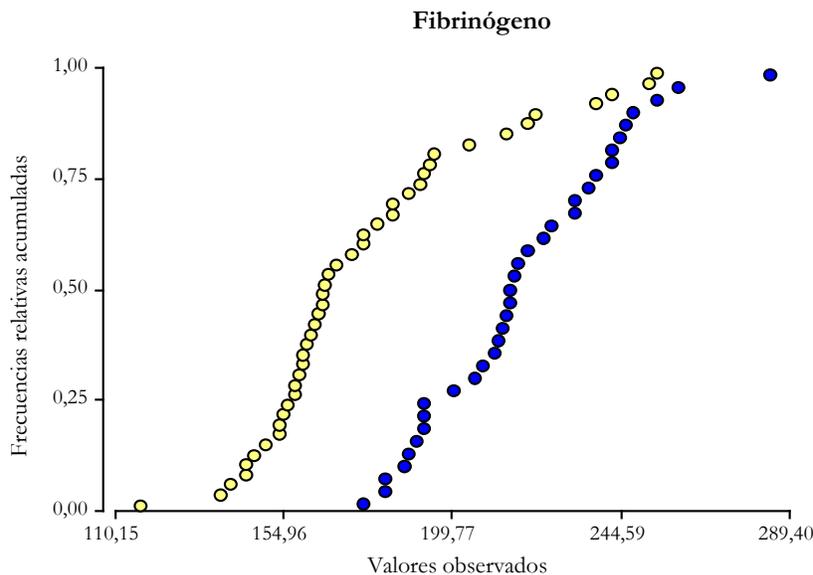
	H:1	H:3	M:1	M:3
H:1		*		*
H:3	0,0		*	
M:1	0,0	0,0		*
M:3	0,0	0,0	0,0	

* = Diferencias significativas para el nivel elegido.

De la tabla anterior se concluye que existen diferencias significativas entre:

- H:1 y H:3
- H:1 y M:3
- H:3 y M:1
- M:1 y M:3

Gráfico 1: Distribución empírica de los valores observados para Fb separados por edad.

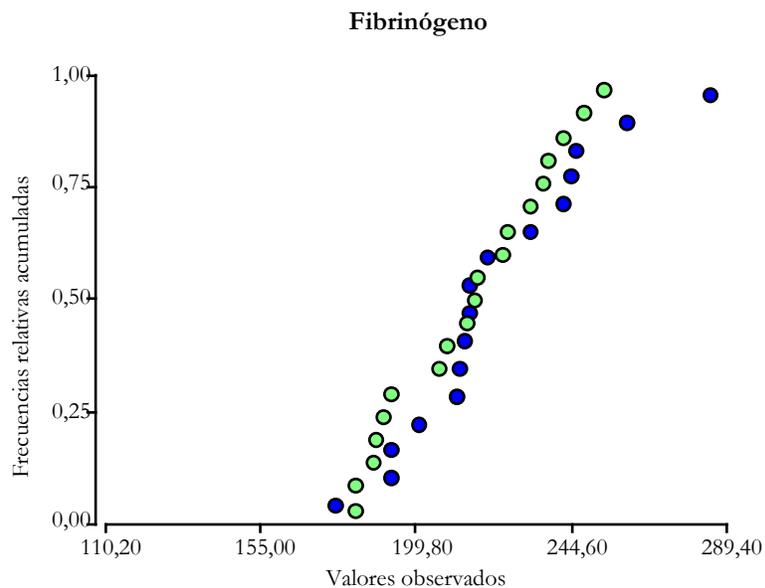


Donde: Edad 1 (E:1) = azul Edad 3 (E:3) = amarillo.

Como resultado de los análisis antes realizados, la muestra para Fb se dividió en dos submuestras por edades, como sigue:

- **Edad 1 (E:1):** equinos hembras y machos de 1 a 2 años.

Gráfico 2: Distribución empírica de los valores observados para Fb para E:1 separados por sexo.



Donde: Hembras (H) = Azul Machos (M) = Verde.

Siendo el promedio muestral de 218,17 y la desviación estándar de 25,38. Con un coeficiente de variación de 11,6 %.

3S : 76,14 dando como límite inferior : 142,03

límite superior : 294,31

Con estos límites, ningún dato queda fuera de rango, lo que determina que no existen datos aberrantes dentro de la muestra.

- **Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (TTPA):**

Tabla 8: Descripción estadística para TTPA.

Resumen	TTPA				
	Total	H	M	E1	E3
n	80	33	47	36	44
Media	39,06	37,39	40,24	40,82	37,63
Mediana	40	37,1	41,3	41,75	38,40
Desviación Estándar	6,09	5,40	6,32	6,09	5,76
Varianza	37,04	29,13	39,94	37,10	33,14
Coefficiente de variación	15,58	14,43	15,71	14,92	15,30
Mínimo	25,5	25,6	25,5	26,3	25,5
Máximo	49,2	46,4	49,2	49,2	47,1

Siendo el promedio muestral de 39,06 y la desviación estándar de 6,09. Con un coeficiente de variación de 15,6%.

3S : 18,27 dando como límite inferior : 20,79

límite superior : 57,33

Con estos límites, ningún dato queda fuera de rango, lo que determina que no existen datos aberrantes dentro de la muestra.

Se sometió los datos a una prueba de Normalidad Shapiro-Wilks modificado, rechazando la hipótesis nula para distribución normal de la muestra, al obtener en la prueba un valor de $p=0,0080$.

Luego, se realizó una prueba de Bartlett para igualdad de multivarianzas. El valor de p en esta prueba fue de 0.796, por tanto, no hay evidencia suficiente para asegurar que existe heterogeneidad de varianzas.

Aún realizando la transformación logarítmica de los datos, la muestra no se ajusta a una distribución normal, por lo tanto, al no cumplirse los supuestos para efectuar el análisis de varianza, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis:

Tabla 9: Prueba de Kruskal Wallis para TTPA.

Sexo	Edad	H	p
H	1	18,68	0,0003
H	3		
M	1		
M	3		

Donde:

H = valor del estimador.

p = valor de la probabilidad que H_0 sea verdadera.

Según el análisis anterior existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Tabla 10: Prueba de Dunn para TTPA con un 95% de confianza.

	H:1	H:3	M:1	M:3
H:1			*	
H:3	0,0		*	
M:1	0,0	0,0		*
M:3	0,0	0,0	0,0	

* = Diferencias significativas para el nivel elegido.

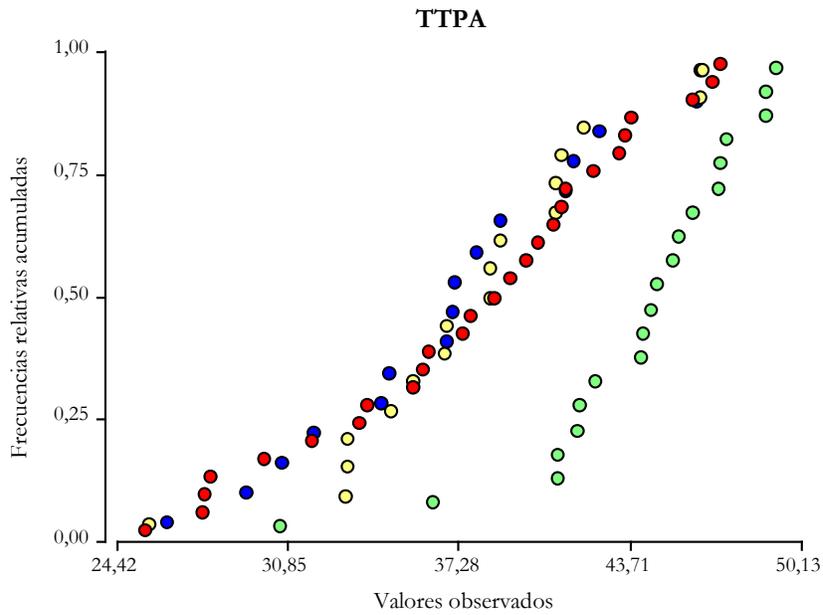
De la tabla anterior se concluye que existen diferencias significativas entre:

- M:1 y H:1
- M:1 y H:3
- M:1 y M:3

Y no se evidencia diferencias estadísticamente significativas entre:

- H:1 y H:3
- H:1 y M:3
- H:3 y M:3

Gráfico 4: Distribución empírica de los valores observados para TTPA separados por edad y sexo.



Donde: M:1 = verde H:1 = azul M:3 = rojo H:3 = amarillo

Aún no detectando diferencias estadísticamente significativas entre la muestra completa y la muestra sin el grupo M:1 se entregan intervalos de confianza para cada grupo en estudio.

Tabla 13: Intervalos de confianza para TTPA con un 95% de confianza.

	Limite inferior	Limite superior
Hembras Edad 1	25,479	48,571
Hembras Edad 3	27,396	48,084
Machos Edad 1	34,878	52,842
Machos Edad 3	25,168	49,936

Aún realizando la transformación logarítmica de los datos, las varianzas siguen siendo heterogéneas, por lo tanto, al no cumplirse los supuestos para efectuar el análisis de varianza, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis:

Tabla 15: Prueba de Kruskal Wallis para TP.

Sexo	Edad	H	p
H	1	4,74	0,1900
H	3		
M	1		
M	3		

Donde:

H = valor del estimador.

p = valor de la probabilidad que H_0 sea verdadera.

Del análisis anterior se concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p=0,1900$).

Determinación de recta de Thivolle:

Tabla 16: Diluciones: Pool (23-10-2004)

1:1	Muestra ₁	11,1	10,9	100%
	Muestra ₂	10,7		
1:2	Muestra ₁	13,8	13,85	50%
	Muestra ₂	13,9		
1:3	Muestra ₁	17,2	17,2	33%
	Muestra ₂	17,2		

Tabla 17: Tiempo de Quick (TQ)

X	y	Consumo
t (seg)	recíproco	(Q%)
10,90	0,01	100,00
13,90	0,02	50,00
17,20	0,03	33,00

Siendo la ecuación de la recta:

$$y = at + b$$

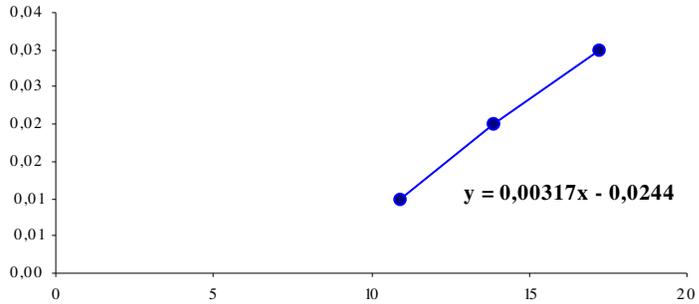
donde : y = inverso de Quick (%)

a = pendiente de la recta

t = x = tiempo leído en segundos.

b = intercepto

Gráfico 6: Recta de Thivolle.



Por lo tanto para cada TP entregado en segundos se establecerá un “y”. El inverso de “y” determinará el porcentaje de actividad de protrombina:

x	y	% de Actividad
Tiempo de coagulación tomado en segundos	$0.00317 (x) - 0.0244$	$1/y$

Tabla 18: Resultados para TP en segundos, porcentaje y razón internacional normalizada (INR).

Segundos	%	INR	Segundos	%	INR
TM	TP	(TM/TN) ^{ISI}	TM	TP	(TM/TN) ^{ISI}
10,8	100	0,99	13,8	52	1,32
10,9	99	1,00	13,9	51	1,33
11,0	96	1,01	14,0	50	1,34
11,1	93	1,02	14,1	49	1,35
11,2	90	1,03	14,2	49	1,36
11,3	88	1,04	14,3	48	1,37
11,4	85	1,05	14,4	47	1,39
11,5	83	1,06	14,5	46	1,40
11,6	81	1,08	14,6	46	1,41
11,7	79	1,09	14,7	45	1,42
11,8	77	1,10	14,8	44	1,43
11,9	75	1,11	14,9	44	1,44
12,0	73	1,12	15,0	43	1,45
12,1	72	1,13	15,1	43	1,46
12,2	70	1,14	15,2	42	1,48
12,3	69	1,15	15,3	41	1,49
12,4	67	1,16	15,4	41	1,50
12,5	66	1,17	15,5	40	1,51
12,6	64	1,18	15,6	40	1,52
12,7	63	1,20	15,7	39	1,53
12,8	62	1,21	15,8	39	1,54
12,9	61	1,22	15,9	38	1,56
13,0	59	1,23	16,0	38	1,57
13,1	58	1,24	16,1	38	1,58
13,2	57	1,25	16,2	37	1,59
13,3	56	1,26	16,3	37	1,60
13,4	55	1,27	16,4	36	1,61
13,5	54	1,28	16,5	36	1,62
13,6	53	1,30	16,6	35	1,64
13,7	53	1,31	16,7	35	1,65

Segundos	%	INR	Segundos	%	INR
TM	TP	(TM/TN) ^{ISI}	TM	TP	(TM/TN) ^{ISI}
16,8	35	1,66	19,5	27	1,97
16,9	34	1,67	19,6	26	1,99
17,0	34	1,68	19,7	26	2,00
17,1	34	1,69	19,8	26	1,55
17,2	33	1,71	19,9	26	1,56
17,3	33	1,72	20,0	26	1,57
17,4	33	1,73	20,1	25	1,58
17,5	32	1,74	20,2	25	1,59
17,6	32	1,75	20,3	25	1,60
17,7	32	1,76	20,4	25	1,61
17,8	31	1,78	20,5	25	1,62
17,9	31	1,79	20,6	24	1,63
18,0	31	1,80	20,7	24	1,63
18,1	30	1,81	20,8	24	1,64
18,2	30	1,82	20,9	24	1,65
18,3	30	1,83	21,0	24	1,66
18,4	29	1,85	21,1	24	1,67
18,5	29	1,86	21,2	23	1,68
18,6	29	1,87	21,3	23	1,69
18,7	29	1,88	21,4	23	1,70
18,8	28	1,89	21,5	23	1,71
18,9	28	1,90	21,6	23	1,72
19,0	28	1,92	21,7	23	1,73
19,1	28	1,93	21,8	22	1,74
19,2	27	1,94	21,9	22	1,75
19,3	27	1,95	22,0	22	1,76
19,4	27	1,96	22,1	22	1,76

Donde:

TM = tiempo medido en segundos

TP = tiempo en porcentaje

TN = tiempo promedio en segundos

ISI = índice de sensibilidad internacional

DISCUSIÓN

- Fibrinógeno (Fb).

La muestra de Fb se dividió en dos submuestras por edades, estableciendo como intervalo de referencia para hembras y machos de 1 a 2 años de edad (E:1) 167,41 a 268,93 mg/dl y para hembras y machos de 3 a 5 años de edad (E:3) el límite inferior queda establecido en 113,92 mg/dl y el límite superior en 238,72 mg/dl.

Según Harvey *et al.* en 1984, la concentración de Fb aumenta a su máxima concentración a los 5 meses de edad, por ende se esperaría que el rango de valores para E:1 fuese menor o igual que para E:3, interesantemente en este estudio los niveles de Fb son mayores en E:1. Situación que se puede deber al estrés fisiológico que sufrieron los potrillos (E:1) en el presente estudio al ser sometidos por primera vez en su vida a factores estresantes, asociados por ejemplo, a transporte y manejo necesarios para hacer posible la toma de muestras, ya que, como informa Dodds (1997) estos factores afectan la respuesta de proteínas de fase aguda, acontecimiento que también evidencia Arthington *et al.* en 2003, en terneros recién destetados sometidos a transporte por primera vez, encontrando que, tanto Fb como, ceruloplasmina y cortisol aumentaban con el estrés.

Además, la actividad enzimática sérica en potrillos es considerablemente más elevada que en caballos adultos pudiendo reflejar una diferencia fisiológica entre estos, ya que, la masa hepática relativa (como porcentaje del peso corporal) y actividad enzimática por gramo de tejido hepático son más altos en animales jóvenes (**Gossett y French, 1984**).

Por otro lado, se ha encontrado en la literatura algunos trabajos referente a mediciones de Fb, en las que se evidencia una amplia dispersión de los valores informados dependiendo del autor que se consulte y el método que se utilice (**Tamzali *et al.*, 2001**). No existiendo una concordancia entre la técnica ocupada y el intervalo de referencia reportado, ya que Campbell *et al.* en 1981, Morris y Beech en 1983 y Larkin en 1987, utilizando la misma técnica de precipitación por calor más centrifugación, difieren en los intervalos de referencia publicados. A su vez, distintas técnicas aplicadas al mismo grupo experimental

de caballos originan intervalos referenciales distintos, como lo evidenciado por Blaisdell y Dodds en 1977 (ver anexos N°1 y N°2).

Cabe destacar que todos los estudios comparados por Tamzali *et al.* en 2001 fueron realizados en equinos adultos, a excepción de Brugmans *et al.* en 1998, quien separa la muestra en grupos etáreos estableciendo tres grupos de estudio, el primer grupo menor de 6 meses, el segundo entre 3 y 19 años y el tercer grupo mayores de 19 años, si bien el estudio realizado por Brugmans *et al.* reporta un intervalo de referencia mayor en el grupo etáreo menor (325 ± 40 mg/dl), concordando con los resultados del presente estudio, deja sin intervalo referencial a los animales entre 1 a 2 años, grupo de sumo interés en los criaderos de equinos Fina Sangre de Carrera (FSC), ya que a esta edad comienza el manejo más controlado.

Esta dispersión de valores evidenciada en la literatura, se puede deber a la cantidad de animales utilizada en cada determinación, ya que una variable que presente una amplitud y una varianza total tan alta ($\sigma^2=1255,02$) difícilmente se podría llegar a tomar una muestra suficiente. Por consiguiente, se debe considerar que las diferencias encontradas entre grupos, a un bajo número de individuos, puede enmascarar alguna diferencia (**Pita y Pertega, 2001**), por lo cuál, según los resultados reportados en el presente estudio, se puede decir que al menos existe diferencia entre edades para la variable Fb en equinos FSC.

Según Campbell *et al.* (1981), no habría diferencia significativa en la concentración de Fb entre los caballos FSC sanos y los caballos sanos de otras razas. Lo que permitiría extrapolar estos resultados a la población total de caballos.

- Tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA).

Al comparar los intervalos de referencia para la muestra total de TTPA del presente estudio (26,88 a 51,24 seg.) con los entregados en literatura, estos se ajustan más a los valores publicados por Kaese *et al.* en 2005 (25,7 a 47,3 seg), que los entregados por Kaneko *et al.* en 1997 (3,3 a 36 seg), lo que se puede atribuir a la metodología utilizada en las determinaciones y/o a los avances en las técnicas de laboratorio, que hacen cada vez más sensibles y específicas las pruebas de laboratorio (**Moritz *et al.*, 2004**).

Al realizar una prueba de Kruskal Wallis se determinó que existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en estudio, lo que se corroboró con una prueba de Dunn, que evidenció que las diferencias entre grupos eran debido principalmente al grupo de machos de 1 a 2 años (M:1), situación que se podría explicar por el estrés sufrido por los ejemplares al momento de la toma de muestra o a un factor que fue imposible determinar en el estudio, lamentablemente no existen publicaciones detalladas que hagan posible la comparación exhaustiva sobre el tema.

Si bien, al realizar las pruebas estadísticas correspondientes, se determinó entregar intervalos de referencia para cada grupo, también se entrega un intervalo de referencia total para la muestra, por términos prácticos, ya que desde el punto de vista clínico la significación estadística no resuelve todas las interrogantes que hay que responder, pues la asociación estadísticamente significativa puede no ser clínicamente relevante (**Pita y Pertega, 2001**). En este caso corresponde a una diferencia de sólo 3 segundos entre los M:1 y el resto de la muestra lo que es, en términos de cuantificación para la prueba de TTPA irrelevante.

- Tiempo de protrombina (TP).

Los rangos referenciales obtenidos en el presente estudio para TP (9,32 a 12,44 seg.) coinciden con los encontrados en literatura, reportados por Kaneko *et al.* en 1997 (9,7 - 12,1 seg.).

Para entregar los resultados como porcentaje de actividad de protrombina, se requirió establecer una curva de calibración (recta de Thivolle), a partir de un pool de plasma equino, ya que se han obtenidos bajos resultados cuando se han utilizado curvas estándar de plasma de referencia humano. Gentry y Christopher (2001), recomiendan utilizar una curva estándar generada con un pool de plasma de la especie a la cuál se testeará, ya que si la curva estándar es generada usando plasma humano, se debe tomar en cuenta que la sensibilidad del ensayo puede disminuir.

A su vez se incorporó asociado al porcentaje de actividad de protrombina, la razón internacional normalizada (INR) que constituye la forma correcta de expresar los resultados del tiempo de protrombina, que se obtiene a partir de un índice de sensibilidad internacional (ISI), que es expresión numérica de la sensibilidad del reactivo de tromboplastina que se utilizó, al corregir el tiempo medido en segundos por el ISI correspondiente, se elimina esta fuente de variación, haciendo posible las comparaciones interlaboratorios. El límite inferior queda entonces establecido en 12,4 segundos lo que corresponde a un 67% de actividad de protrombina con un INR de 1,16.

Ya que, los equinos en asociación con enfermedades severas del tracto gastrointestinal, cirugías abdominales, peritonitis, endotoxemia, septicemia, trombosis venosa, laminitis y coagulación intravascular diseminada (DIC) desarrollan desordenes de la coagulación, la heparina es ampliamente utilizada para el tratamiento y profilaxis de éstos trastornos. El TP es una de las pruebas más útiles en el seguimiento cercano de equinos con terapia anticoagulante, para evitar efectos adversos frecuentes como inflamación en el sitio de punción, hemorragia, trombocitopenia y aglutinación de eritrocitos con potencial daño al flujo sanguíneo microvascular (**Schwarzwald *et al.*, 2002**). Siendo éste, junto con la evaluación de funcionalidad hepática, uno de los usos más relevantes del TP, se hace necesario contar con resultados estandarizados y que permitan realizar comparaciones interlaboratorios.

Puesto que en los últimos años se han realizado muchos avances en bioquímica clínica, las diferencias encontradas con valores de referencia publicados previamente para las pruebas de coagulación pueden ser atribuidos en gran manera a las diferencias en la metodología (**Moritz *et al.*, 2004**), condición que se evidencia en los resultados entregados en este estudio para Fb y TTPA.

A pesar de que los resultados de este estudio no revelaron que factores como edad o sexo afecten las pruebas de coagulación, a excepción del efecto edad evidenciado en los valores de Fb, se debe tener en cuenta que los equinos como todos los mamíferos domésticos atraviesan por distintos estadios fisiológicos, que conllevan a modificaciones en su organismo, como los descritos por Dodds (1997), Lakritz *et al.* (2000) y Coppo (2001). La real significancia de muchos de estos cambios o factores aún es desconocida y algunos podrían afectar la interpretación de pruebas diagnósticas, si bien, se hace necesario seguir investigando, los intervalos de referencia obtenidos de este estudio proveen valiosa información para la evaluación de parámetros de coagulación, evaluación de funcionalidad hepática y para comparaciones interlaboratorios.

CONCLUSIÓN

- Al encontrar diferencias estadísticamente significativas ligadas a la edad, los valores de referencia para fibrinógeno (Fb) en equinos Fina Sangre de Carrera (FSC) son:

	mg/dl	mg/dl
Fb Edad 1	218,17 ± 50,76	167,4 – 268,9
Fb Edad 3	176,32 ± 62,40	113,9 – 238,7

- Los valores de referencia para tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPA) en equinos FSC son:

	segundos	segundos
Hembras Edad 1	37,03 ± 11,55	25,5 - 48,6
Hembras Edad 3	37,74 ± 10,34	27,4 - 48,1
Machos Edad 1	43,86 ± 8,98	34,9 - 52,8
Machos Edad 3	37,55 ± 12,38	25,2 - 49,9

	segundos	segundos
TTPA total	39,06 ± 12,18	26,9 – 51,2

- Los valores de referencia para tiempo de protrombina (TP) en equinos FSC son:

TP (segundos)	10,88 ± 1,56	9,32 - 12,44
TP (porcentaje)		100 - 67
INR		1,00 - 1,16

BIBLIOGRAFÍA

- **ANDREWS F.; KORENEK N.; SANDERS W.; HAMLIN R.** 1992. Viscosity and rheologic properties of blood from clinically normal horses. *Am J Vet Res.* 53(6): 966 – 970.
- **ARAYA, O.** 1990. Seneciosis en Caballos. *Monografías Med. Vet.* 12 (1): 3 – 10.
- **AROCK, M.; PIERONI, L.** 2001. La Hemostasis. *An Clin.* 26 (1): 1 – 55.
- **ARTHINGTON, J.; EICHER, S.; KUNKLE, W.; MARTIN, F.** 2003. Effect of transportation and commingling on the acute-phase protein response, growth, and feed intake of newly weaned beef calves. *J. Anim Sci.* 81: 1120 – 1125.
- **ARTHUR, M.** 2000. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: 245 – 249.
- **BANKS, W.** 1980. Digestive System. **In:** *Histology and Comparative Organology.* Robert E. Krieger Publishing Company, Huntington, New York, USA. pp. 166 – 197.
- **BARTON, M.; MORRIS, D.** 1998. Diseases of the Liver. **In:** Reed, S. and Bayly, W. *Equine Internal Medicine.* Editorial W.B. Saunders, Philadelphia, USA. pp. 707 – 738.
- **BILLER, D.** 2000. Equine Abdominal Ultrasound. **In:** *XI Congreso Nacional de Medicina Veterinaria.* 25 – 27 Octubre, Santiago, Chile. [en línea]
<<http://www.veterinaria.uchile.cl/publicacion/congresoxi/>>
[Consulta: 01 – 07 – 2005]
- **BLOOD, D.; RADOSTITS, O.** 1992. Enfermedades de hígado y páncreas. **In:** *Medicina Veterinaria,* 7^a ed. Nueva Editorial Interamericana, Distrito Federal, México. pp. 315 – 325.

- **BRAET, F.; WISSE, E.** 2002. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *Comp. Hepatol.* 1(1): 1 – 17.
- **BRAUN, J.; RICO, A.; BENARD, P.** 1983. Reference values clinical biochemistry for dogs and rats. **In:** *Research and results in clinical chemistry of domestic animals.* Contribution to the first international conference of the ACB. Editado por H. Summer, Schwabisch Hall, Alemania. pp. 208 – 214.
- **BRUGMANS, F.; VENNER, M.; MENZEL, D.; MISCHKE, R.** 1998. Determination of fibrinogen levels in the horse with the heat-precipitation methods of Schalm and Millar. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 105(2): 58 – 61.
- **BYARS, T.** 2003. Liver Disease: Contributions to Diagnosis and Prognostic Aids. *Equine Vet J.* 35(6): 522 – 523.
- **CAMPBELL, M.; BELLAMY, E.; SEARCY, G.** 1981. Determination of plasma fibrinogen concentration in the horse. (Abstract) *Am J Vet Res.* 42.
- **CHIANG, J.** 1998. Regulation of bile acids synthesis. *Frontiers in Bioscience* 3: 176 – 193.
- **COPPO, J.; MUSSART, N.** 2000. Apoyatura bioquímica al diagnóstico veterinario. Casuística registrada tras 25 años de funcionamiento de un servicio de análisis clínicos. *Rev. Vet.* 11: 34 – 38.
- **COPPO, J.** 2001. *Fisiología Comparada del Medio Interno.* Editorial Dunken, Buenos Aires, Argentina. 297 p.
- **CROMWELL, G.** 1997. Copper as a nutrient for animals. **In:** Richardson, H. *Handbook of Cooper Compounds and Applications.* Editorial Marcel Dekker, Nueva York, USA. pp. 117 – 202.

- **DHAINAUT, J.; MARIN, N.; MIGNON, A.; VINSONNEAU, C.** 2001. Hepatic response to sepsis: Interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med.* 29 (7): 42 – 47.
- **DODDS, J.** 1993. Desordenes hemostáticos. **In:** August, J. *Consultas en Medicina Interna Felina.* Editorial Inter-Médica, Buenos Aires, Argentina. pp. 407 – 418.
- **DODDS, J.** 1997. Hemostasis. **In:** Kaneko, J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 5ª ed. Editorial San Diego, California, USA. pp. 241 – 280.
- **DURHAM, A.; SMITH, K.; NEWTON, J.; HILLYER, M.; HILLYER, L.; SMITH, M.; MARR, C.** 2003a. Development and application of a scoring system for prognostic evaluation of equine liver biopsies. *Equine Vet J.* 35(6): 534 – 540.
- **DURHAM, A.; SMITH, K.; NEWTON, J.; HILLYER, M.; HILLYER, L.; SMITH, M.; MARR, C.** 2003b. Retrospective analysis of historical, clinical, ultrasonographic, serum biochemical and haematological data in prognostic evaluation of equine liver disease. *Equine Vet J.* 35(6): 542 – 547.
- **DURHAM, A.; SMITH, K.; NEWTON, J.** 2003c. An evaluation of diagnostic data in comparison to the results of liver biopsies in mature horses. *Equine Vet J.* 35(6): 554 – 559.
- **DYCE, K.; SACK, W.; WENSING, C.** 2002. *Veterinary Anatomy.* 3ª ed. Editorial W.B. Saunders, Philadelphia, USA. pp. 529 – 550; 690; 794.
- **FARVER, T.** 1997. Concepts of normality in clinical biochemistry **In:** Kaneko, J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 5ª ed. Editorial San Diego, California, USA. pp. 1 – 18.
- **FRAPPIER, B.** 1998. Digestive System. **In:** Dellmann, H.; Eurell, J. *Textbook of Veterinary Histology.* 5ª ed. Editorial Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. pp. 164 – 202.

- **FRY, M.; WALKER, N.; BLEVINS, G.; TABLIN, F.** 2001. Defective platelet collagen signaling in a thoroughbred filly. **In:** American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) 36th Annual Meeting. In conjunction with the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) 52nd Annual Meeting. December 1–5, Salt Lake City, Utah. USA. [en línea]
 < http://www.vetclinpathjournal.org/VOL30_OPEN/2001ASVCP.pdf >
 [Consulta: 24 – 01 – 06]

- **GENTRY, P.; CHRISTOPHER, M.** 2001. Determination of prothrombin in feline plasma. *Vet Clin Pathol.* 30(2): 53 – 56.

- **GERBER, H.; TSCHUDI, P.; STRAUB, R.** 1975. Normal values for different breeds of horses. **In:** *Proceedings of the First International Symposium of Equine Hematology.* 28-30 May. Michigan State University, Michigan, USA. pp. 266 – 275.

- **GERLACH, K.; FERGUSON, J.** 2003. Laparoscopic Ultrasound in the Evaluation of Abdominal Structures in the Horse. **In:** *Recent Advances in Laparoscopy and Thoracoscopy.* Editorial Wilson D.G. Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada. [en línea]
 < http://www.ivis.org/advances/Laparoscopic_Ferguson/gerlach/chapter.asp?LA=1 >
 [Consulta: 28 – 07 – 2005]

- **GLASINOVIC, J.** 2001. Apuntes de Fisiopatología de Sistemas. Escuela de Medicina Curso Integrado de Clínicas Medico-Quirúrgicas - Mec-231a – 2001. [en línea]
 <<http://escuela.med.puc.cl/paginas/Cursos/tercero/IntegradoTercero/ApFisiopSist/gastro/HipertesionPortal.html>>
 [Consulta: 05 – 05 – 2005]

- **GOSSETT, K.; FRENCH, D.** 1984. Effect of age on liver enzyme activities in serum of healthy quarter horses. *Am J Vet Res.* 45 (2): 354 – 356.
- **GUMUCIO J.** 1983. Functional and anatomic heterogeneity in the liver acinus: impact on transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 244(6): 578 – 582.
- **HARRIS, P.; FRAPE, D.; JEFFCOTT, L.; LUCAS, D.; SAVAGE, C.** 1995. Equine nutrition and metabolic diseases. **In:** Higgins, A.; Wright, I. *The Equine Manual*. Editorial W.B. Saunders, London, UK. pp. 123 – 186.
- **HARVEY J.; ASQUITH R.; MCNULTY P.; KIVIPELTO J.; BAUER J.** 1984. Haematology of foals up to one year old. *Equine Vet J.* 16(4): 347 – 353.
- **HOFFMANN, W.; BAKER, G.; RIESER, S.; DORNER, J.** 1987. Alteration in selected serum biochemical constituents in equine after induced hepatic disease. *Am J Vet Res.* 48(9): 1343 – 1347.
- **IRVINE, C.** 1958. The blood picture in the racehorse. The normal erythrocyte and hemoglobin status. A dynamic concept. *J Am Vet Med Assoc.* 133(1): 97 – 101.
- **JERÉZ, M.** 1978. Valores hematológicos, proteína total y fibrinógeno en el equino fina sangre carrera en training. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria. 22 p.
- **JOHNSTON, J.** 1998. Enfermedades del Hígado. **In:** Colahan, P., Mayhew, I. , Merritt, A., Moore, J. *Medicina y Cirugía Equina.* 4ª ed. Editorial Inter.-Médica. Buenos Aires, Argentina. pp. 635 – 642.
- **JUNGERMANN, K.; KATZ, N.** 1989. Functional Specialization of Different Hepatocyte Populations. *Physiol Rev.* 69(3): 708 – 751.

- **KAESE, H.; VALBERG, S.; HAYDEN, D.; WILSON, J.; CHARLTON, P.; AMES, T.; AL-GHAMDI, G.** 2005. Infarctive purpura hemorrhagica in five horses. *J Am Vet Med Assoc.* 226 (11): 1893 – 1898.

- **KANEKO, J.; HARVEY, J.; BRUSS, M.** 1997. Appendixes. Blood analyte reference values in large animals. **In:** Kaneko, J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 5^a ed. Editorial San Diego, California, USA. pp. 890.

- **KLEIN, D.; LICHTMANNEGGER, J.; HEINZMANN, U.; MULLER-HOCKER, J.; MICHAELSEN, S.; SUMMER, K.** 1998. Association of Copper to Metallothionein in Hepatic Lysosomes of Long-Evans cinnamon (LEC) rats during the development of hepatitis. *Eur J Clin Invest.* 28(4): 302 – 310.

- **LAKRITZ, J.; WINDER, B.; NOOROUZ-ZADEH, J.; HUANG, T.; BUCKPITT, A.; HAMMOCK, B.; PLOPPER, C.** 2000. Hepatic and pulmonary enzyme activities in horses. *Am J Vet Res.* 61(2): 152 – 157.

- **MAMMEN, E.** 1992. Coagulation abnormalities in liver disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* 6(6): 1247 – 1257.

- **MORITZ, A.; FICKENSCHER, Y.; MEYER, K.; WEISS, D.** 2004. Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. *Vet Clin Pathol.* 33: 32 – 38.

- **NAGANO, K.; NAKAMURA, K.; URAKAMI, K.; UMEYAMA, K.; UCHIYAMA, H.; KOIWAI, K.; HATTORI, S.; YAMAMOTO, T.; MATSUDA, I.; ENDO, F.** 1998. Intracellular distribution of the Wilson's disease gene product (ATPase7B) after in vitro and in vivo exogenous expression in hepatocytes from the LEC rat, an animal model of Wilson's disease. *Hepatology* 27(3): 799 – 807.

- **OIKAWA, M.; YAMAOKA, S.** 2003. Clinical, hematological, and biochemical analysis of experimental endotoxemia in thoroughbred horses. *J Equine Sci.* 14(1): 5 – 12.
- **OUELLETTE, A.; EVANS, R.; HEATH, M.** 2004. Platelets enhance endotoxin-induced monocyte tissue factor (TF) activity in the horse. *Res Vet Sci.* 76: 31 – 35.
- **PARRAGA, M.; CARLSON, G.; THURMOND, M.** 1995. Serum protein concentrations in horses with severe liver disease: a retrospective study and review of the literature. *J Vet Int Med.* 9(3): 154 – 161.
- **PEEK S.; DIVERS T.** 2000. Medical treatment of cholangiohepatitis and cholelithiasis in mature horses: 9 cases (1991–1998). *Equine Vet J.* 32(4): 301 – 306.
- **PITA, S.; PÉRTEGA, S.** 2001. Significancia estadística y relevancia clínica. *Cad Aten Primaria* 8: 191 – 195.
- **PLESSIER, A.; DENNINGER, M.; CONSIGNY, Y.; PESSIONE, F.; FRANCOZ, C., DURAND, F.; FRANCQUE, S.; BEZEAUD, A.; CHAUVELOT-MOACHON, L.; LEBREC, D.; VALLA, D.; MOREAU, R.** 2003. Coagulation disorders in patients with cirrhosis and severe sepsis. *Liver International* 23(6): 440 – 448.
- **RAMM, G.; CARR, S.; BRIDLE, K.; LI, L.; BRITTON, R.; CRAWFORD, D.; VOGLER, C.; BACON, B.; TRACY, T.** 2000. Morphology of liver repair following cholestatic liver injury: resolution of ductal hyperplasia, matrix deposition and regression of myofibroblasts. *Liver* 20(5): 387 – 396.
- **RAPPAPORT, A.** 1976. The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. (Abstract). *Beitr Pathol.* 157.

- **RATNOFF, O.; MENZIE A.** 1957. A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. (Abstract). *J Lab Clin Med.* 37.

- **RÍOS, C.; CASTRO, M.; RUDOLPH, W.; BERNAL, A.** 2002. Efecto de dos dietas alimenticias sobre la concentración sérica de ácidos biliares en suero sanguíneo de equino. [en línea] *Red Veterinaria* 19(3).
<<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n19161202.html>>
[Consulta: 04 – 04 – 2005]

- **ROSE, R.; HODGSON D.** 1995. *Manual Clínico de Equinos.* Nueva Editorial Interamericana, Atlampa, México, D.F. pp. 241 – 247; 296 – 301.

- **RUDOLPH, W.; PLANELLA, J.; BERNAL, A.; CORREA, J.; SALAZAR, J.** 1998. Variaciones diurnas de los ácidos biliares totales sanguíneos en el equino: efectos del ayuno. *Av. Cs. Vet.* 13(1): 16 – 20.

- **SCHALM, O.; JAIN, N.; CARROLL, E.** 1975. *Veterinary Hematology*, 3^a ed. Editorial Lea & Febiger, Philadelphia, Pennsylvania, USA. pp. 807.

- **SCHWARZWALD, C.; FEIGE, K.; WUNDERLI-AlLENSPACH, H.; BRAUN, U.** 2002. Comparison of pharmacokinetic variables for two low-molecular-weight heparins after subcutaneous administration of single dose to horses. *Am J Vet Res.* 63(6): 868 – 873.

- **SMITH, B.** 1983. Chronic Liver Disease **In:** Robinson, N. *Current Therapy in Equine Medicine.* Editorial W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA. pp. 251 – 252.

- **SPEE, B.; MANDIGERS, P.; ARENDS, B.; BODE, P.; VAN DEN INGH, T.; HOFFMANN, G.; ROTHUIZEN, J.; PENNING, L.** 2005. Differential expression of copper-associated and oxidative stress related proteins in a new variant of copper toxicosis in Doberman pinschers. *Comp Hepatol.* 4(3): 1 – 13.

- **SU, G.** 2002. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 283: 256 – 265.

- **SUNDERMAN, W.** 1975. Current concepts of “normal values,” “reference values,” and “discrimination values” in clinical chemistry. *Clin Chem.* 21(13): 1873 – 1877.

- **TAMZALI, Y.; GUELFY, J.; BRAUN, J.** 2001. Plasma fibrinogen measurement in the horse: comparison of Millar's technique with a chronometric technique and the QBC-Vet Autoreader™. *Res Vet Sci.* 71: 213 – 217.

- **TENNANT, B.** 1997. Hepatic Function **In:** Kaneko, J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 5ª ed. Editorial San Diego, California, USA. pp. 327 – 349.

- **VAN DEN INGH, T.** 2004. Chronic Hepatitis and Cirrhosis in Domestic Animals **In:** 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists (ACVP) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP), ACVP and ASVCP (Eds.) [en línea]
 <http://www.ivis.org/proceedings/ACVP/2004/vandenIngh/chapter_frm.asp?LA=1>
 [Consulta: 07 – 07 – 2005]

MATERIAL COMPLEMENTARIO

Anexo N°1: Comparación de rangos de referencia para Fb entregados en literatura según autor, técnica utilizada y número de animales (Tamzali *et al.*, 2001).

Nº de animales y edad	Técnica	Rango	Referencia
24	Precipitación por calor + refractometría	133 ± 99	Blaisdell y Dodds, 1977
Desconocido	Precipitación por calor + centrifugación	100 - 400	Larkin, 1987
Desconocido	Precipitación por calor + centrifugación	200 - 450	Morris y Beech, 1983
15	Precipitación por calor + centrifugación	280 - 531	Campbell <i>et al.</i> , 1981
6 (<6 meses)	Proteína coagulable + biuret	325 ± 40	Brugmans <i>et al.</i> , 1998
40 (3 – 19 años)	Proteína coagulable + biuret	286 ± 65	Brugmans <i>et al.</i> , 1998
13 (> 19 años)	Proteína coagulable + biuret	252 ± 46	Brugmans <i>et al.</i> , 1998
24	Proteína coagulable + biuret	633 ± 271	Blaisdell y Dodds, 1977
39 (2 años)	Proteína coagulable + colorimetría	482 ± 43	Takagi <i>et al.</i> , 1974
85 (4 – 25 años)	Inmunonefelometría	125 - 214	Richard <i>et al.</i> , 1994
10 adultos	Cronometría	151 ± 29	Henry y Moore, 1991

Anexo N°2: Comparación de rangos de referencia para Fb entregados en literatura según autor y número de animales.

N° de animales y edad	Rango	Referencia
60	224 a 396 mg/dl	Jeréz, 1978
32	100 a 400 mg/dl	Andrews <i>et al.</i> , 1992
Desconocido	100 a 400 mg/dl	Kaneko <i>et al.</i> , 1997
Desconocido	65 a 180 mg/dl	Fry <i>et al.</i> , 2001

Anexo N°3: Ficha de registro para equinos en estudio.

FICHA DE REGISTRO

NOMBRE :

FECHA DE NAC. :

MADRE :

PADRE :

ORIGEN :

SEXO				PESO	(kg.)
Entrenamiento	SI			NO	
					Describe
Enfermedades Pre-Existentes	SI		NO		
Tratamientos Previos	SI		NO		

N° Ficha:

EXAMEN CLÍNICO

Actitud			
Mucosas			
Temperatura		Flujo yugular	
F.C.		F.R.	
T.L.L.C.		Pliegue Cutáneo	

▪ SISTEMA CARDIOVASCULAR:

Bloqueos	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	
Soplos	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	

Calidad Del Pulso	Fuerte	<input type="checkbox"/>	Moderada	<input type="checkbox"/>	Débil	<input type="checkbox"/>	Ausente	<input type="checkbox"/>
-------------------	--------	--------------------------	----------	--------------------------	-------	--------------------------	---------	--------------------------

▪ SISTEMA RESPIRATORIO:

					Describe
Auscultación					
Descarga Nasal	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	

▪ SISTEMA TEGUMENTARIO:

					Describe
Pelaje: Normal	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	
Ectoparásitos	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	
Lesiones	SI	<input type="checkbox"/>	NO	<input type="checkbox"/>	

N° Ficha:

▪ SISTEMA GASTROINTESTINAL:

Diarrea	SI		NO		
Sonidos Intestinales	SI		NO		
Distensión Abdominal	SI		NO		

▪ SISTEMA MUSCULO ESQUELETICO:

Articulaciones Inflamadas	SI		NO		
Espalda/Lomo (dolor)	SI		NO		

▪ OBSERVACIONES:

IMPRESIÓN GENERAL: _____

N° Ficha:

EXAMEN HEMATOLÓGICO

HEMOGRAMA:

	RESULTADOS		Intervalo de referencia
Eritrocitos			6.000.000-12.000.000
Hemoglobina		(g %)	10-18
V.G.A		(%)	32-48
V.C.M		(ft)	34-58
C.H.C.M		(g%)	31-37
Leucocitos		(mm ³)	6.000-12.000
Neutrófilos		(mm ³)	3000-6000
Linfocitos		(mm ³)	1500-5000
Monocitos		(mm ³)	0-600
Eosinófilos		(mm ³)	
V.H.S			
Plaquetas		(mm ³)	100.000-600.000
Observaciones			

PERFIL BIOQUÍMICO:

AST (GOT)		U/L	226,0 - 366,0
GGT		U/L	4,3 - 13,4
Bilirrubina total		mg/dl	0,3 - 3,0
Bilirrubina directa		mg/dl	0,2 - 2,0

EJEMPLAR CLÍNICAMENTE SANO: SI: NO:

N° Ficha:

PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD HÉPÁTICA:

Fibrinógeno (Fb)		(mg/dl)	100-400
Tiempo de Protrombina (TP)		(Seg.)	9,7 - 12,1
Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (TTPA)		(Seg.)	3,3-36,0