



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**“DESCRIPCIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE ÁCIDOS BILIARES  
EN CANINOS CON INSUFICIENCIA HEPÁTICA”**

**JACQUELINE ANDREA FIGUEROA CARRAHA**

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

**Profesor guía Dra. Alicia Valdés  
Departamento de Ciencias Clínicas**

**SANTIAGO – CHILE**

**AÑO 2006**



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

## “DESCRIPCIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE ÁCIDOS BILIARES EN CANINOS CON INSUFICIENCIA HEPÁTICA”

JACQUELINE ANDREA FIGUEROA CARRAHA

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

Nota Final: \_\_\_\_\_

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA:	ALICIA VALDÉS	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO:	SONIA ANTICEVIC	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO:	ANA MARÍA RAMIREZ	_____	_____

SANTIAGO – CHILE

AÑO 2006

A MIS PADRES Y ABUELOS  
QUE ME HAN DADO TODO Y A SEBASTIÁN  
POR TODO SU AMOR Y COMPRENSIÓN.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que todo quisiera agradecer a la Dra Alicia Valdés por su ayuda y tiempo dedicado a la realización de esta investigación.

Además, al Dr Gustavo Montes (Q.E.P.D) por apoyarme y orientarme en la búsqueda de información, por aclarar mis dudas en los momentos necesarios, y por ayudarme en el análisis de mis muestras.

A Mary y Don Fernando, por otorgarme sus conocimientos y ayuda en todo lo necesario para analizar mis muestras de sangre.

A la Dra Ana María Ramirez por su amabilidad para contestar mis preguntas y por su ayuda en el análisis de mis muestras.

Al Dr Javier Green, Dra Nora Chován, Dr Gallegos y Dra Paloma Moreno, por su constante preocupación en la recolección de mis pacientes; gracias!!, a ustedes les debo la mayoría.

A mi familia y a Sebastián por apoyarme siempre y darme la fuerza y el amor cuando todo se veía difícil.

A mis amigos Patricio Faúndez, Paulina Cáceres, Ivan Butorovic, Diego Flores y Rodrigo Fuentes por los momentos que vivimos durante estos años de estudio.

A mis perros: Pelusa, Nanook, Martin, Happy y Sejack, por su paciencia al dejarme practicar con ustedes y cariño que me dan siempre.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1.- INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	3
<b>2.1. ENFERMEDADES HEPÁTICAS FRECUENTES EN CANINOS</b>	3
2.1.1. ENFERMEDADES HEPÁTICA INFLAMATORIAS	3
2.1.2. ENFERMEDADES HEPÁTICAS NO INFLAMATORIAS	7
2.1.3. ENFERMEDADES DEL TRACTO Y VESÍCULA BILIAR	9
2.1.4. INSUFICIENCIA HEPÁTICA	10
<b>2.2. DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES HEPATOBILIARES</b>	12
2.2.1. ANAMNESIS Y EXAMEN FÍSICO	12
2.2.2. HEMOGRAMA	13
2.2.3. PERFIL BIOQUÍMICO	14
2.2.4. PRUEBAS DE COAGULACIÓN	19
2.2.5. URINANÁLISIS	20
2.2.6. ANÁLISIS FECAL	20
2.2.7. IMAGENOLOGÍA	21
2.2.8. HISTOPATOLÓGICO	23
2.2.9. PRUEBAS DE FUNCIONALIDAD HEPÁTICA	24
<b>2.3. ÁCIDOS BILIARES</b>	26
2.3.1. SÍNTESIS DE ÁCIDOS BILIARES	27
2.3.2. CONJUGACIÓN HEPÁTICAS	32
2.3.3. SECRECIÓN HEPÁTICA	34
2.3.4. CAPTACIÓN HEPÁTICA	35
2.3.5. CIRCULACIÓN ENTEROHEPÁTICA	36
2.3.6. VARIABLES QUE INFLUENCIAN LA CIRCULACIÓN ENTEROHEPÁTICA	39
2.3.7. MEDICIÓN SBA	41
2.3.8. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE SBA	42
<b>3.- OBJETIVOS</b>	44
<b>4.- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	45
<b>5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	49
<b>6.- CONCLUSIONES</b>	61
<b>7.- ANEXO: TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS DE UN PERFIL BIOQUÍMICO</b>	62
<b>8.- BIBLIOGRAFÍA</b>	64

## ÍNDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

<b><u>CUADROS</u></b>	
<b>CUADRO 1.1: Clasificación de los tumores más comunes que envuelven hígado</b>	8
<b>CUADRO 1.2: Causas de falla hepática en el perro y el gato</b>	11
<b>CUADRO 1.3: Síntesis del colesterol</b>	28
<b>CUADRO 1.4: Biosíntesis de ácidos biliares desde colesterol</b>	30
<b>CUADRO 1.5: Variables que influyen a la enzima 7<math>\alpha</math>-hidroxilasa</b>	31
<b>CUADRO 1.6: Efecto de la conjugación y no conjugación de los ácidos biliares en el pH de precipitación</b>	33
<b>CUADRO 1.7: Componentes del tubo blanco y de la muestra</b>	48
<b><u>TABLAS</u></b>	
<b>TABLA 1. Valores de hemograma obtenido de los pacientes control sano</b>	49
<b>TABLA 2. Valores de perfil bioquímico obtenido de los pacientes control sano</b>	50
<b>TABLA 3. Valores de hemograma obtenido de los pacientes con insuficiencia Hepática</b>	51
<b>TABLA 4. Valores diferenciales de leucocitos obtenidos de los pacientes con insuficiencia hepática</b>	52
<b>TABLA 5. Valores de perfil bioquímico obtenido de los pacientes con insuficiencia hepática</b>	53
<b>TABLA 6. Signos clínicos encontrados en pacientes con características de insuficiencia hepática, con sus frecuencia absolutas y relativas</b>	53
<b>TABLA 7. Signos clínicos observados en 3 individuos con encefalopatía hepática con sus frecuencia absolutas y relativas</b>	55
<b>TABLA 8. Hallazgos en los exámenes radiográficos y/o ecográficos de 8 pacientes con signología de insuficiencia hepática</b>	55
<b>TABLA 9. Valores de los ácidos biliares séricos en ayuno y posprandial en individuos sanos</b>	56
<b>TABLA 10. Valores de ácidos biliares séricos en ayuno y posprandial en individuos con signología de insuficiencia hepática</b>	57
<b>TABLA 11. Comparación entre los valores de un perfil bioquímico con ácidos biliares en ayuno y posprandial en individuos control</b>	59
<b>TABLA 12. Comparación entre los valores de un perfil bioquímico con ácidos biliares en ayuno y posprandial en individuos con insuficiencia hepática</b>	60

## RESUMEN

La identificación de insuficiencia hepática requiere de un amplio espectro de exámenes tanto físicos, de laboratorio y de imágenes. Entre ellas están las pruebas de funcionalidad que en la actualidad no son de uso rutinario en el país.

La prueba de ácidos biliares séricos detecta alteraciones mínimas en la funcionalidad hepática, es relativamente sencilla de realizar y no produce efectos colaterales en el paciente; por lo que actualmente es de uso masivo en varios países.

El presente estudio describió el comportamiento de los ácidos biliares en 5 caninos sanos y 11 caninos con signología de insuficiencia hepática. Se determinaron los valores de ácidos biliares séricos en todos los individuos. Se relacionaron con los resultados de pruebas estándares de perfil bioquímico.

Se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los valores de los ácidos biliares en ayuno entre los grupos control y enfermos, y entre los valores de ácidos biliares posprandiales entre los grupos control y enfermos.

Se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los valores de los ácidos biliares entre ayuno y posprandial dentro del grupo control; en cambio, dentro del grupo de los enfermos estas diferencias no fueron significativas ( $p > 0,05$ ).

Los valores del perfil bioquímico no se correlacionaron significativamente ( $p > 0,05$ ) con los valores de ácidos biliares en los individuos control.

Dentro de las determinaciones del perfil bioquímico destaca que las enzimas alanina amino transferasa y aspartato amino transferasa se relacionaron positiva y significativamente ( $p \leq 0,05$ ) con los valores de ácidos biliares en ayuno y posprandial en los individuos insuficientes hepáticos.

La prueba de ácidos biliares séricos sería una prueba de gran ayuda en el diagnóstico de insuficiencia hepática en caninos.

## **SUMMARY**



The identification of hepatic failure needs a high number of tests like physical exam, laboratory tests and images. Also there are functional tests of unusual use at this moment in our country.

The serum bile acids test can detect very small changes in normal hepatic function, it is very easy to perform and have no collateral effects in the patient; for these reasons it is commonly used in several countries.

The present study describes the behavior of bile acids in 5 healthy dogs and 11 dogs with hepatic failure. The determination of serum bile acids was taken in all the dogs and was related with biochemistry profile.

Differences in values of serum bile acids measurements in fasting patients were significant ( $p \leq 0,05$ ) between healthy and sick dogs and in postprandial values between healthy and sick dogs.

The differences were significant ( $p \leq 0,05$ ) between levels of fasting and postprandial bile acids inside control group; this does not occur in the sick group ( $p > 0,05$ ).

Values in the biochemistry profile of healthy dogs have not significant ( $p \leq 0,05$ ) correlation with values of bile acids.

In the biochemistry profile is important to emphasize the enzymes alanine aminotransferase and the aspartate aminotransferase because they have positive and significant ( $p \leq 0,05$ ) correlation with fasting and postprandial serum bile acids.

The serum bile acids test could be of great help in the diagnosis of hepatic failure in dogs.

## 1. INTRODUCCIÓN

El hígado es un órgano de vital importancia debido a la gran cantidad de funciones que realiza. Entre ellas se encuentra la detoxificación y excreción de variadas sustancias endógenas como el amoníaco y bilirrubina; y exógenas como metales pesados y antibióticos. Además juega un papel importante en la síntesis de proteínas sanguíneas como albúmina, proteínas de fase aguda y factores de la coagulación, almacena vitaminas liposolubles, y mantiene la glicemia entre otras funciones.

Debido a la gran capacidad de reserva hepática, la detección de una falla en su funcionalidad no es posible a través de métodos diagnósticos convencionales, hasta que un 55- 60% del parénquima hepático se ha perdido.

La identificación de una enfermedad hepática requiere la aplicación de un espectro amplio de pruebas de funcionalidad y otros exámenes, ya que no existe una prueba única que corrobore su presencia y que además pueda indicar si es una enfermedad primaria o secundaria.

La decisión de utilizar un determinado examen o prueba dependerá de una adecuada anamnesis y examen clínico, que detecten signos tan variables como anorexia, pérdida de peso, vómito, diarrea, ictericia y encefalopatía hepática.

Entre las pruebas de apoyo diagnóstico utilizadas con mayor frecuencia tenemos: hemograma, perfil bioquímico, urianálisis, análisis fecal, examen radiográfico y ecotomografía abdominal. Para determinar la funcionalidad hepática se sugiere que en el perfil bioquímico se mida el nivel de nitrógeno ureico sanguíneo (NUS), la concentración de albúmina sanguínea, y se realicen pruebas de coagulación sanguínea como el tiempo de protrombina.

Con todo, persiste la necesidad de generar una prueba diagnóstica de la funcionalidad hepática en forma precoz y más específica. Así, aparece en el último tiempo

la determinación de los ácidos biliares como un método más específico para determinar la funcionalidad hepática.

El hígado es el único órgano responsable del metabolismo, síntesis, conjugación, transporte y excreción de ácidos biliares, y su determinación se considera específica para este órgano. Los antecedentes de la literatura señalan que un aumento en la circulación de los ácidos biliares puede indicar una falla en la secreción de éstos hacia la bilis o a una alteración de su retorno hacia el hígado.

Por lo anteriormente expuesto, el presente trabajo describe el comportamiento de ácidos biliares en caninos con insuficiencia hepática, como una aproximación a nivel nacional, para la utilización de esta prueba en caninos.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 ENFERMEDADES HEPÁTICAS FRECUENTES EN CANINOS**

La hepatitis crónica en el perro comprende un espectro de enfermedades que comparten características similares, en cuanto a historia clínica y aspectos histopatológicos. Los animales afectados están enfermos por semanas o meses con signología de anorexia, pérdida de peso, letargia, poliuria, polidipsia, ictericia, efusión abdominal, signos de encefalopatía hepática, y tendencia a hemorragias (Bunch, 2003).

Las enfermedades hepáticas del canino se pueden agrupar en 3 tipos: enfermedades hepáticas inflamatorias, no inflamatorias y aquellas del tracto biliar y de la vesícula biliar (Richter, 1996).

Las enfermedades inflamatorias, a su vez se pueden dividir en no infecciosas e infecciosas. Las más frecuentes son las no infecciosas y dentro de ellas tenemos: hepatitis crónica activa, complejo colangiohepatitis, hepatopatías tóxicas y hepatitis por acúmulo de cobre. Las enfermedades infecciosas más comunes son: hepatitis bacterianas, virales, parasitarias o fúngicas (Richter, 1996).

Dentro de las enfermedades no inflamatorias tenemos: “shunts” o “cortocircuitos” portosistémicos (PSS), hepatopatía esteroideal, lipidosis hepática y neoplasias (Richter, 1996).

En las enfermedades del tracto biliar y de la vesícula biliar tenemos: colelitiasis, colangitis, colédocolitiasis y colecistitis (Richter, 1996).

#### **2.1.1. Enfermedades Hepáticas Inflamatorias**

Las enfermedades inflamatorias representan una de las manifestaciones más comunes de enfermedad hepática. El hígado se afecta comúnmente por enfermedades inflamatorias infecciosas y tóxicas, debido a su activa función reticuloendotelial, de

detoxificación de agentes absorbidos desde intestino. Además, el hígado por recibir una gran parte del gasto cardíaco es susceptible a infecciones hematógenas. También puede afectarse por reacciones inmunomediadas de tipo no infecciosas (Richter, 2003).

#### **2.1.1.1. Enfermedades Inflamatorias Infecciosas**

Las infecciones primarias que envuelven al hígado son causas raras de hepatitis en el perro y gato. El cultivo bacteriano positivo como evento secundario de enfermedad hepatobiliar, comúnmente ocurre por disminución de la función reticuloendotelial. Además de patógenos bacterianos pueden presentarse infecciones parasitarias y por hongos (Richter, 2003).

##### **2.1.1.1.1. Infecciones Hepatobiliares Bacterianas**

Debido al rol central del hígado en el procesamiento de productos portales, a su flujo sanguíneo arterial, a su función reticuloendotelial y, a que tiene conexión directa con el intestino vía tracto biliar, está sujeto a infecciones por muchas rutas, incluyendo la hematógena y ascendente por vía sistema biliar. Sin embargo, las infecciones bacterianas del hígado sólo ocurren bajo situaciones inusuales como es la inmunosupresión en pacientes que reciben este tipo de drogas (Richter, 2003).

##### **2.1.1.1.2. Infecciones Hepatobiliares Parasitarias**

Las infecciones parasitarias del hígado y tracto biliar se producen en ciertas áreas geográficas. Son más frecuentes en los gatos que en los perros por el consumo de huéspedes intermediarios. Los parásitos que producen infestaciones hepáticas y en el sistema biliar son: *Platynosomum*, *Heterobilharzia*, *Cytauxzoon*, *Opisthorchis*, *Amphimerus*, *Metorchis* y *Clonorchis* (Richter, 2003).

Por lo general, las parasitosis de poca densidad no promueven enfermedad clínica. Las infecciones masivas se pueden acompañar con enfermedad biliar crónica, como colangitis crónica y cirrosis biliar (Hardy, 1992).

### **2.1.1.1.3 Infecciones Hepatobiliares Fúngicas**

Las micosis sistémicas, incluyendo histoplasmosis, blastomicosis, coccidiomicosis, pueden afectar al hígado y, son reflejo de afecciones sistémicas que incluyen otros tejidos (pulmón, piel, tubo digestivo, etc) (Hardy, 1992; Richter, 2003).

### **2.1.1.2. Enfermedades Hepatobiliares Inflamatorias No Infecciosas.**

Son las enfermedades hepatobiliares más comunes de ver, desafortunada y comúnmente sus causas no son claras y se mantienen como entidades idiopáticas. Además de las enfermedades inflamatorias primarias, el hígado puede verse afectado secundariamente por patologías de otros órganos (Richter, 2003).

Debido a que el hígado recibe productos y toxinas gastrointestinales en el flujo portal, las enfermedades primarias que resultan en daño de la mucosa pueden llevar a mayor absorción de estos agentes a la circulación portal. Esto puede causar daño directo sobre el hígado (hepatopatía tóxica) o incitar reacciones inmunológicas llevando a inflamaciones hepáticas. Finalmente, anormalidades metabólicas como la enfermedad por acumulación de cobre también puede resultar en inflamación hepática (Richter, 2003).

#### **2.1.1.2.1. Hepatitis Crónica Activa**

Las enfermedades hepáticas inflamatorias crónicas son un grupo heterogéneo de trastornos que tienen en común un proceso necroinflamatorio crónico en el hígado. Las manifestaciones clínicas comunes comprenden: pérdida de peso, anorexia y letargia; y en los estadios avanzados: ictericia, ascitis, y encefalopatía hepática (Johnson, 1999).

Para algunos clínicos, este desorden no es una enfermedad específica sino que una reacción general del hígado ante cualquier lesión, con un patrón histológico de inflamación no específica (Richter, 2003).

Las potenciales causas comprenden agentes infecciosos, drogas, toxinas, desórdenes metabólicos e inmunomediados. La identificación de un diagnóstico etiológico específico se complica porque los rasgos histopatológicos de la hepatitis crónica en los perros son similares, más allá de la causa promotora (Johnson, 1999).

#### **2.1.1.2.2. Complejo Colangiohepatitis**

Es un desorden inflamatorio de los conductos biliares y hepatocitos adyacentes. Es más corriente en felinos pero puede darse en caninos. Debe considerarse como una enfermedad compleja consistente en colangitis, colangiohepatitis y cirrosis biliar. La etiología en perros y gatos se desconoce. La colangitis y colangiohepatitis se caracterizan por un infiltrado inflamatorio (supurativo versus linfocítico) dentro y alrededor de los conductos biliares. Cuando se detecta inflamación supurativa se sospecha de infección bacteriana, pero aún no está claro si éstas inician la colangitis o si su proliferación es secundaria a colestasis (Johnson, 1999).

#### **2.1.1.2.3. Hepatopatías Tóxicas**

Muchas drogas se han descrito como causantes de enfermedades hepáticas. Las drogas hepatotóxicas pueden clasificarse en: toxicosis intrínseca, las cuales causan daño hepático predecible, tienen alta incidencia de hepatotoxicidad, son dosis dependientes, y sus efectos pueden reproducirse experimentalmente en animales. Las toxicosis extrínsecas son reacciones idiosincrásicas caracterizadas por ocurrir en un pequeño porcentaje de pacientes, no son dosis dependiente y son el resultado de una inusual susceptibilidad de un paciente a una reacción adversa que puede ser una aberración metabólica, hipersensibilidad o eventos inmunomediados (Richter, 2002b).

Algunas drogas que causan enfermedades hepáticas son: acetaminofeno, esteroides anabólicos, drogas anticonvulsivantes, drogas antineoplásicas, carprofeno, diazepam, furosemida, griseofulvina, etc. (Richter, 2002b).

#### **2.1.1.2.4. Hepatitis por acúmulo de cobre**

Consiste en un error metabólico que lleva a la acumulación de cobre en los tejidos como resultado de una falla en su excreción biliar. Es una enfermedad hereditaria, atribuida a un gen recesivo autosomal que tendría mayor presentación en ciertas razas como: Bedlington Terriers, Doberman Pinscher, West Highland White Terrier, Sky Terrier y Dálmatas (Bunch, 2003).

### **2.1.2. Enfermedades Hepatobiliares No Inflamatorias**

Las enfermedades hepatobiliares no inflamatorias del hígado incluyen anomalías vasculares (“shunt” portosistémico, hipoplasia de la vena porta), desórdenes metabólicos (lipidosis hepática, hepatopatía esteroideal, enfermedad acumuladora de glucógeno, amiloidosis hepática, deficiencia enzimática del ciclo de la urea, acumulación férrica anormal y neoplasias hepáticas (Richter, 2003).

#### **2.1.2.1. Shunt portosistémico (PSS)**

Es una anomalía vascular en que la sangre fluye desde las vísceras abdominales hacia el corazón, sin pasar por los sinusoides hepáticos; llevando los productos absorbidos en intestino a la circulación sistémica. Los “shunt” portosistémicos puede clasificarse como intrahepáticos o extrahepáticos, simples o múltiples, y como congénitos o adquiridos. Estos “shunts” pueden conectar la vena porta con la vena cava caudal, o pueden originarse de una vena tributaria de la porta, como la vena gástrica izquierda (Tobias, 2002).

#### **2.1.2.2. Hepatopatía esteroideal**

Es una secuela común de la corticoterapia en perros. Esto ocasiona hepatomegalia por la acumulación de glicógeno dentro de los hepatocitos. Ha sido asociado con



numerosos glucocorticoides (ejemplo: cortisona, triamcinolona, prednisona, prednisolona, dexametasona) en posologías variables (Johnson, 1999).

La probabilidad que un paciente en forma individual desarrolle una hepatopatía esteroideal después de la administración de glucocorticoide es variable y depende de la sensibilidad individual, tipo, ruta y duración de la administración (Richter, 2003).

El aspecto clínico más importante es que se trata de un desorden benigno y reversible no confundible con enfermedades hepáticas más graves (Johnson, 1999).

### **2.1.2.3. Neoplasia hepática**

Los tumores primarios son un 0.6% a 1.3% de todas las neoplasias en perros. Las neoplasias hepáticas primarias más comunes en el perro, en orden decreciente, son: hepatoma, carcinoma hepatocelular, colangiosarcoma (carcinoma del ducto biliar), fibroma, fibrosarcoma, hemangioma, hemangiosarcoma. Los tumores metastásicos ocurren con el doble de frecuencia que los primarios (Richter, 2003).

Los tumores que envuelven el hígado pueden dividirse en 3 categorías (Cuadro 1.1) tumores hepáticos primarios, tumores hemolinfáticos que envuelven el hígado y carcinomas y sarcomas que metastizan hacia el hígado (Hammer y Sikkema, 1995).

Las metástasis al hígado pueden ocurrir por vía porta, arteria hepática, vía linfática o por extensión directa. Las metástasis al hígado por vía hematológica provienen desde el tracto gastrointestinal, páncreas, adenocarcinoma mamario y hemangiosarcoma de bazo. Además, es común que el hígado se vea afectado ante desórdenes hemolinfáticos, como linfoma, desórdenes mieloproliferativos, y neoplasia de células mastocitarias (Bunch, 2003).

**Cuadro 1.1: Clasificación de los tumores más comunes que envuelven hígado.**

<b>Neoplasia hepática primaria</b>	<b>Neoplasia Hemolinfática</b>	<b>Neoplasia metastásica</b>
Carcinoma hepatocelular	Linfoma	Hemangiosarcoma
Carcinoma biliar	Leucemia	Carcinoma pancreático
Hemangiosarcoma	Tumor células mastocitarias	Fibrosarcoma
Adenoma hepático	Mieloma	Osteosarcoma
Adenoma biliar	Timoma	Carcinoma células transicionales
Fibrosarcoma		Carcinoma intestinal
Leiomiomasarcoma		Carcinoma células renales
Hemangioma		Feocromocitoma
		Carcinoma mamario

(Hammer y Sikkema, 1995).

#### **2.1.2.4. Lipidosis hepática canina**

La lipidosis hepática en el perro cursa con enfermedad hepática clínica. Con frecuencia acompaña a la diabetes mellitus y lesiones tóxicas o medicamentosas. También es inducido por inanición, desnutrición (incluida la insuficiencia pancreática exocrina), obesidad, hipotiroidismo e hipoxia (Johnson, 1999).

#### **2.1.3. Enfermedades del tracto y vesícula biliar**

Los desórdenes del tracto biliar generalmente se clasifican como enfermedades primarias originadas en el tracto biliar o enfermedades de otros órganos que secundariamente afectan al tracto biliar. Las causas secundarias más comunes son pancreatitis y sepsis. Las condiciones primarias que afectan los ductos biliares (colangitis) y a veces la vesícula biliar (colecistitis) son más comunes en gatos que en perros (Bunch, 2003).

### **2.1.3.1. Colelitiasis y Colédocolitiasis**

Los colelitos son raros en perros y gatos, y la etiología es poco conocida. La mayoría de las teorías implican éstasis biliar, infección y cambios en la composición biliar. Los colelitos en perros y gatos contienen primariamente colesterol y bilirrubina, y como componentes anexos se encuentran calcio, magnesio y oxalato. La colelitiasis es asintomática hasta que se asocia con colecistitis u obstrucción del flujo biliar (Richter, 2003).

### **2.1.3.2. Colecistitis**

Es rara en perros y gatos. Los factores predisponentes incluyen colelitiasis, éstasis biliar, infección del tracto biliar ascendente y bacteremia con colangitis y colecistitis secundaria. La colecistitis se asocia comúnmente con obstrucción del ducto biliar parcial o total. Cuando es necrotizante, casi siempre resulta en ruptura de la vesícula biliar crónica o aguda con peritonitis biliar secundaria (Richter, 2003).

### **2.1.4. Insuficiencia Hepática**

Se produce frente a variadas patologías que llevan a un daño masivo del hígado, comprometiendo al menos un 70% de la masa hepática funcional. El hallazgo histopatológico más común es la necrosis hepática difusa (Johnson y Sherding, 1998).

Entre las causas de insuficiencia hepática tenemos procesos metabólicos, neoplásicos, infecciosos, tóxicos, etc. En el cuadro 1.2 se muestra una lista detallada de las causas de falla hepática en perros y gatos (Hughes y King, 1995).

**Cuadro 1.2: Causas de Falla Hepática en el perro y gato**

<b>Agentes químicos</b>	<b>Drogas</b>	<b>Agentes Infecciosos</b>	<b>Varios</b>
Arsénico	<b>Anestésico</b>  <b>/Sedantes</b>  Halotano  Metoxifluorano  Diazepam (Gatos)	<b>Viral</b>  PIF  Hepatitis infecciosa canina  Herpesvirus canino	<b>Neoplásicos</b>  Linfoma  Otros  Desórdenes mieloproliferativos
Tetracloruro de carbono			
Cloroformo			
Dimetilnitrosamina			
Metales pesados: cobre, fierro, mercurio	<b>Medicamentos</b>  Acetaminofeno  Ketoconazol  Mebendazol  Metotrexato  Ácido Nalidíxico	<b>Bacterianas</b>  Clostridiosis  Leptospirosis  Enfermedad de Tyzzer	<b>Otros</b>  Crisis aguda de la enfermedad por acumulación de cobre  Lipidosis hepática  Isquemia masiva
Fósforo			
Ácido Tánico			
Selenio			
<b>Biotoxinas</b>  Micotoxinas  Toxina del alga azul verdosa	Fenitoína  Primidona  Tetraciclina  Tolbutamida  Sulfa +  Trimetoprim	<b>Fúngicas</b>  Histoplasmosis	

(Hughes y King, 1995).

Los signos clínicos y exámenes de laboratorio son inespecíficos para el agente causal, pero reflejan la alteración de una o más funciones hepáticas (Bunch, 2003). Los signos clínicos más comunes son: debilidad, depresión, o colapso; signos gastrointestinales como anorexia, vómito o diarrea con o sin sangre; o signos neurológicos atribuibles a encefalopatía hepática. Entre otros están también la poliuria y la polidipsia o hemorragia excesiva (Hughes y King, 1995).

Los problemas más comunes de un perro con falla hepática están relacionados con la pérdida progresiva y crónica de la masa hepática funcional, hipertensión portal intrahepática (proveniente de una enfermedad hepatobiliar primaria), shunt portosistémico, o una combinación de estos factores (Bunch, 2003).

Epidemiológicamente, la insuficiencia hepática puede ocurrir en individuos de cualquier edad, raza, o sexo; ya que depende de la etiología que lo produzca. Por ejemplo, el “shunt” portosistémico congénito se produce con mayor frecuencia en animales menores de 1 año y, en perros de raza pura más que en los mestizos. El “shunt” portosistémico adquirido es más común en animales viejos, al igual que la neoplasia hepática (Richter, 2003).

## **2.2. DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES HEPATOBILIARES**

### **2.2.1. Anamnesis y examen físico**

Los signos clínicos de una enfermedad hepatobiliar son tan variables que van desde anorexia y baja de peso hasta efusión abdominal, ictericia y coma hepático (Yaphé, 2004).

En la anamnesis podemos encontrar signos inespecíficos que incluyen anorexia, náusea, diarrea, fiebre y constipación; los cuales están presentes desde el estado inicial de enfermedad hepatobiliar; o más crónicos como la baja de peso. También puede haber poliuria, polidpsia y fiebre intermitente (Yaphé, 2004).

Cuando hay una disfunción hepatobiliar más severa pueden presentarse ictericia, evidente en la coloración del suero, membranas mucosas y piel. El plasma se encuentra icterico cuando la concentración de bilirrubina sobrepasa los 1,5 mg/dl, y en los tejidos cuando la bilirrubina es mayor a 2,5 mg/dl (Bunch, 2003).

En este estado también podemos encontrar encefalopatía hepática, especialmente en pacientes con severa insuficiencia hepática y en casos de shunt portosistémico congénito. Los signos clínicos de la encefalopatía son desorientación, ataxia, agresión, presión de la cabeza contra objetos, convulsiones y amaurosis (Bunch, 2003).

Puede producirse tendencia a hemorragias debido a la deficiencia de la vitamina K, o también cuando se encuentra alterada la capacidad de síntesis de los factores de la coagulación (Yaphé, 2004).

Comúnmente podemos encontrar ascitis en perros con enfermedad hepatobiliar crónica. Esta puede ocurrir debido a hipertensión portal y a la hipoalbúminemia. La hipertensión portal se produce por la falla del flujo sanguíneo a través de los sinusoides hepáticos como ocurre en cirrosis e inflamación. La hipertensión portal intrahepática causa incremento de la síntesis de linfa y este exceso de linfa escurre desde la cápsula hepática hacia el peritoneo (Yaphé, 2004).

El tamaño hepático puede verse aumentado o disminuído. La microhepatia se asocia al shunt portosistémico congénito, a enfermedades hepáticas crónicas adquiridas como cirrosis o necrosis, o cuando ha disminuído la perfusión hepática. Por otro lado, encontramos hepatomegalia en presencia de inflamación, por causas infecciosas, metabólicas (acumulo de glicógeno o lípidos) o neoplásicas (Yaphé, 2004). En casos de enfermedad hepática aguda, el hígado puede estar aumentado de tamaño y doloroso (hepatodinia). Cabe recordar que en condiciones normales el hígado no puede ser palpado en perros y gatos (Tams, 2001).

### **2.2.2. Hemograma**

Son pocos los cambios en las células sanguíneas que nos indican que existe una enfermedad hepatobiliar (Bunch, 2003).

#### **2.2.2.1. Eritrocitos:**

La mayoría de los cambios ocurren en los eritrocitos, asociados a fragmentación, cambios en su tamaño o en la composición de su membrana celular. Puede observarse microcitosis en pacientes con falla hepática crónica y “shunt” portosistémico adquirido (Bunch, 2003).

Anemia normocítica normocrómica no regenerativa es común debido a múltiples factores como: disminución de la sobrevivencia de los eritrocitos y pérdidas sanguíneas (Yaphé, 2004); aunque, esto se describiría más comúnmente en el gato (Bunch, 2003).

#### **2.2.2.2. Leucocitos:**

Ocurren pocos cambios en los leucocitos de perros y gatos, excepto cuando existe un agente infeccioso como evento primario (histoplasmosis, colangitis bacteriana, leptospirosis), o cuando la infección es secundaria (sepsis por gram negativos en cirrosis, peritonitis biliar séptica) (Bunch, 2003).

#### **2.2.2.3. Trombocito:**

Puede ocurrir disminución de la función plaquetaria (trombocitopatía) o del número plaquetario (trombocitopenia) (Yaphé, 2004).

### **2.2.3. Perfil Bioquímico**

#### **2.2.3.1. Enzimas**

##### **2.2.3.1.1. Alanina aminotransferasa (ALT)**

Es una enzima específica del hígado en el perro y el gato. Se encuentra en mayores concentraciones en el citosol de las células del parénquima hepático por lo tanto, se encuentra aumentada ante una severa necrosis hepatocelular. El grado en que se produce este aumento no se encuentra correlacionado con la severidad del daño hepatocelular, sino con el número de hepatocitos envueltos (Rebar, 2003).

Los valores normales de la ALT en el suero canino es menor a 68 U/L (Kaneko, 1989). Aumentos leves a moderados de la ALT pueden ocurrir con desórdenes no hepáticos, como enfermedad inflamatoria gastrointestinal, falla cardíaca y anemia hemolítica (Rebar, 2003).

La vida media de ALT es menor a 24 horas según Maddisson (2001) y Tams (2001); y de 2 a 4 días según Rebar (2003). Dos a tres días después de una alteración

hepática los niveles llegan al máximo y vuelven a la normalidad en una a tres semanas; si la alteración hepática resuelve (Rebar, 2003).

Los niveles de la ALT pueden estar moderadamente elevados en animales con terapia anticonvulsivante, con glucocorticoides y con éstasis biliar (Maddison, 2001).

La actividad de la ALT es mayor en casos de hepatitis activa crónica, neoplasia hepática primaria, y necrosis hepática. Es común que los niveles sean normales o sólo haya un leve aumento en caso de PSS, cirrosis, y neoplasia metastásica (Richter, 2002a).

#### **2.2.3.1.2. Aspartato aminotransferasa (AST)**

Enzima presente en el citosol del hígado, corazón, músculo, y muchos otros órganos, por lo tanto es menos específica para el hígado (Yaphé, 2004).

En normalidad esta enzima en el suero de caninos no excede los 55 U/L (Kaneko, 1989). En una enfermedad hepática la actividad de la AST es paralela a la ALT. Cuando la actividad de la AST excede a la ALT, deben considerarse otras causa ajenas a la hepática (Richter, 2002a).

#### **2.2.3.1.3. Fosfatasa Alcalina (FA)**

Esta enzima se encuentra unida a las membranas del canalículo biliar y ductos biliares. Los valores normales en caninos no exceden los 159 U/L (Kaneko, 1989). Sus valores se encontrarán aumentados por cualquier condición que produzca colestasis, ya sea extra o intrahepática. La colestasis resulta en un incremento de la síntesis y regurgitación de enzima, desde el sistema biliar al suero (Maddison, 2001).

La FA no es específica del hígado, se encuentra también en hueso, placenta, intestino, riñón, y leucocitos (Rebar, 2003). Sin embargo, la vida media de la isoenzima intestinal, renal y de la placenta son tan pequeñas que es raro que ocurran incrementos por esos tejidos. Usualmente el aumento de la FA se debe a la isoenzima hepática u ósea. Los



glucocorticoides ya sea endógenos y exógenos pueden inducir una isoenzima específica que resulta en aumento de la FA en el perro (Maddison, 2001; Rebar, 2003).

La FA ósea aumenta con actividad osteoblástica, tumores óseos, osteomalacia y en hiperparatiroidismo. La actividad de la FA aumenta en cualquier enfermedad hepatocelular primaria que lleve a colestasis; siendo mayor el incremento en las patologías periportales comparado con los desórdenes centrolobulares (Richter, 2002a).

#### **2.2.3.1.3. Gamma Glutamyl Transferasa (GGT)**

Es una enzima unida a la membrana, en asociación con el epitelio del ducto biliar. Y junto con la FA indican colestasis. Los valores normales de esta enzima en el suero canino no excede los 8 U/L (Kaneko, 1989). Se ha sugerido que la GGT es de mayor utilidad que la FA, porque el aumento de la actividad de la GGT no está directamente inducida por los glucocorticoides y drogas como la primidona (Rebar, 2003).

Según Richter (2002a), existe un marcado aumento de la actividad de la GGT con la administración de glucocorticoides (o hiperadrenocorticismos) y con drogas como los anticonvulsivantes. Posee isoenzimas en muchos tejidos, pero sólo la que se encuentra en el hígado es importante (Richter, 2002a).

Pueden producirse elevaciones no específicas de la actividad de esta enzima por muchas causas: endotoxemia, septicemia, diabetes mellitus, hipotiroidismo, hipertiroidismo, hipertermia, etc. (Tams, 2001).

#### **2.2.3.2. Nitrógeno Ureico Sanguíneo (NUS)**

En el hígado, el amonio es metabolizado a urea, el principal desecho nitrogenado de los mamíferos. La sangre lleva la urea a los riñones para ser excretada. Cuando se reduce el flujo sanguíneo hepático, como en el caso de PSS congénito o adquirido, y con la disminución de la masa hepática funcional, se reduce la formación de urea con la consecuente disminución de los niveles circulantes del NUS (Rebar, 2003).

Aunque el hígado es el único tejido capaz de sintetizar urea, la concentración de urea sérica se afecta comúnmente por muchos factores no hepáticos. Entre estos factores está la prolongada restricción del consumo proteico, ya sea por anorexia o reducción intencional por motivos terapéuticos. Los valores normales del NUS en caninos se encuentra entre 10 y 30 mg/dl (Kaneko, 1989); estos, además pueden estar disminuidos en asociación con poliuria y polidipsia (Bunch, 2003).

#### **2.2.3.3. Proteínas Séricas**

La mayoría de las proteínas séricas se producen en el hígado, por lo tanto una enfermedad hepática severa puede causar hipoproteinemia predominantemente por hipoalbuminemia debido al cese de su producción. Debido a la larga vida media de las proteínas séricas (7 a 10 días), las alteraciones sólo se ven en enfermedad hepática crónica. (Rebar, 2003). Los valores normales de proteínas séricas en caninos va de 5.4 a 7.1 g/dl y los valores de la albúmina va de 2.6 a 3.3 g/dl (Kaneko, 1989) y la hipoalbuminemia ocurre cuando se ha perdido más del 70% de la función hepática y esto se ve más comúnmente en cirrosis y encefalopatía portosistémica; aunque puede ocurrir en necrosis difusa (Maddison, 2001).

Se deben descartar otras causa de hipoalbuminemia como pérdidas gastrointestinales, glomerulares, quemaduras cutáneas severas, malnutrición proteica, sangramientos, etc; antes de hablar de insuficiencia hepática (Maddisson, 2001; Bunch, 2003).

#### **2.2.3.4. Glucosa**

La glicemia normal en perros se encuentra entre 65 y 118 mg/dl (Kaneko, 1989) y la hipoglicemia es un evento inusual asociado con enfermedad hepatobiliar en el perro. La incapacidad de mantener niveles normales de glucosa séricos ocurre en animales con enfermedad hepatobiliar crónica, cuando sólo queda un 20% de la masa hepática funcional. Esta inhabilidad para mantener la glicemia normal se debe a la pérdida de hepatocitos y de su capacidad gluconeogénica y glicolítica; además de falla en la degradación de la insulina.

Puede haber hipoglicemia a causa de sepsis, insulinoma, hipoglicemia funcional y enfermedad de Addison, entre otras (Bunch, 2003).

#### **2.2.3.5. Colesterol**

Debido a que el hígado es fundamental en el metabolismo de los lípidos, la falla hepática influencia en gran medida los niveles lipídicos circulantes (Rebar, 2003). Los valores normales de colesterol total en caninos van de 135 a 270 mg/dl (Kaneko, 1989). El aumento de los valores de colesterol se observa en casos de severa colestasis intrahepática, que involucra los ductos biliares o en EBDO (obstrucción extrahepática del ducto biliar) debido a la falla en la excreción de colesterol libre hacia la bilis y la subsecuente regurgitación hacia la sangre. También se encuentra elevado en un gran número de enfermedades como pancreatitis, diabetes mellitus, hipotiroidismo, etc. (Bunch, 2003).

La concentración de colesterol total puede encontrarse disminuía en enfermedad hepatocelular crónica severa y en PSS congénito. Se cree que la hipocolesterolemia es un signo de alteración en la absorción intestinal y aumento del uso de colesterol para la síntesis de ácidos biliares cuando la recirculación enterohepática está alterada, como ocurre en el PSS (Bunch, 2003).

#### **2.2.3.6. Bilirrubina**

La bilirrubina se forma a partir de la destrucción de los eritrocitos senescentes, de otras hemoproteínas, y de enzimas como los citocromos. En las células de Küpffer del hígado, los eritrocitos senescentes son degradados a hemoglobina libre, y también se produce fagocitosis de hemoglobina circulante, que se encuentran unida a distintas proteínas transportadoras. La enzima hemoxigenasa cataboliza la hemoglobina a biliverdina, la cual se convierte en bilirrubina por la enzima biliverdina reductasa. Esta bilirrubina libre es liposoluble por lo tanto, puede atravesar la membrana celular para llegar a la circulación sanguínea, donde se une a la albúmina (Richter, 2002a). En el hígado ocurre conjugación de la bilirrubina con ácido glucurónico, pasando a llamarse bilirrubina conjugada. Luego, esta molécula es secretada por los hepatocitos pasando a formar parte de la bilis. Existen diferencias en la solubilidad de cada una de estas moléculas lo que les

permite cuantificarse individualmente. El suero de individuos normales posee pequeñas cantidades de bilirrubina conjugada y no conjugada (Sirois, 2002).

Aumentos en los niveles séricos de bilirrubina total pueden deberse a causas prehepáticas, intrahepáticas, o poshepáticas. Dentro de las causa prehepáticas tenemos la hemólisis, donde por la aumentada destrucción de eritrocitos se espera que más del 75% de la bilirrubina que se encuentre aumentada sea la no conjugada (Rebar, 2003).

La colestasis intrahepática lleva al aumento de la bilirrubina no conjugada y conjugada. Debido a colestasis posthepática predomina el aumento de la bilirrubina conjugada en más de un 75% (Rebar, 2003). Según Richter (2002a), los montos de la bilirrubina conjugada y no conjugada son variables en las tres categorías de hiperbilirrubinemia porque los eventos secundarios pueden cambiar las concentraciones en que se encuentran estas dos formas. Los valores normales de la bilirrubina total es de 0.1 a 0.5 mg/dl, de la bilirrubina libre o no conjugada es de 0.01 a 0.49 mg/dl y de la bilirrubina conjugada es de 0.06 a 0.12 mg/dl (Kaneko, 1989)

#### **2.2.4. Pruebas de Coagulación**

La mayoría de las proteínas de la coagulación, sus activadores e inhibidores, y las proteínas responsables de la fibrinólisis son sintetizadas o reguladas por el hígado. La tendencia a hemorragias puede desarrollarse en pacientes con severa insuficiencia hepática u obstrucción del ducto biliar mayor (Rebar, 2003).

Las coagulopatías son inusuales en pacientes con enfermedad hepatobiliar excepto por aquellos con falla hepática aguda, EBDO completo, o coagulación intravascular diseminada (DIC). Es frecuente la presencia de tiempos de tromboplastina parcial activado aumentados, degradación anormal de productos de la fibrina y concentración de fibrinógeno variable (Bunch, 2003).

### **2.2.5. Urianálisis**

Hallazgos comunes en el urianálisis de un individuo con enfermedad hepatobiliar es una excesiva bilirrubinuria en el perro y la presencia de bilirrubinuria en el gato; además de ausencia de urobilinógeno y presencia de cristales de biurato de amonio (Bunch, 2003).

El exceso de bilirrubina en la orina le da un color amarillo oscuro. En el perro, es normal que hayan pequeñas cantidades de bilirrubina en la orina debido a que el riñón puede conjugar bilirrubina y tiene un umbral bajo de excreción. En el gato, la bilirrubinuria es anormal debido a que no puede conjugarla y tiene un alto umbral de excreción. La bilirrubinuria precede a la hiperbilirrubinemia en el perro, en cambio en el gato la hiperbilirrubinemia precede a la bilirrubinuria (Bunch, 2003; Yaphé 2004).

La ausencia de urobilinógeno en la orina puede indicar que existe una EBDO o una ruptura vesical. Hay muchos factores que influyen la detección de urobilinógeno en la orina, y entre otros están: flora intestinal y el tiempo de tránsito gastrointestinal, función renal, pH urinario y exposición de la orina a la luz (Bunch, 2003).

El ácido úrico es un subproducto del metabolismo de las purinas, que el hígado convierte en alantoína. Cuando existe una insuficiencia hepática, el incremento de ácido úrico y amonio lleva a la formación de cristales y urolitos de biurato de amonio (Yaphé, 2004).

### **2.2.6. Análisis fecal**

El análisis fecal no ofrece información importante ante sospecha de enfermedad hepatobiliar, excepto por el cambio en su apariencia asociado a dos condiciones específicas: ausencia de pigmento biliar (fecas acólicas) que es consecuencia de un EBDO completo; y fecas de color anaranjado oscuro a café verdoso que reflejan un aumento en la producción y excreción de bilirrubina después de una marcada hemólisis (Bunch, 2003; Yaphé 2004).

## **2.2.7. Imagenología**

### **2.2.7.1. Radiografía**

La evaluación radiográfica del abdomen se utiliza para complementar los hallazgos del examen físico y, para confirmar las sospechas acerca del carácter y localización de la enfermedad hepatobiliar (Bunch, 2003). Las radiografías pueden ser útiles para confirmar hepatomegalia, microhepatia, o lóbulos hepáticos aumentados de volumen en forma asimétrica (Maddison, 2001). Al sospecharse de hepatomegalia debe tenerse cuidado frente a aumentos de volumen intratorácico asociados con inspiración profunda, severa efusión pleural, o pulmones hiperinsuflados que desplacen el hígado, dando una impresión errónea de hepatomegalia. Microhepatia es común de encontrar en PSS o enfermedad hepática severa crónica (Tams, 2001), aunque puede diagnosticarse erróneamente en hernia diafragmática y en herniación de los lóbulos hepáticos dentro del tórax (Bunch, 2003). También se producen aumentos de volumen focales en casos de neoplasia metastásica, hiperplasia o nódulos regenerativos. Cambios en la densidad radiográfica del hígado son raros y están usualmente asociados con infección hepática o biliar, causada por bacterias que forman gas o mineralización (cálculos biliares) (Bunch, 2003).

La radiografía contrastada es útil para la confirmación de masas hepáticas, colelitiasis, EBDO, PSS congénito, y otras enfermedades estructurales (Bunch, 2003).

Hay varias técnicas para evaluar el flujo sanguíneo hepático, incluyendo portografía mesentérica intraoperatoria, esplenoportografía percutánea y portografía arterial mesentérica craneal (Richter, 2003).

La portografía mesentérica intraoperatoria se indica cuando se desea confirmar la existencia, el número y localización y pronóstico de un PSS. Además si se identifica el PSS, la corrección quirúrgica puede realizarse durante el mismo procedimiento anestésico. Es de fácil realización porque no necesita equipo especial. Se realiza una laparotomía y se coloca un catéter en una vena mesentérica o yeyunal. Se coloca 0.5 a 1 ml de un medio de contraste ionizado y se obtiene una radiografía justo al final de la inyección. (Richter, 2003).

La esplenoportografía percutánea ofrece menor calidad de información pero ofrece la ventaja de no necesitar laparotomía. Requiere anestesia general o sedación profunda. Se localiza el bazo por palpación transabdominal, ultrasonografía o laparoscopia y se inyecta el medio de contraste ionizado a una velocidad de 1 a 2 ml por segundo. Se toman radiografías inmediatamente 10 segundos antes de terminar con la inyección. La portografía arterial mesentérica craneal es un excelente método para evaluar el flujo sanguíneo hepático. La técnica es menos invasiva pero requiere fluoroscopia y equipo especial de inyección (Richter, 2003).

#### **2.2.7.2. Ultrasonografía**

Generalmente la ultrasonografía otorga mayor información que la radiografía, en cuanto a evaluación del parénquima hepático y sistema biliar. También, podemos identificar cambios en la ecogenicidad del parénquima, ductos biliares, tamaño y contenido de la vesícula biliar, además de evaluar la vasculatura (Tams, 2001).

La ultrasonografía se ha convertido en una valiosa e importante ayuda para el diagnóstico de enfermedades hepatobiliares en perros y gatos. Esta técnica hace posible la caracterización de cambios estructurales que otras técnicas no detectaban y permite obtener biopsia hepática sin la necesidad de utilizar anestesia general (Bunch, 2003).

Se pueden identificar vasos anómalos intra o extrahepáticos en animales con evidencia clinicopatológica de enfermedad hepatobiliar crónica o PSS congénito (Bunch, 2003). Además permite la detección de enfermedades hepáticas difusas (cirrosis, lipidosis hepática, hepatopatía esteroideal, linfosarcoma etc) y focales (quistes, hematomas, abscesos, granulomas, nódulos regenerativos, neoplasmas primarios o metastásicos y pseudoquistes e infartos biliares) (Partington y Biller, 1995).

El uso de doppler color confirma la localización de vasos y la dirección del flujo sanguíneo en su interior. Además, la imagen con doppler provee evidencia importante de hipertensión portal intrahepática, permitiendo la evaluación de la velocidad y dirección del flujo portal (Bunch, 2003).

Hay 4 categorías de enfermedades vasculares hepáticas: congestión venosa hepática, hipertensión portal, PSS, malformaciones arteriovenosas que pueden diagnosticarse con la ayuda de la ultrasonografía (Partington y Biller, 1995).

### **2.2.8. Histopatológico**

Generalmente la aspiración o la biopsia hepática se requieren para la obtención de un diagnóstico definitivo y pronóstico de enfermedad hepatobiliar en perros y gatos. Este procedimiento no debe realizarse antes de obtener una adecuada anamnesis, examen físico del paciente y pruebas hepáticas correspondientes (Kerwin, 1995).

Recientes avances en métodos de biopsia y en imágenes hepáticas no invasivas han hecho de la biopsia hepática una herramienta rutinaria y esencial en el diagnóstico y manejo de pacientes con enfermedad hepática. Muchos tipos de enfermedad hepática son tratables, y un diagnóstico definitivo permite al clínico tomar decisiones adecuadas acerca del tratamiento específico. Además, la biopsia hepática permite determinar si la anomalía es reversible o irreversible, progresiva o estática, primaria o secundaria, y definir de forma más específica la terapia a utilizar (Richter, 2003).

Se indica tomar una biopsia cuando:

- Existe elevación persistente de enzimas hepáticas sobre un período de tiempo de semanas o meses.
- Existe ácidos biliares anormales en ayuno o posprandial, persistiendo por días o semanas.
- Existe disminución de los niveles séricos de albúmina, cuando otras causas de hipoalbuminemia han sido descartadas.
- Hallazgos clínicos como ascitis, ictericia, cambios radiográficos o ultrasonográficos, con o sin incremento de enzimas hepáticas.
- Para evaluar respuesta a tratamiento (Sevelius y Jönsson, 1996)

Importantes consideraciones deben contemplarse antes de realizar cualquier prueba invasiva entre ellas: estado físico del paciente, riesgo de hemorragia, falla en la reparación de heridas y tamaño hepático (Kerwin, 1995).



Las técnicas que se utilizan actualmente son: aspirado hepático (a ciegas y percutánea), biopsia hepática con aguja (a ciegas y percutánea), aspirado y biopsia con aguja guiado con ultrasonido, biopsia hepática transtorácica, biopsia hepática laparoscópica y biopsia hepática a través de celiotomía exploratoria (Kerwin, 1995).

## **2.2.9. Pruebas de Funcionalidad Hepática**

### **2.2.9.1. Bromosulfaleína (BSP)**

Esta prueba es un método efectivo para detectar enfermedad hepática. Se realiza administrando una tinción de bromosulfaleína en forma endovenosa, a una dosis de 5mg/kg y luego midiendo su concentración o calculando el porcentaje de retención plasmática, recolectada 30 minutos después de la inyección (lo normal es que sea <5% de retención). La BSP al igual que la bilirrubina, es tomada por los hepatocitos, conjugada y luego excretada en la bilis; sin embargo, se diferencia de esta última en que es conjugada con glutatión en lugar de ácido glucurónico (Richter, 2003).

La hiperbilirrubinemia puede alterar los valores de excreción de la tinción BSP, por lo tanto, no debe realizarse esta prueba en individuos ictericos. Aunque es poco común, la excreción de la tinción BSP puede estar normal en presencia de enfermedad hepática. La excreción de BSP puede estar aumentada por ingestión de comida, ejercicio, inducción enzimática de algunas drogas, y por hipoalbuminemia. La fiebre y la disminución del flujo sanguíneo (Ej. un paciente hipovolémico) puede demorar la excreción de BSP. La indocianina verde difiere de la BSP en que no necesita ser conjugada para excretarse (Richter, 2003).

### **2.2.9.2. Indocianina Verde (ICG)**

La indocianina verde es otra tinción que ha sido utilizada para evaluar la función hepática. Se metaboliza en forma similar al BSP, con la excepción que esta tinción no es conjugada en el hígado antes de ser excretada, y además tiene gran afinidad por las proteínas circulantes. En el gato, se prefiere esta prueba antes que la BSP (Center, 1992).

### **2.2.9.3. Tolerancia al Amonio**

Esta prueba consiste en medir la concentración de amonio sérico después de su administración oral o rectal. Se mide tomando una muestra de amonio plasmático en tiempo cero, luego se administra vía oral cloruro de amonio a una dosis de 90mg/kg, con un máximo de 3 gramos, treinta minutos después se toma una muestra de sangre para medir el nivel de amonio (Richter, 2003).

Se describe una prueba de tolerancia al amonio rectal que se realiza administrando 2ml/kg de una solución al 5% de cloruro de amonio en forma de enemas. Se obtiene una muestra de plasma 20 a 40 minutos después. Teóricamente, la administración rectal tiene ventajas sobre la oral, en no producir vómitos. Generalmente, la causa de vómito es la hiperamonemia y las mediciones de amonio son diagnósticas de falla hepática. En pacientes normales, debería haber pequeños o ningún aumento de la concentración plasmática de amonio después de la administración de cloruro de amonio (<32% de incremento) (Richter, 2003).

El manejo de las muestras de sangre para medir el amonio es crítico. La venipuntura debe ser rápida y atraumática, la sangre obtenida debe depositarse en un tubo heparinizado libre de amonio y conservarlo inmediatamente en hielo. Las muestras deben analizarse dentro de 2 horas para así evitar que los valores de amonio aumenten por efecto del almacenamiento (Richter, 2003).

La principal utilidad clínica de esta prueba es detectar pacientes con PSS, evaluar la función hepática en pacientes sin ictericia, y evaluar el rol del amonio en pacientes con signos de encefalopatía hepática. En la evaluación de la función hepática esta prueba es tan sensible como la medición de SBA, y más sensible que la medición de la excreción de BSP (Richter, 2003).

### **2.2.9.4. Ácidos biliares séricos**

La medición de los SBA tiene ventajas sobre otras pruebas de funcionalidad hepática debido a que no requiere la administración de compuestos exógenos como la BSP,

ICG o la administración oral de cloruro de amonio además, no necesita de un manejo meticuloso de las muestras (Richter, 2003).

### **2.3. ÁCIDOS BILIARES**

La bilis es una secreción digestiva que provee una ruta de eliminación para el colesterol y la bilirrubina. Sus componentes lipídicos mayoritarios son: colesterol, ácidos biliares y fosfolípidos. Estos tres componentes pueden sintetizarse por los hepatocitos o sacarse de la circulación hacia el hígado (Center, 1996).

El término ácido biliar se refiere a la configuración molecular en el cual la cadena del ácido carboxílico no está ionizado; el término sal biliar se refiere a la forma ionizada. A un pH fisiológico de 7.4 las sales biliares son predominantes (Center, 1996).

Existen variados ácidos biliares en las distintas especies animales, los que difieren en el número y posición del grupo hidroxilo en la estructura esteroidea y en el largo de la cadena. Los ácidos biliares son moléculas planas con grupos hidrofílicos (grupos hidroxilos, uniones peptídicas, y un grupo sulfato y carbonato) en un lado de la cadena y un grupo hidrofóbico en el otro lado de la cadena, que es una estructura esteroidea. Esta disposición molecular les permite formar micelas simples y mixtas, y actuar como detergente biológico (Anwer y Meyer, 1995).

Los ácidos biliares son los componentes predominantes de la bilis, correspondiendo a aproximadamente un 85% de los sólidos biliares. Ellos actúan como detergentes iónicos, participando en la absorción intestinal, transporte y secreción de lípidos. Tienen muchas funciones biológicas y efectos patológicos (Center, 1996).

El ácido cólico y su ácido biliar secundario (ácido deoxicólico) son los ácidos biliares predominantes en el perro y gato respectivamente (Williams, 2003).

La continua secreción transhepatocelular desde la sangre hacia la bilis tienen un importante rol en la generación de un flujo biliar canalicular (flujo dependiente de ácidos biliares) (Center, 1996).

### **2.3.1. Síntesis de ácidos biliares**

Los ácidos biliares son ácidos orgánicos derivados del colesterol, sintetizados exclusivamente en el hígado, en una serie de pasos secuenciales que envuelven numerosos intermediarios y distintos organelos hepatocelulares (Center, 1996).

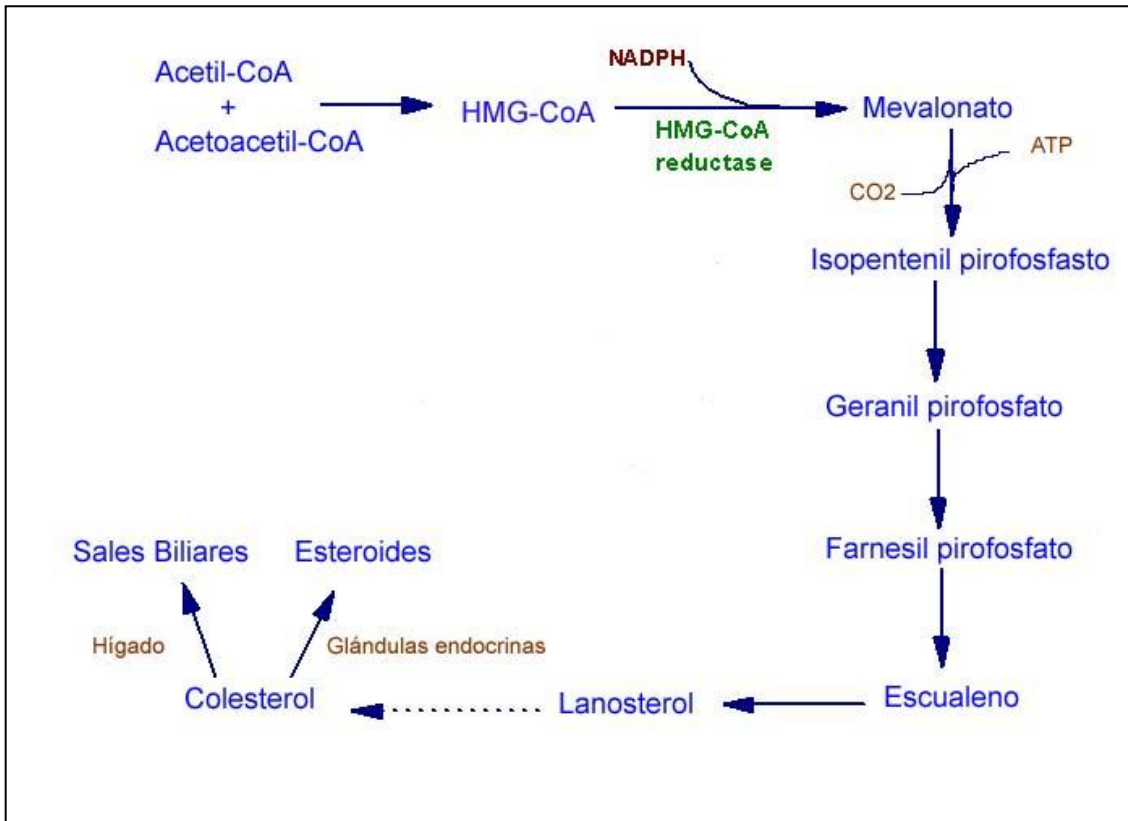
El colesterol es una molécula biológica muy importante que cumple un rol estructural al componer la membrana celular, y es precursor en la síntesis de hormonas esteroideas y ácidos biliares. Tanto el colesterol dietario como el sintetizado son transportados a través de la circulación unidos a lipoproteínas (King, 2004).

La síntesis y utilización del colesterol deben ser cuidadosamente reguladas para prevenir una sobreacumulación y depósito anormal en el organismo (King, 2004). Menos de la mitad del colesterol deriva de la biosíntesis; siendo hepática en un 10% e intestinal en un 15% (King, 2004).

La síntesis de colesterol tiene 5 pasos (Cuadro 1.3):

1. El acetyl-coenzima A (CoA) se convierte en 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA)
2. El HMG-CoA se convierte en mevalonato
3. El mevalonato se convierte en una molécula de isopreno que es el isopentenil pirofosfato (IPP)
4. El IPP se convierte en escualeno
5. El escualeno se convierte en colesterol

**Cuadro 1.3: Síntesis del colesterol**



(King, 2004).

Los ácidos biliares se clasifican en 2 grupos dependiendo del largo de la cadena: los de 24 carbonos y los de 27 carbonos. En los vertebrados mayores, los ácidos biliares con 24 carbonos son los mayoritarios. Los ácidos biliares en las distintas especies difieren en tres aspectos: (Mukhopadhyay y Maitra, 2004).

- Estructura de la cadena
- Fusión o no de los anillos
- Distribución del número y la oposición de los grupos hidroxilos en el núcleo esteroideo.

Los ácidos biliares se sintetizan del colesterol a través de complejos pasos tanto en el núcleo esteroideo como en la cadena (Cuadro 1.4). El primer paso se cree que es el limitante, el colesterol se oxida a  $7\alpha$ -hidroxicolesterol por la  $7\alpha$ -hidroxilasa. El  $7\alpha$ -hidroxicolesterol es luego convertido en el intermediario colesterol- $7\alpha$ -hidroxi- $\Delta^4$ -3 por la acción de una isomerasa y una reductasa. Este derivado insaturado es la base para la síntesis

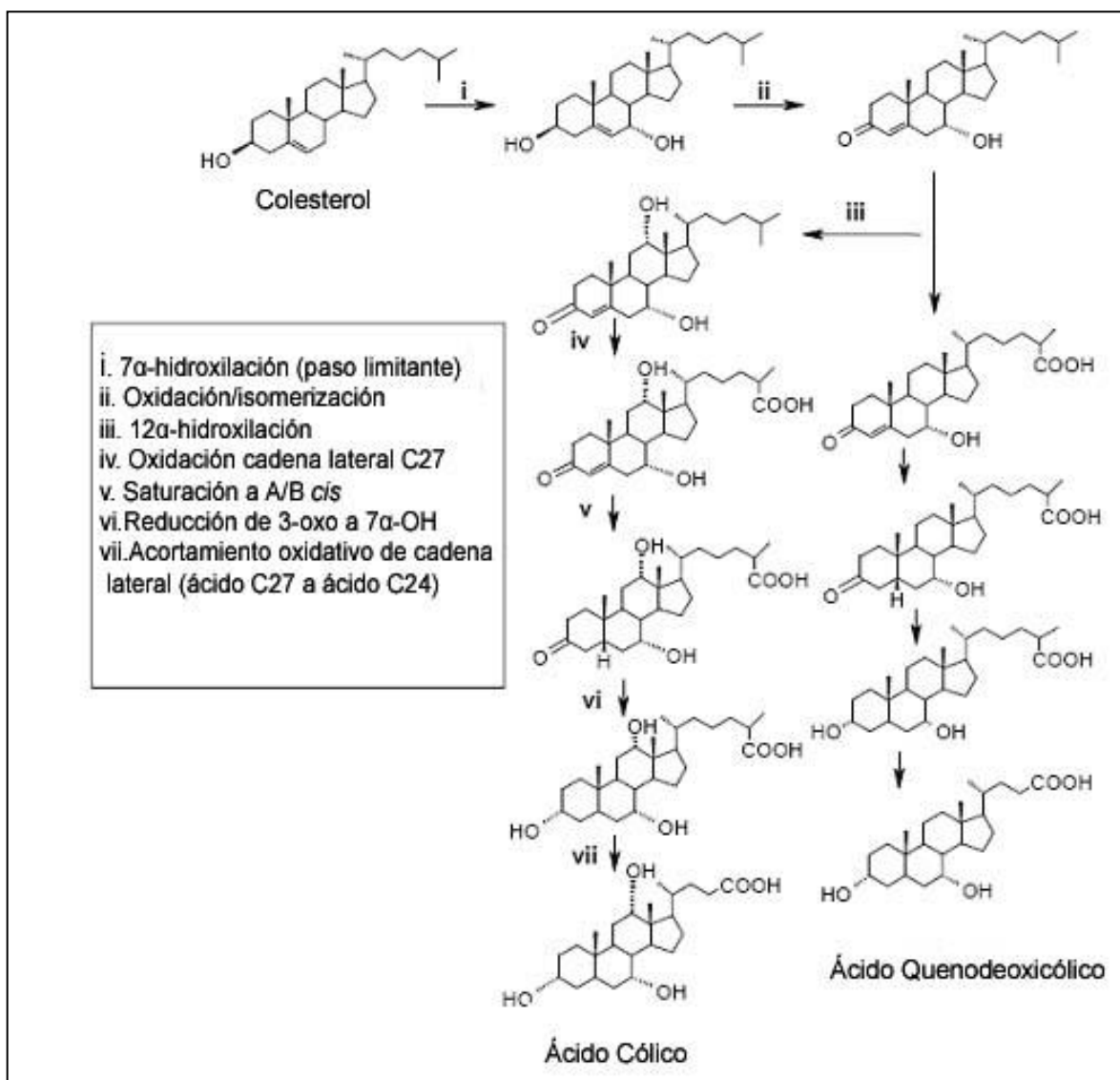
del ácido cólico y del ácido quenodeoxicólico. La hidroxilación del carbono 12 lleva a la formación del esqueleto del ácido cólico. La hidroxilación del carbono 27 que lleva a la formación del ácido carboxílico mediado por una hidroxilasa. Luego ocurre una ruptura oxidativa de la cadena, el ácido C<sub>27</sub> queda como C<sub>24</sub> mediado por una enzima peroxisomal (Mukhopadhyay y Maitra, 2004).

La síntesis de un ácido biliar completo requiere de la participación de 17 enzimas. La expresión de enzimas es regulada por hormonas con receptores nucleares y otros factores de transcripción (Mukhopadhyay y Maitra, 2004).

Los ácidos biliares primarios son el cólico y quenodeoxicólico, formados en el hígado a partir de colesterol. Los ácidos biliares secundarios son el deoxicólico, litocólico y ursodeoxicólico, y se forman a partir de los ácidos biliares primarios en el lumen intestinal a través del metabolismo bacteriano (Center, 1996; Williams, 2003).

El colesterol tiene un grupo hidróxido en la posición 3, y después de varios pasos incluyendo la hidroxilación en la posición 7 (paso limitante), se produce el ácido quenodeoxicólico que es un ácido biliar dihidróxido, con hidróxidos en la posición 3 y 7. Uno de los precursores del ácido quenodeoxicólico experimenta, con relativa eficiencia, varias hidroxilaciones además del paso limitante, por lo tanto, grandes cantidades del ácido cólico (trihidróxido: 3, 7, 12) son generados. Así, los ácidos biliares cólico y quenodeoxicólico son los dos ácidos biliares primarios mayoritarios (Williams, 2003).

**Cuadro 1.4: Biosíntesis de ácidos biliares desde colesterol**



(Mukhopadhyay y Maitra, 2004).

El paso limitante es la conversión del colesterol en 7 $\alpha$  hidroxicolesterol por la 7 $\alpha$  hidroxilasa. Esta enzima está regulada por las sales biliares que sufren circulación enterohepática. Muchas variables influyen en el rango de síntesis de ácidos biliares a través de esta enzima (Cuadro 1.5) (Engelking y Sawkat, 1999).

**Cuadro 1. 5: Variables que influncian a la enzima 7 $\alpha$  hidroxilasa**

<b>Variables</b>	<b>Efecto en el colesterol de 7<math>\alpha</math> hidroxilasa</b>
Fístula biliar	aumenta
Mala absorción de ácidos biliares	aumenta
Drenaje linfático (pérdida de ácidos Biliares)	aumenta
Anastomosis portocaval	aumenta
Glucocorticoides	aumenta
Adrenalectomía	disminuye
Tiroxina	aumenta
Tiroidectomía	disminuye
Glucosa después de inanición	aumenta
Ayuno	disminuye
Administración oral de ácidos biliares	disminuye
Ligación de ducto biliar/obstrucción	aumenta
Ritmo diurno (hora de alimentación)	aumenta
Falla hepática	disminuye

(Engelking y Sawkat, 1999).

En la mayoría de los mamíferos, la biosíntesis de ácidos biliares es regulada principalmente por la cantidad de ácidos biliares que retornan al hígado. Esto se determina por el tamaño del “pool” de ácidos biliares y el número de circulaciones enterohepáticas del pool de cada día. En humanos, ocurren por día aproximadamente 6 a 8 ciclos, 2 en cada intervalo de comida (Center, 1996).

Si aumenta el nivel de sales biliares que retornan al hígado desde el intestino, disminuye la síntesis. Recíprocamente, si el retorno disminuye por pérdidas excesivas aumenta la síntesis, sin embargo, este aumento en la síntesis de ácidos biliares no puede



compensar una pérdida de mayor del 20% de los ácidos biliares secretados (Engelking y Sawkat, 1999).

El colesterol de la dieta también regula la síntesis de ácidos biliares. Los estudios en perros y ratas demostraron que el aumento de 2.5% de colesterol en la dieta, resulta en un cuádruple incremento en la excreción diaria media de ácidos biliares. Este mecanismo compensatorio jugaría un importante papel en prevenir el aumento indefinido del colesterol corporal (Engelking y Sawkat, 1999).

### **2.3.2. Conjugación hepática**

Después de la síntesis, los ácidos biliares se conjugan en el hígado, lo que ocurre en la mayoría ellos antes de ser secretados hacia la bilis (Center, 1996).

Los ácidos biliares son conjugados primariamente con los aminoácidos taurina y glicina mediante eslabones amida. Los ácidos biliares son convertidos en ácido biliar-CoA mediante una enzima activante-ácido biliar microsómica (ácido biliar-CoA-sintetasa) y luego amidados con taurina o glicina por la ácido biliar-aurina (o glicina) aciltransferasa. La taurina parece ser el sustrato preferido por muchas especies animales; y los hígados de perro y gato son incapaces de conjuguar ácidos biliares con glicina (Engelking y Sawkat, 1999).

La conjugación de ácidos biliares aumenta su ionización, y con esto su solubilidad a pH ácido; además de aumentar su resistencia a la precipitación por cationes bivalentes como el calcio. La conjugación reduce el pK de los ácidos biliares, disminuyendo el pH en que podrían precipitar (Center, 1996).

Los ácidos biliares conjugados con taurina son solubles a valores de pH mayores de 1.8, los de glicina precipitan en  $\text{pH} < 5$  y los no conjugados lo hacen por debajo de un pH 7 (Cuadro 1.6) (Engelking y Sawkat, 1999).

**Cuadro 1.6: Efecto de la conjugación y no conjugación de los ácidos biliares en el pH de precipitación.**

Ácidos biliares	pKa	pH precipitación
No conjugados	5-6.5	6.5-7
Conjugados con Glicina	3.8-4.8	4.3-5
Conjugados con Taurina	1.8-2	<1.8

(Engelking y Sawkat, 1999).

Al pH del lumen intestinal (5 a 7 en el duodeno), la mayoría de los ácidos biliares no conjugados existen en la forma asociada (protonada) insolubles en agua. En consecuencia, es importante que el hígado conjugue casi todos los ácidos biliares antes de la excreción canalicular. Como los conjugados de taurina tienen valores de pKa bajos, estarán en la forma de sales ionizadas hasta que alcancen el nivel intestinal (íleon) (Engelking y Sawkat, 1999).

La conjugación también reduce la absorción de los ácidos biliares desde el lumen intestinal, ya que los ácidos biliares conjugados tienen un tamaño molecular que les impide pasar a través de las uniones estrechas (absorción paracelular), con una carga no adecuada para pasar a través de las membranas celulares (absorción transcelular), y la unión a taurina o glicina las hace resistentes a la actividad de enzimas digestivas. Los ácidos biliares conjugados tienden a mantenerse en el lumen intestinal hasta que llegan al íleon, donde existen receptores específicos que median su absorción (Williams, 2003).

Los ácidos biliares pueden ser conjugados en el hígado con sulfato o ácido glucurónico, particularmente en pacientes colestásicos en los cuales está afectada la excreción de ácidos biliares. Este sería un mecanismo detoxificador protector para las elevadas concentraciones de ácidos biliares en el hígado y sangre, los cuales podrían inducir efectos tóxicos debido a sus propiedades detergentes (Center, 1996; Engelking y Sawkat, 1999).

La conjugación hepática de los ácidos biliares es tan eficiente que sólo pequeñas proporciones (menos del 1% en humanos) están presentes en la vesícula biliar de forma no conjugada (Williams, 2003).

### **2.3.3. Secreción hepática**

Los ácidos biliares primarios no conjugados experimentan una eficiente conjugación antes de ser secretados por los hepatocitos. Trazas de ácidos biliares secretados de forma no conjugada son reabsorbidos por las células del epitelio biliar y retornadas al hígado, y así son conjugadas antes de su secreción (Williams, 2003).

Los ácidos biliares que no son absorbidos en el íleon pasan al colon, donde sufren una extensa oxidación (deshidrogenación) por el metabolismo bacteriano de los grupos hidroxilos en la posición 3, 7 y 12. La remoción del grupo hidroxilo 7 del ácido cólico resulta en la formación del ácido deoxicólico, mientras que la deshidroxilación del grupo 7 del quenodeoxicólico resulta en la formación del ácido litocólico. Como resultado de esto la mayoría de los ácidos biliares presentes en la fecas son el ácido deoxicólico y litocólico (Williams, 2003).

Una significativa proporción del ácido deoxicólico formado en el colon es absorbido hacia la sangre, lo que no ocurre con el ácido litocólico por ser menos soluble en agua. El ácido litocólico es conjugado y sulfatado en la posición 3; como consecuencia de esta doble conjugación, la absorción intestinal es limitada para la mayoría de los ácidos litocólicos, perdiéndose la circulación enterohepática. Las concentraciones del ácido litocólico son relativamente bajas en el plasma pero altas en fecas (Williams, 2003).

El ácido ursodeoxicólico es un epímero  $7\beta$  del ácido quenodeoxicólico. Pequeñas concentraciones de este ácido biliar secundario están presentes en la bilis de la mayoría de los animales adultos sanos (Williams, 2003).

#### 2.3.4. Captación hepática

El hígado extrae eficientemente los ácidos biliares de la circulación portal. Esta elevada eficiencia de extracción es el motivo para las bajas concentraciones sistémicas (2-4  $\mu\text{M/L}$  comparado con las concentraciones portales de 60-80  $\mu\text{M/L}$ ) (Center, 1996).

La carga de ácidos biliares que vuelve al hígado durante el intervalo posprandial excede la capacidad de clearance. Esto permite un pequeño aumento en la concentración de ácidos biliares totales en la circulación sistémica, en la mayoría de los animales sanos (Center, 1996).

Cualquier disminución en la eficiencia de extracción debida a una disminución del flujo sanguíneo hepático o daño hepatocelular incrementará las concentraciones sistémicas de los ácidos biliares. Este es el fundamento para el uso de los ácidos biliares como indicador de disfunción hepática (Engelking y Sawkat, 1999).

El mecanismo de la captación hepática de ácidos biliares fue estudiado en ratas y perros empleando preparaciones *in vitro* e *in vivo*. Los ácidos biliares ingresan a los hepatocitos mediante 3 mecanismos:

- 1.-Transporte activo secundario, que utiliza energía aportada por el gradiente sódico a través de los hepatocitos (sodio-cotransporte de ácidos biliares).
- 2.-Transporte mediado por portador independiente del sodio.
- 3.-Difusión pasiva (Center, 1996).

Los dos primeros mecanismos son responsables por la captación concentradora de ácidos biliares dentro de los hepatocitos (Center, 1996).

Aunque los ácidos biliares conjugados en su mayor parte son transportados por el mecanismo de sodio-cotransporte de ácidos biliares, para los ácidos biliares no conjugados interviene el mecanismo independiente del sodio, difusión pasiva o ambos (Engelking y Sawkat, 1999).

Los estudios con distintos análogos de ácidos biliares, indicaron que una carga negativa sobre la cadena lateral es óptima y que el largo de la misma puede ser un determinante importante en la captación de los ácidos biliares. Además de la hepatopatía, las drogas como furosemida, rifampicina y ácido fusídico también intervienen con la captación de los ácidos biliares por el hígado de rata. Su efecto sobre el transporte de ácidos biliares en otras especies es desconocido (Center, 1996).

Las rifampicinas demostraron interferir con la eliminación de otros aniones inorgánicos como la bilirrubina, bromosulfaleína e indocianina verde en los seres humanos. Por ello, es factible que estas drogas también interfieran con la captación de ácidos biliares en otras especies (Center, 1996).

La infusión de mezclas de aminoácidos en pacientes humanos produce síndromes colestásicos y también inhiben el transporte hepático de ácidos biliares. No obstante, no se sabe si la colestasis observada se debe a la inhibición específica de la captación de ácidos biliares o se debe a otro efecto de los aminoácidos sobre el transporte hepatobiliar o ambos (Engelking y Sawkat, 1999).

### **2.3.5. Circulación enterohepática**

Después de la síntesis hepática y conjugación, los ácidos biliares primarios se excretan a través del tracto biliar y se almacenan y concentran en la vesícula biliar (Center, 1996).

La función fisiológica de la vesícula biliar incluye almacenamiento de bilis, concentración, acidificación y liberación de bilis al intestino. La mucosa de la vesícula biliar tiene una habilidad única para resistir las propiedades detergentes de los ácidos biliares. Durante el almacenamiento, la bilis hepática se concentra hasta el 10% a 20% de su volumen original (Center, 1996).

El vaciamiento de la vesícula biliar usualmente se inicia después de las comidas, siguiendo a la liberación de colecistoquinina (CCK). En los perros la colecistoquinesis también puede ocurrir en la mitad de la noche y en forma fortuita durante el ayuno

prolongado. La vesícula biliar sufre un vaciamiento intermitente parcial durante la fase 2 del complejo mioeléctrico migratorio (Mukhopadhyay y Maitra, 2004).

La contracción interdigestiva también es activada por una variedad de péptidos gastrointestinales y neuropéptidos incluyendo gastrina, motilina, péptido intestinal vasoactivo, secretina glucagón y polipéptido pancreático. Esta variación hace que algunos animales tengan valores más altos de ácidos biliares postprandiales y en ayuno. El fenómeno parece más común en el perro que en el gato (Mukhopadhyay y Maitra, 2004).

Es importante recordar que el almacenamiento y concentración de bilis en la vesícula biliar no es necesaria para la digestión normal de grasas. La remoción quirúrgica de la vesícula biliar o colecistoenterotomía no lleva a maladigestión de grasas, malaabsorción de ácidos biliares o inhabilidad para usar la prueba para detectar ácidos biliares séricos (Center, 1996).

Luego que la bilis entra al canal alimentario, las sales biliares preparan las grasas dietarias para la lipólisis mediante la producción de una emulsión lipídica estable (Center, 1996).

Los ácidos biliares emulsifican las gotas de grasa dietaria para la formación de micelas mixtas. El significativo aumento del área de superficie de la grasa, la deja disponible para la digestión de las lipasas; las cuales sin esto no podrían acceder al interior de las gotas de lípidos. Los ácidos biliares transportan lípidos y son capaces de solubilizarlos formando micelas mixtas con ácidos grasos, colesterol y monoglicéridos. Estas micelas son responsables de la solubilización y absorción de vitaminas solubles en grasa como la vitamina E (Mukhopadhyay y Maitra, 2004).

Los ácidos biliares son absorbidos por todo el intestino aunque más prominentemente en el íleon distal. Ellos son transportados exclusivamente en la circulación portal. Este ciclo es altamente eficiente, se reciclan más del 95% de las sales biliares secretadas en la bilis. La pequeña cantidad perdida en fecas cada día se reemplaza

por la síntesis hepática. En animales sanos, el rango de absorción intestinal es el factor que determina las concentraciones de ácidos biliares en ayuno y posprandial. Las sales biliares que retornan al hígado están unidas a albúmina y en menor cantidad a lipoproteínas plasmáticas (Center, 1996).

La circulación enterohepática de ácidos biliares detalla 4 circuitos que contribuyen al pool de ácidos biliares que retornan al hígado. Estos son:

- **Circuito Colehepático**, el cual se define entre el canalículo, ductos biliares; y el hígado. La regurgitación de ácidos biliares aquí contribuye a los aumentos de ácidos biliares asociado a colestasis.
- **Circuito yeyunohepático**, se define por los ácidos biliares pasivamente absorbidos en el intestino delgado proximal. El circuito contribuye a un aumento de la carga de ácidos biliares no conjugados que pueden desarrollarse con un sobrecrecimiento bacteriano en el intestino, una condición que aumenta los ácidos biliares reconjugados. Aproximadamente el 30% del ácido quenodeoxicólico es absorbido por difusión pasiva en este circuito.
- **Circuito Ilealhepático**, es el mayor componente de la circulación enterohepática en normalidad.
- **Circuito Colohepático**, permite la captación pasiva de ácidos biliares que escapan a la absorción del intestino delgado o que son reconjugados en la porción distal del canal alimentario. Este circuito es importante cuando ocurre mala absorción de ácidos biliares como resultado de enfermedad ileal o resección. La absorción de ácidos biliares en el colon es altamente influenciado por el rango de deshidroxilaciones bacterianas. Ácidos biliares secundarios tienden a precipitar y a unirse a bacterias en el colon y consecuentemente tienen absorción disminuida (Center, 1996).

La mantención de una adecuada concentración de ácidos biliares en el canal alimentario y en la circulación enterohepática depende de una eficiente captación hepática. Bajo condiciones normales este sistema y la síntesis de ácidos biliares hepáticos se

mantiene a un nivel bajo constante, suficiente para reponer un 5% de pérdidas fecales diarias (Center, 1996).

### **2.3.6. Variables que influyen la circulación enterohepática de los ácidos biliares**

Muchos factores influyen la circulación enterohepática de los ácidos biliares. Estos incluyen:

- velocidad de síntesis de los ácidos biliares
- sincronización con las comidas y vaciamiento total de la vesícula biliar.
- vaciamiento gástrico y velocidad de tránsito intestinal.
- absorción intestinal
- frecuencia del ciclo enterohepático

(Center, 1996).

La dinámica de la circulación enterohepática influye la concentración total de ácidos biliares presentes en la circulación sistémica y la sensibilidad de la cuantificación de ácidos biliares como una prueba de la función hepatobiliar (Center, 1996).

Desde hace tiempo se reconoce que una elevada concentración de ácidos biliares en suero es un indicador muy sensible de disfunción hepatobiliar, lo que se explica por que:

- Son sintetizados sólo en el hígado
- Se encuentran en altas concentraciones en la circulación portal
- Son extraídos por el hígado con alta eficiencia (>90%)
- Aumentan en la circulación sistémica con la existencia de una lesión hepática
- Normalmente son transportados hacia intestino delgado constituyendo una circulación enterohepática.

En consecuencia, se asume que las concentraciones séricas de ácidos biliares son un mejor indicador del estado funcional del hígado comparado con los estudios tradicionales para tal efecto (Engelking y Anwer, 1999). Además la importancia de su valor diagnóstico



radica en su elevada sensibilidad para detectar insuficiencia hepática, a pesar de su baja especificidad por el tipo de disfunción (Engelking y Sawkat, 1999).

Si la medición es introducida en la práctica clínica, no debe solicitarse como prueba aislada sino en combinación con la batería de estudios convencionales (Engelking y Sawkat, 1999).

Las posibles causas de un aumento de la concentración de ácidos biliares serían:

- Desviación de la circulación portal fusionándose con la circulación sistémica (ej. PSS, cirrosis). En esta situación, la sangre no llega directamente a los hepatocitos, quienes no pueden captar el primer paso de los ácidos biliares.
- Disminución de la capacidad de captación intrínseca de los hepatocitos. Esto es un factor mayor en muchas enfermedades hepáticas (ej. Necrosis hepática, hepatopatías esteroideas).
- Disminución de la excreción de ácidos biliares por el sistema biliar y subsecuentemente regurgitación a la circulación sistémica. Esto ocurre más frecuentemente en colestasis (ej. Colangitis, bloqueo del ducto biliar, obstrucción intestinal, neoplasia).

(Williams, 2004).

En perros, un aumento de los ácidos biliares en ayuno o posprandial puede ocurrir en una variedad de enfermedades hepatobiliares incluyendo: PSS, colestasis, cirrosis, necrosis, lipidosis hepática, hepatopatías esteroideas y neoplasias. En la mayoría de estas enfermedades, las concentraciones de ácidos biliares posprandiales están marcadamente incrementadas en comparación con los valores en ayuno. Aumentos exagerados de los ácidos biliares posprandiales son más consistentes en animales con PSS. Algunos aumentos de las concentraciones de ácidos biliares puede asociarse más con un tipo de enfermedades que con otros, pero definir un tipo de enfermedad hepática basándose sólo en la concentración de ácidos biliares no es posible (Williams, 2004).

### **2.3.7. Medición de SBA**

El método estándar para evaluar las concentraciones de SBA consiste en tomar una muestra de 3 ml de sangre (sin anticoagulante) de un paciente en ayuno de 12 horas. Posteriormente, se toma una 2ª muestra dos horas posprandial. Estas muestras pueden refrigerarse por varios días e incluso congelarse indefinidamente antes de realizar el ensayo (Bunch, 2003).

Se han establecido cantidades mínimas de alimento que debe ser consumido. Pacientes menores de 5 kilogramos deben consumir menos de 2 cucharadas de alimento, y los pacientes mayores de 5 kilogramos desde 2 cucharadas de alimento. En pacientes con tendencia a la encefalopatía hepática se les debe dar alimento bajo en proteínas. Si están con vómito y estos son frecuentes después de comer, la prueba se limita sólo a mediciones en ayuno. Si el resultado es sobre lo normal, entonces un desorden hepático se debe considerar. Sin embargo, si la prueba en ayuno es normal, la enfermedad hepática no se puede descartar (Richter, 2003).

Las concentraciones de ácidos biliares en ayuno  $>20\mu\text{mol/L}$  y posprandial  $>25\mu\text{mol/L}$  son muy específicas de enfermedad hepatobiliar en perros y gatos. Los valores de ácidos biliares en ayuno  $<5\mu\text{mol/L}$  es normal en perros y gatos, y la concentración de 5 a  $20\mu\text{mol/L}$  es sugestiva de enfermedad hepática. Los valores de ácidos biliares en ayuno con una concentración de 5 a  $20\mu\text{mol/L}$  en perros y gatos debe interpretarse a la luz de la historia del paciente, signos clínicos, y resultados de diagnóstico imagenológico y de laboratorio (Williams, 2004).

Según Richter, (2003) las concentraciones normales de ácidos biliares en ayuno son aproximadamente  $2,5\mu\text{mol/L}$  en el perro y  $1,5\mu\text{mol/L}$  en el gato. A las dos horas posprandiales estas concentraciones se elevarían a aproximadamente  $8,5\mu\text{mol/L}$  en perros y gatos.

La medición de la concentración de SBA postprandiales parece ser mejor que la medición de SBA en ayuno; sin embargo, la interpretación de ambos en paralelo es aún más precisa (Center *et al.*, 1995).

La especificidad de los ácidos biliares séricos en ayuno supera el 90% con valores  $\geq 30$   $\mu\text{mol/L}$  y llega a 100% con valores  $\geq 50$   $\mu\text{mol/L}$  en el diagnóstico de una enfermedad hepática (Center *et al.*, 1985).

### **2.3.8. Métodos de determinación de SBA.**

Los métodos disponibles para la cuantificación de SBA incluyen cromatografía gas-líquida, espectrometría, espectrofluorimetría enzimática, y radioinmunoensayo (Center *et al.*, 1984).

La espectrometría consiste en un método enzimático que detecta la cuantificación del ácido biliar 3-hidróxido, el cual se convierte en 3-oxo por la enzima 3- $\alpha$  hidroxisteroidea deshidrogenasa con la reducción de un  $\text{NAD}^+$  a NADH. En una reacción catalítica doble, el  $\text{H}^+$  se transfiere a nitrotetrazolium azul para producir la tinción diformazan, que se mide con un espectrofotómetro a una longitud de onda determinada. Esta técnica es sensible para la detección de una concentración de ácidos biliares tan baja como 2,5  $\mu\text{mol/L}$  en el suero de perros y gatos (Center *et al.*, 1984).

La cromatografía gas-líquida es sensible y provee información cuantitativa en ácidos biliares específicos, pero tiene el inconveniente de ser muy laboriosa y requerir equipo especial no disponible en la mayoría de los laboratorios; además de necesitar grandes volúmenes de suero (Center *et al.*, 1984).

El radioinmunoensayo (RIA) es sensible y técnicamente simple de llevar a cabo. Sin embargo, su especificidad depende de la pureza y especificidad del anticuerpo y del antígeno trazador. El anticuerpo puede reaccionar selectivamente con ciertos ácidos biliares, resultando en una estimación poco precisa de la totalidad de los ácidos biliares (Center *et al.*, 1984).

Algunos artefactos pueden afectar la medición de los ácidos biliares. La lipemia marcada a moderada pueden dar valores mayores en las mediciones por el método enzimático, pero disminuyen al medirlo por el método RIA. Una moderada a marcada hemólisis aumentan los valores de los SBA en el método enzimático pero probablemente no afectaría la medición determinada por el método RIA. La bilirrubina tiene un pequeño efecto en la medición de la concentración de ácidos biliares a menos que la concentración sérica de la bilirrubina sea mayor a 5mg/dl, en cuyo caso ellos serán menores (<20%). Por lo tanto si hay hiperbilirrubinemia debido a enfermedad hepática, la medición de SBA no se indica (Richter, 2003).

La indicación para medir la concentración de SBA incluye la necesidad de identificación de una enfermedad hepática oculta cuando la determinación enzimática es normal como ocurre en el PSS, cirrosis y neoplasia hepática metastásica. También evaluar pacientes con sintomatología sugerente de PSS, para monitorear la función hepatobiliar en el caso de enfermedades hepáticas progresivas y para la identificación de funcionalidad hepática anormal en pacientes con elevación de la actividad enzimática por causas extrahepáticas (Richter, 2003).

Pretendemos determinar los valores de ácidos biliares séricos en caninos con signología de insuficiencia hepática y en individuos controles sanos para tener una aproximación diagnóstica como prueba de funcionalidad hepática.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Describir el comportamiento de los ácidos biliares en caninos con insuficiencia hepática.

#### **3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Determinar los niveles de los ácidos biliares séricos pre y post ingesta en individuos sanos y con insuficiencia hepática.
- 2) Relacionar los niveles de los ácidos biliares con resultados de las pruebas estándares de un perfil bioquímico hepático en pacientes sanos y en pacientes con insuficiencia hepática.

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

La descripción del comportamiento de los ácidos biliares se realizó en pacientes caninos sin importar su edad, raza o sexo. Se incluyeron 5 pacientes sanos que actuaron como control sano y 11 pacientes enfermos

Se consideró insuficiente hepático a los individuos con albúmina sérica con valores inferiores a 2,6g/dl y nitrógeno ureico sanguíneo menor a 10mg/dl. Además, debieron presentar los signos clínicos: anorexia total o parcial, ictericia y/o vómitos y/o diarrea crónicos (> a 15 días).

A todos los individuos se les realizó un hemograma completo para evaluar:

- Serie roja
  - Eritrocitos
  - Hemoglobina (Hb)
  - Volumen globular aglomerado (VGA)
  - Volumen corpuscular Medio (VCM)
  - Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM)
- Recuento leucocitario.
  - Leucocitos totales
  - Leucocitos diferenciales

Además se realizó un perfil bioquímico en el que se determinó:

- Nitrógeno Ureico Sanguíneo (NUS)
- Proteína sérica
- Albúmina
- Gama Glutamil Transferasa (GGT)
- Alanina Amino Transferasa (ALT)
- Fosfatasa Alcalina (FA)
- Bilirrubina total (BT)

Los valores de referencia usados para estas determinaciones fueron:

Eritrocitos	5,5–8.5 x 10 <sup>6</sup> /ul
Hemoglobina (hb)	11-18 g/dl
Volumen globular aglomerado (VGA)	37-55%
Volumen corpuscular Medio (VCM)	60-77 fl
Concentración Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM)	32-36%
Leucocitos	6000-17000/ul
Baciliformes	0-300/ul
Neutrófilos	3000-11500/ul
Linfocitos	1000-4800/ul
Monocitos	150-1350/ul
Eosinófilos	100-1250/ul
Nitrógeno Ureico Sanguíneo (NUS)	10-30mg/dl
Proteína total (PT)	5,4-7,1 g/dl
Albúmina	2,6-3,3 g/dl
Gama Glutamil Transferasa (GGT)	<8 U/L
Fosfatasa Alcalina (FA)	<159U/L
Aspartato Amino Transferasa (AST)	<55U/L
Alanino Amino Transferasa (ALT)	<68 U/L
Bilirrubina total (BT)	0,1-0,5 mg/dl

(Kaneko, 1989)

Los pacientes enfermos correspondieron a distintas clínicas veterinarias de la ciudad de Santiago entre ellas: Hospital Clínico Veterinario sede Bilbao y sede Santa Rosa, Clínica Alemana, Instituto Neurológico, Clínica Veterinaria Providencia y Clínica Veterinaria Putzy Cat. Debido a esto la mayoría de los datos concernientes a signología clínica recopilados tienen como fuente las fichas clínicas de estos pacientes y fueron determinados por el Médico Veterinario que los examinó más la información aportada por los dueños.

#### 4.1. Prueba de Ácidos Biliares

Se tomaron dos muestras sanguíneas donde se evaluaron los ácidos biliares. La primera se tomó con doce horas de ayuno, y la segunda, dos horas posprandial. La cantidad de alimento que se administró a cada paciente fue de 1/6 de kilocalorías/día de energía metabolizable, esto se determinó mediante la fórmula EMb (Energía metabólica basal): (peso del animal x 30) + 70. Consumieron alimento enlatado a/d de Hill's® Prescription Diets, el cual poseía 180 Kcal por lata.

Cada paciente fue alimentado de forma voluntaria.

Para las mediciones de Ácidos Biliares Séricos se utilizó una prueba fotométrica enzimática (Ecoline® S<sup>+</sup>) del laboratorio DiaSys Diagnostic Systems GmbH de Holzheim Alemania.

Esta prueba diagnóstica contenía:

- 5 frascos de 10ml: Reactivo de la muestra
- 5 frascos de 10ml: Reactivo blanco
- 1 frasco de 100ml: Reactivo que para la reacción
- 1 frasco de 100ml : Solución tamponadora
- 3 frascos de cada concentración de solución estándar (5, 25 y 100 µmol/L.)

La preparación tanto del reactivo blanco como de la muestra se realizó mezclando su contenido con 10ml de solución tamponadora. El reactivo que detiene la reacción viene listo para usarse, y tiene por finalidad aumentar la estabilidad de la tinción formada. Las soluciones estándares contienen un liofilizado de ácido biliar con concentraciones de 5, 25 y 100µmol/L. El liofilizado consiste en glicoquenodeoxicolato de sodio en una matriz sérica bovina. Estos se disolvieron en 3ml de agua bidestilada y se dejaron reposar 10 minutos a temperatura ambiente.

Cada medición de ácidos biliares se realizó con dos tubos, uno que sirvió como blanco y el otro que fue el de la muestra (Cuadro 1.7). Cada tubo llevó 200 µL del suero, más 500µL ya sea del reactivo blanco o el de la muestra, en forma respectiva. Se mezcló y



se dejó incubar 15 minutos a 37°C. Luego se agregaron 500µL del reactivo que detiene la reacción.

**Cuadro 1.7: Componentes del tubo blanco y de la muestra**

Componentes	Blanco	Muestra
Suero	200µL	200µL
Reactivo de la muestra	-----	500µL
Reactivo Blanco	500µL	-----
Mezclar e incubar 15 minutos a 37°C.		
Reactivo que detiene la reacción	500µL	500µL

#### 4.2. Descripción de los resultados

La descripción de los resultados obtenidos se hizo a través de frecuencias absolutas, frecuencias relativas y media  $\pm$  la desviación estándar.

Se buscó relacionar los niveles de los ácidos biliares (ya sea en ayuno como posprandial) entre individuos sanos y enfermos y los niveles de ácidos biliares en ayuno y posprandial dentro de cada grupo de sanos y enfermos. Para esto se utilizó la Prueba de t de Student. Esta prueba de distribución de valores nos permitió el uso de muestras pequeñas (n menores de 30) y decidir si la diferencia observada entre medias aritméticas correspondió a efectos reales, que hacen que la diferencia sean significativa o simplemente a causas de variación aleatoria. En nuestro caso se usó la prueba de la hipótesis de la diferencia entre dos medias muestrales para muestras independientes y asociadas.

Además se relacionaron los valores de los ácidos biliares con valores estándares de un perfil bioquímico para las siguientes determinaciones: proteína total, albúmina, NUS, ALT, AST, GGT y FA; para esto, se utilizó la correlación de Spearman.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de individuos controles correspondió a 5 y los individuos insuficientes hepáticos fueron 11, este número varió ya que en un principio eran 15, pero debido al paso del tiempo y a la fecha de expiración de los ácidos biliares se acortó. Estos números se definieron considerando que cada paciente necesitó de dos determinaciones de ácidos biliares y esta prueba diagnóstica en el país aún es escasa y costosa para el uso en Medicina Veterinaria.

Los individuos controles correspondieron a 2 hembras y 3 machos. Las edades estuvieron entre 10 meses y 5 años y todos fueron de razas puras: Siberian husky, Labrador y Rottweiler. Todos ellos presentaron valores de hemograma (Tabla N°1) y perfil bioquímico (Tabla N° 2) dentro de rangos normales y al exámen clínico no presentaron anormalidades.

**Tabla N° 1: Valores de hemograma obtenido de los pacientes controles sanos.**

Determinaciones	Individuos				
	1	2	3	4	5
Hemoglobina g/dl	14,5	14,4	11,6	15,5	17,2
VGA %	46	45	38	47	53
Leucocitos	16550	16150	13300	13000	10600
Baciliformes/ul	305	290	285	150	106
Segmentados/ul	11188	8791	9291	7650	6110
Linfocitos/ul	2929,5	4800	2128	3770	2014
Monocitos/ul	927,5	1300	266	650	1310
Eosinófilos/ul	1200	969	1330	780	1060

**Tabla N° 2: Valores de perfil bioquímico obtenido de los pacientes controles sanos.**

Determinaciones	Individuos				
	1	2	3	4	5
PT g/dl	7,6	6,6	6,3	6,0	6,0
Albúmina g/dl	3,6	3,0	2,8	3,1	3,1
NUS mg/dl	15,6	20,3	14,1	16,2	24,4
AST U/L	17	9	25	9	29
FA U/L	32	25	96	22	45
ALT U/L	29	15	29	47	45

De los individuos enfermos un 63,6% (7/11) correspondieron a machos. La mayoría de los caninos correspondieron a razas puras con un 81,8% (9/11) y entre ellas tenemos: Maltés, Poodle, Yorkshire, Fox terrier, Pastor inglés y Pastor alemán. Las razas más afectadas fueron las chicas a medianas con un 81,8% (9/11) en total.

El rango de edades fue bastante amplio, desde los 4 meses hasta los 15 años. Un 27,2% (3/11) correspondió a cachorros; un 54,5% (6/11), a adultos; y un 27,2% (3/11), a ancianos.

El hemograma sólo fue posible de realizar en 9 de los 11 individuos debido a que uno de ellos pertenecía a una clínica veterinaria particular y no se pudo obtener la muestra de sangre. Al evaluar la serie roja (Tabla N° 3) la mayoría de los individuos presentó anemia 55,5% (5/9). De estos, 4 individuos presentaron anemia normocítica normocrómica y uno anemia microcítica hipocrómica.

Además algunos individuos presentaron alteraciones morfológicas en la serie roja como: los individuos 1, 3 y 6 que presentaron poiquilocitosis. Los individuos 3, 4 y 6 presentaron diferentes grados de anisocitosis; y los individuos 6 y 8 diferentes grados de policromacia.

**Tabla N° 3: Valores de hemograma obtenidos de los pacientes con insuficiencia hepática.**

Individuos	Determinaciones					
	Eritrocitos x 10 <sup>6</sup> /ul	Hb g/dl	VGA %	VCMfl	CHCM%	Leucocitos/ul
	Valores de referencia					
	5.5-8.5 x 10 <sup>6</sup> /ul	12-18 g/dl	37-55 %	60-77 fl	32-36 %	6000-17000/ul
1	5300	11,7	33,7	67	33,4	57100
2	5490	10,7	34	61,9	31,5	7650
3	3410	6,4	20,2	59	31,8	37600
4	7937	16,1	50,8	64	33,6	5700
5	ND	ND	ND	ND	34,4	ND
6	5400	11,2	33	61,11	33,94	22100
7	4970	11	34	68,41	38,35	8812
8	ND	11,5	37	ND	31	11200
9	ND	ND	ND	ND	ND	9900
10	6120	14,2	41,3	67	34,5	7600
11	7000	13,6	41	60,3	33	8400

ND: no determinado

En cuanto a la serie blanca (Tabla N° 4) vemos que 6/11 individuos presentaron sus leucocitos normales, 3/11 poseían leucocitosis y 1/11 leucopenia. En general, los eosinófilos y linfocitos y se encontraron normales. Se encontraron aumentados los valores de: baciliformes(7/8), neutrófilos (3/10) y monocitos (3/8). En general, los cambios en los leucocitos son mínimos en perros y gatos con enfermedad hepatobiliar, excepto cuando un agente infeccioso es el evento que inicia el cuadro o cuando la infección ha complicado un desorden hepatobiliar primario (Bunch, 2003).

**Tabla N° 4: Valores diferenciales de leucocitos obtenidos de los pacientes con insuficiencia hepática**

Individuos	Leucocitos				
	Baciliformes/ul	Segmentados/ul	Linfocitos/ul	Monocitos/ul	Eosinofilos/ul
	Valores de Referencia				
	0-300/ul	3000-11500/ul	1000-4800/ul	150-1350/ul	100-1250/ul
1	16559	33118	4568	1713	0
2	306	5278	1224	612	306
3	16656	21432	2632	0	0
4	57	3420	1197	0	798
5	ND	ND	ND	ND	ND
6	1105	19227	1105	663	0
7	352	4406	1410	1850	793
8	-	7280	1904	1680	0
9	1188	4059	3663	396	594
10	-	5396	1140	152	912
11	420	6972	252	420	336

ND: no determinado

Al realizar el perfil bioquímico (Tabla N° 5) a los individuos enfermos se vio que las proteína totales se encontraron normales en 5/11 y disminuidas en 6/11 individuos. Se encontraron disminuidos la albúmina (9/11) y el NUS (7/11) en la mayoría de los individuos. Las enzimas hepáticas y las de conductos biliares se encontraron aumentadas: AST (6/9), ALT (6/11), FA (9/11) y GGT (3/5). La bilirrubina total estuvo normal en 7/10 individuos. Esto concuerda con lo presentado por 11 pacientes caninos con hepatotoxicidad debido a un quimioterápico (Lomustina) donde se obtuvieron valores aumentados de FA (1431U/L), ALT (1036U/L), AST (131U/L) y GGT (40U/L). Además presentaron hiperbilirrubinemia (1,3 mg/dl), hipoalbuminemia (2,7 g/dl) y disminución del NUS (6mg/dl) (Kristal *et al.*,2004).

**Tabla N° 5: Valores de perfil bioquímico obtenido de los pacientes con insuficiencia hepática**

Individuos	Determinaciones							
	PT g/dl	Albúmina g/dl	NUS mg/dl	AST U/L	FA U/L	ALT U/L	GGT U/L	BT mg/dl
	Valores de referencia							
	5,4-7,1 g/dl	2,6-3,3 g/dl	10-30 mg/dl	<55 U/L	<159 U/L	<68 U/L	<8 U/L	0.-0,5 mg/dl
1	5,0	2,5	3,3	167	832	343	-	0,37
2	5,3	1,5	4,2	90	1656	65	-	0,3
3	5,5	1,4	5,1	48	948	10	-	2,63
4	5,7	2,4	7,4	-	209	143	6	0.3
5	6,0	2,2	4,2	111	554	298	-	1,03
6	4,2	1,4	6	12	43	17	9	0,1
7	6,6	2,9	12	-	534	106	13	0,35
8	2,4	1,3	26,2	97	61	20	-	-
9	3,7	1,7	4,3	63	232	73	8	0,2
10	6,5	2,6	62,1	37	311	48	-	0,13
11	5,1	2,0	11,5	536	6710	730	119	4,37

Los signos encontrados en estos pacientes se resumen en la tabla N° 6 con sus respectivas frecuencias absolutas y relativas.

**Tabla N° 6: Signos clínicos encontrados en pacientes con características de insuficiencia hepática, con sus frecuencias absolutas y relativas.**

Signos clínicos	Frecuencias absolutas	Frecuencias relativas
Anorexia	8	72,7
Ascitis	5	45,4
Decaimiento	2	18,1
Diarrea	3	27,2
Edema declive	2	18,1
Ictericia	2	18,1
Postración	1	9
Sialorrea	1	9
Vómito	5	45,4

Como se observa en la tabla N° 6 el signo clínico más comúnmente observado fue la anorexia, seguida de ascitis, vómito, y finalmente diarrea. Los signos gastrointestinales se explican por la gastritis y ulceración gástrica que se produce en individuos insuficientes hepáticos. Estos signos se producen por el balance nitrogenado negativo y los bajos niveles de albúmina que resultan en alteración de la mucosa gástrica, con disminución del recambio celular. Esto además se favorece por la disminución del flujo sanguíneo que ocurre por hipertensión portal. La ascitis encontrada se explica por el aumento de la presión hidrostática debido a la hipertensión portal y a la disminución de la presión oncótica como consecuencia de la hipoalbuminemia existente (Twedt, 1985).

En un estudio acerca de la hepatitis activa crónica hecho por Strombeck y Gribble (1978) en 11 perros, se vio que los signos predominantes fueron la ictericia, depresión y anorexia. Otro estudio acerca de la hepatitis en el Doberman Pinscher por Mandigers *et al.*, (2004) vieron que los signos predominantes fueron anorexia, depresión, pérdida de peso, signos gastrointestinales, poliuria, polidipsia e ictericia. Esto fue realizado en 106 perros Doberman Pinscher de 3 años escogidos al azar. En el caso de hepatotoxicidad por el uso de quimioterápicos en 11 perros se vio como signo principal ascitis y efusión pleural. Este estudio fue realizado por Kristal *et al.*, (2004).

Además, de los signos clínicos observados anteriormente un 27,2% (3/11) presentó encefalopatía hepática, y los signos observados se muestran en la tabla N° 7 con sus frecuencias absolutas y relativas. Con mayor frecuencia se observó: choque contra objetos, amaurosis, deambular compulsivo y presión de la cabeza contra la pared. Esto concuerda parcialmente con lo encontrado por Taboada y Dimsky (1995) donde los signos más frecuentes (en orden decreciente) en individuos con encefalopatía hepática fueron: depresión, cambios de personalidad, estupor, andar compulsivo o en círculo, tambaleo o ataxia, amaurosis, debilidad, convulsiones, presión de la cabeza, hiperactividad, ventroflexión cervical, tembor de cabeza o muscular, sordera y coma. La sialorrea se vio ocasionalmente en perros con enfermedad avanzada, y fue más frecuente en gatos.

**Tabla N° 7: Signos clínicos observados en 3 individuos con encefalopatía hepática con sus frecuencias absolutas y relativas**

<b>Signos clínicos</b>	<b>Frecuencias absolutas</b>	<b>Frecuencias relativas</b>
Amaurosis	2	66,6
Andar compulsivo	2	66,6
Chocar con objetos	3	100
Desorientación	1	33,3
Presión de la cabeza	2	66,6
Sialorrea	1	33,3

Estos signos clínicos son esperables debido a que se producen en estados terminales de enfermedad hepática, PSS y en deficiencias enzimáticas del ciclo de la urea. La etiología depende de diversos factores como: la circulación de toxinas (amonio, mercaptanos, ácidos grasos de cadena corta, indoles y aminoácidos aromáticos), alteración en la concentración de aminoácidos, y aumento de la sensibilidad cerebral a algunas drogas y toxinas (Tobias, 2002).

Los cambios encontrados en el hígado a través de exámenes radiográficos y/o ultrasonográficos se indican en la tabla N° 8.

**Tabla N° 8: Hallazgos en los exámenes radiográficos y/o ecográficos de 8 pacientes con signología de insuficiencia hepática**

<b>Hallazgos</b>	<b>Frecuencias absolutas</b>	<b>Frecuencias relativas</b>
Cirrosis	4	50
Congestión venosa	1	12,5
Masas tumorales	1	12,5
Microhepatia	5	62,5
Hepatomegalia	1	12,5
Ecogenicidad aumentada	5	62,5
Ecogenicidad disminuida	1	12,5

Lo que se observó más frecuentemente fue ecogenicidad aumentada, microhepatia y cirrosis. Estas tres características van entrelazadas entre sí ya que encontramos



ecogenicidad aumentada en cirrosis, lipidosis hepática y hepatopatía esteroideal (Partington y Biller, 1995). En la cirrosis observaremos un aumento del tejido conectivo que va reemplazando el parénquima hepático y lentamente alterará el flujo sanguíneo, lo que producirá que el hígado se torne cada vez más pequeño (microhepatia).

La media y desviación estándar de los ácidos biliares en ayuno y posprandial obtenidos en el grupo control fue respectivamente  $2,58 \pm 1,13$  y  $11,48 \pm 6,77$   $\mu\text{mol/L}$ . Similares valores fueron obtenidos por Center *et al.*, (1985) donde los ácidos biliares en ayuno se encontraron entre los rangos  $2,35 \pm 2,43$  y  $5,89 \pm 4,73$   $\mu\text{mol/L}$ . En este estudio se utilizaron 66 animales sanos para el valor de referencia normal y 150 animales con sospecha de enfermedad hepática, agrupados en 8 grupos. El diagnóstico definitivo se realizó mediante examen histológico hepático.

Los valores de los ácidos biliares obtenidos en ayuno y posprandial en individuos sanos y las características de la muestra al momento de su análisis se muestran en la tabla N° 9.

**Tabla N° 9: Valores de ácidos biliares séricos en ayuno y posprandial en individuos sanos.**

Individuos	Ayuno ( $\mu\text{mol/L}$ )	Característica de la muestra	Posprandial ( $\mu\text{mol/L}$ )	Característica de la muestra
1	1,6	Hemólisis +	3,3	Lipemia +
2	4,3	Hemólisis +	7,1	-
3	3,0	-	2,0	-
4	2,4	-	16,4	Hemólisis ++
5	1,6	-	10,6	-

Los valores de los ácidos biliares séricos encontrados en los individuos enfermos en ayuno y posprandial y las características que presentaban las muestras en el momento de su análisis se presentan en la tabla N° 10.

**Tabla N° 10: Valores de ácidos biliares séricos en ayuno y posprandial en individuos con signología de insuficiencia hepática.**

Individuos	Ayuno( $\mu\text{mol/L}$ )	Característica de la muestra	Posprandial ( $\mu\text{mol/L}$ )	Característica de la muestra
1	1,0	-	6,2	-
2	145,7	-	134,6	Hemólisis +
3	191,7	-	175,3	-
4	136,1	Hemólisis ++	181,9	Hemólisis +
5	26,7	Hemólisis +	46	Hemólisis ++
6	13,9	-	3,8	Lipemia+
7	188,1	-	140,5	Hemólisis +
8	171,6	Hemólisis + Ictericia ++	125,9	Ictericia ++
9	3,1	Lipemia+	72,8	Lipemia +
10	116	Hemólisis +++	126,7	-
11	180,4	-	176,5	-

La media y desviación estándar de los ácidos biliares en ayuno y posprandial obtenidos en el grupo de enfermos fue respectivamente  $106,75 \pm 79,29$  y  $108,2 \pm 65,89$   $\mu\text{mol/L}$ . Esto concuerda con lo obtenido por Johnson *et al.*, (1985) en un estudio realizado con 64 perros con enfermedades hepatobiliares, donde la media de los valores de ácidos biliares totales obtenidos fue de  $106,2 \pm 139,4$   $\mu\text{mol/L}$ . Además, en este estudio obtuvieron los valores de los ácidos biliares por grupos: PSS congénito  $103,4 \pm 111,8$ ; hepatopatía inducida por glucocorticoides  $16,3 \pm 13,6$ ; neoplasia hepática  $77,8 \pm 72$ ; hepatitis  $103 \pm 124,7$ ; colestasis  $149 \pm 217,7$  y cirrosis  $148,1 \pm 138,2$ .

En otro estudio que comparó los valores de ácidos biliares entre obstrucción de conducto biliar (ligazón experimental) y daño hepático severo (administración de dimetilnitrosamina) se observó que:

- Los ácidos biliares aumentaron rápidamente en el caso de la ligazón del ducto biliar, ya a los 3 días su concentración aumentó de  $0,6 \pm 0,1$  a  $69,2 \pm 15,3$   $\mu\text{mol/L}$

- A los 14 días se llegó a los  $247,8 \pm 54,1$  umol/L y a los 28 días fue de  $179,9 \pm 27,1$  umol/L.
- En el caso del daño hepatocelular el aumento fue más lento y gradual ya que a los 28 días se llegó a  $38,9 \pm 10,7$  umol/L.

(Rutgers *et al.*, 1988).

En el presente estudio se observó que los pacientes presentaron concentraciones de ácidos biliares altas pero no se pudo determinar cuan marcado fue su aumento debido a que no se tenía la información del momento exacto en que se enfermaron.

Se midieron los valores de las medias de los ácidos biliares en ayuno entre los grupos controles y enfermos y se obtuvo que la diferencia fue significativa en ambos grupos ( $p \leq 0,05$ ) Lo mismo se realizó con los valores de los ácidos biliares posprandiales y la diferencia entre la media del grupo control y enfermo también fue significativa ( $p \leq 0,05$ ).

También se midieron los valores de la media de los ácidos biliares comparando los valores en ayuno con los posprandiales dentro de cada grupo, es decir, dentro del grupo control y del grupo enfermo. Dentro del grupo control, se observó que existieron diferencias significativas entre los valores de ayuno y posprandial ( $p \leq 0,05$ ).

En cambio, en el grupo de los enfermos se observó que las diferencias entre los valores de la media en ayuno y posprandial no fueron significativas ( $p > 0,05$ ). En las muestras posprandiales esto podría explicarse porque la lipemia presente interferiría con la lectura de los resultados.

En la tabla N° 11 se muestran los resultados de la correlación entre los valores de un perfil bioquímico (proteína total, albúmina, NUS, AST, FA y ALT) con los valores de ácidos biliares en ayuno y posprandial de individuos controles. Los valores de un perfil bioquímico no se relacionan significativamente ( $p > 0,05$ ) con los valores de ácidos biliares en los individuos control.

**Tabla N° 11: Comparación entre los valores de un perfil bioquímico con ácidos biliares en ayuno y posprandial en individuos controles.**

Mediciones	Ácidos biliares en ayuno	Ácidos biliares posprandiales
Proteínas totales	0,13	0,67
Albúmina	-0,82	0,02
Nitrógeno ureico sanguíneo	-0,82	0,02
Aspartato amino transferasa	-0,53	-0,30
Fosfatasa alcalina	-0,15	-0,7
Alanino amino transferasa	0,15	-0,7

En la tabla N° 12 se muestran los resultados de la correlación entre los valores de un perfil bioquímico (proteína total, albúmina, NUS, AST, FA, ALT, GGT y bilirrubina total) con los valores de ácidos biliares en ayuno y posprandial de individuos insuficientes hepáticos.

Se obtuvo una correlación positiva y significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los valores de ALT y AST con los valores de ácidos biliares en ayuno y posprandial. Además, se obtuvo valores significativos ( $p \leq 0,05$ ) y positivos entre los valores de la albúmina y bilirrubina total con los valores de ácidos biliares posprandiales. La albúmina no sería un buen parámetro a considerar ya que según la literatura estos valores se encuentran disminuidos en la mayoría de los individuos insuficientes hepáticos. El NUS se correlaciona negativa pero significativamente ( $p \leq 0,05$ ) con los valores de ácidos biliares posprandiales.

**Tabla N° 12: Comparación entre los valores de un perfil bioquímico con ácidos biliares en ayuno y posprandial en individuos insuficientes hepáticos.**

Mediciones	Ácidos biliares en ayuno	Ácidos biliares posprandiales
Proteína total	0,03	0,05
Albúmina	0,27	0,50*
Nitrógeno ureico sanguíneo	-0,24	-0,51*
Fosfatasa alcalina	0,29	0,3
Alanina amino transferasa	0,54*	0,63*
Aspartato Amino Transferasa	0,53*	0,57*
Gama Glutamil Tranferasa	0,3	-0,3
Bilirrubina Total	0,06	0,51*

\*  $p \leq 0,05$

En un estudio realizado por Center, *et al* (1985) para determinar los parámetro más eficientes a considerar para llegar al diagnóstico de enfermedades hepáticas observaron que al combinar las mediciones de ácidos biliares en ayuno + bilirrubina total + ALT obtuvieron las mejores aproximaciones. Además en perros con EBDO, cirrosis, necrosis hepática, colestasis, hepatopatía esteroideal y neoplasia observaron que había una correlación significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los valores de los ácidos biliares en ayuno con la bilirrubina total, FA y ALT.

## 6. CONCLUSIONES

- Se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre las medias de los ácidos biliares en ayuno entre los grupos control y enfermos, y entre las medias de ácidos biliares posprandiales entre los grupos control y enfermos.
- Se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre las medias de los ácidos biliares entre ayuno y posprandial dentro del grupo control; en cambio, dentro del grupo de los enfermos estas diferencias no fueron significativas ( $p > 0,05$ ).
- Los valores del perfil bioquímico no se correlacionaron significativamente ( $p > 0,05$ ) con los valores de ácidos biliares en los individuos control.
- Existe una correlación positiva y significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los valores de ácidos biliares en ayuno y posprandial con ALT y AST. Además, existe una correlación positiva y significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los valores de ácidos biliares posprandial con albúmina, y bilirrubina total en los individuos insuficientes hepáticos.
- Existe una correlación negativa y significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre los valores de ácidos biliares posprandial con NUS en los individuos insuficientes hepáticos.
- La prueba de ácidos biliares séricos sería una prueba de gran ayuda en el diagnóstico de insuficiencia hepática en caninos.

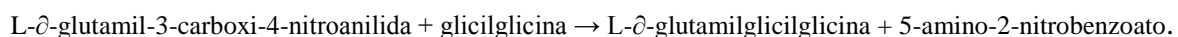
## **7.- ANEXO N° 1: TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS DE UN PERFIL BIOQUÍMICO.**

Para la medición del NUS se utilizó el método de Berthelot modificados para la determinación de urea en líquidos biológicos (Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina). Esto consiste en la descomposición de la urea por la ureasa produciéndose dióxido de carbono y amoníaco. Luego este reaccionó en medio alcalino con salicilato e hipoclorito para dar indofenol color verde. Esto se leyó en espectrofotómetro Microlab 100 de Merck a 570 nm.

La medición de proteínas séricas y de la albúmina se realizó a través de un método colorimétrico en suero (Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina). La medición de las proteínas consistió en una reacción de enlaces peptídicos de las proteínas con ión cúprico, en medio alcalino, para dar un complejo color violeta con un máximo de absorción de 540nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales de la muestra. Se leyó en espectrofotómetro Microlab 100 de Merck a los 15 minutos de incubación a 37°.

La medición de la albúmina consistió en una reacción de la albúmina con la forma aniónica del bromocresolsulfonftaleina, en presencia de un exceso de colorante, en medio tamponado a pH 3,8. Se leyó en espectrofotómetro Microlab 100 de Merck a los 10 minutos de reacción a temperatura ambiente.

La medición de la gama glutamil transferasa se realizó a través de un método Szasz modificado en suero o plasma del laboratorio Wiener. Esta es una carboxipeptidasa que catalizó la siguiente reacción:



La temperatura de reacción fue de 37°C durante 3 minutos. Se leyó en espectrofotómetro Microlab 100 de Merck a 405nm.

La medición de la fosfatasa alcalina se realizó con un método cinético optimizado en suero (Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina). La fosfatasa alcalina hidrolizó al p-nitrofenilfosfato (p-NFF), que es incoloro, produciendo fosfato y p-nitrofenol a pH alcalino. La velocidad de aparición del anión p-nitro-fenolato (amarillo) a 405nm, es proporcional a la actividad de la muestra. La dietanolamina (DEA), reguló el pH de la reacción y actuó como aceptor del fosfato liberado por la fosfatasa (transfosforilación), observándose como resultado una activación de la reacción. La DEA reúne las mejores condiciones en cuanto a activación y capacidad tamponante cuando se emplea p-NFF como sustrato; por tal razón se han desarrollado métodos optimizados. La temperatura de reacción fue de 37°C durante 3 minutos. Se leyó en espectrofotómetro Microlab de Merck.

La medición de la bilirrubina total y directa se realizó con un método colorimétrico en suero o líquidos biológicos. (Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina). La bilirrubina reaccionó específicamente con el ácido sulfanílico diazotado produciendo un pigmento color rojo-violáceo (azobilirrubina) que se midió fotocolorimétricamente a 530nm. Si bien la bilirrubina conjugada (directa) reaccionó directamente con el diazorreactivo, la bilirrubina no conjugada (indirecta) requirió la presencia de un desarrollador acuoso que posibilitó su reacción. De forma tal que, para que reaccionara la bilirrubina total (conjugada y no conjugada) presente en la muestra, debió agregarse benzoato de cafeína al medio de reacción. Para la reacción necesitó de temperatura ambiente y demoró 5 minutos. Se leyó en espectrofotómetro Microlab 100 de Merck a 530nm.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. **ANWER, M.S.; MEYER, D.J.** 1995. Bile Acids in the Diagnosis, Pathology, and Therapy of Hepatobiliary Diseases. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. Vol. 25(2): 503-516.
2. **BUNCH, S.E.** 2003. Diagnostic test for the hepatobiliary system. **In:** Nelson, R. W.; Couto, C. G. *Small Animal Internal Medicine*. Third Edition. Mosby. Missouri, USA. pp. 483–505.
3. **CENTER, S.A.; LEVEILLE, C.R.; BALDWIN, B.H.; TENNANT, B.C.** 1984. Direct spectrometric determination of serum bile acids in the dog and cat. *American Journal of Veterinary Research*. Vol 45(10): 2043-2050.
4. **CENTER, S. A.; BALDWIN, B. H.; ERB, H.; TENNANT, B.C.** 1985. Bile acids concentrations in the diagnosis of hepatobiliary disease in the dog. *Journal of American Veterinary Medical Association*. Vol 187(9): 935-940.
5. **CENTER, S. A.; ERB, H. N.; JOSEPH, BS.** 1995. Measurement of serum bile acids concentrations for diagnosis of hepatobiliary disease in the cats. *Journal of American Veterinary Medical Association*. Vol 207(8): 1048-1054.
6. **CENTER, S. A.** 1992. Fisiopatología y diagnóstico de laboratorio de las enfermedades del hígado. **In:** Ettinger, J. S. *Tratado de Medicina Interna Veterinaria*. Tercera Edición. Editorial Intermedica. USA. Pp 1494 - 1554.
7. **CENTER, S. A.** 1996. Pathophysiology of liver disease: Normal and abnormal function. **In:** Guilford, W.; Center, S. A.; Strombeck, D. R.; William, D. A.; Meyer, D. J. *Strombeck's Small Animal Gastroenterology*. Third Edition. Saunders Company. Philadelphia. USA. Pp 553 – 632.
8. **ENGELKING, L. R.; SAWKAT, M.** 1999. Hígado y Árbol Biliar. **In:** Anderson, N. V. 1999. *Gastroenterología Veterinaria*. Segunda Edición. Editorial Intermédica. Pennsylvania, USA. Pp 195 – 253.
9. **HARDY, R. M.** 1992. Enfermedades del hígado y su tratamiento. **In:** Ettinger, J. S. *Tratado de Medicina Interna Veterinaria*. Tercera Edición. Editorial Intermédica. USA. Pp 1555 – 1606.
10. **HAMMER, A. S.; SIKKEMA, D.A.** 1995. Hepatic Neoplasia in the dog and cat. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. Vol 25(2): 419-436.
11. **HUGHES, D.; KING, L. G.** 1995. The Diagnosis and management of acute liver failure in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. Vol 25(2): 437-460.

12. **JOHNSON, S. E.; SHERDING, R. G.** 1998. Enfermedades del hígado y del tracto biliar. **In:** Birchard, S. J.; Sherding, R. G. 1998. Manual Clínico de pequeñas especies. McGraw Hill Interamericana. Pp 846 – 891.
13. **JOHNSON, S. E.** 1999. Enfermedades Gastrointestinales de animales domésticos. Hígado y Árbol Biliar. **In:** Anderson, N. V. Gastroenterología Veterinaria. Editorial Intermédica. Segunda Edición. Buenos Aires, Argentina. Pp 462-519.
14. **JOHNSON, S.E.; ROGERS, W. A.; BONAGURA, J.D.; CALDWELL, J.H.** 1985. Determination of serum bile acids in fasting dogs with hepatobiliary disease. American Journal of Veterinary Research. Vol 46 (10): 2048 – 2053.
15. **KANEKO, J.J.** 1989. Clinical Biochemistry of domestic animals. Cuarta Edición. Academic Pres. Appendixes.
16. **KERWIN, S.C.** 1995. Hepatic Aspiration and Biopsy Techniques. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. Vol 25(2): 275-291.
17. **KING, M. W.;** 2004. Cholesterol and bile metabolism. <<http://dwd.unl.edu/Teacher/NSF/C10Links/web.indstate.edu/theme/mwking/cholesterol.html>> [consulta: 05-05-2005].
18. **KRISTAL, O.; RASSNICK, K. M.; GLIATTO, J. M.; NORTHRUP, N.C.; CHRETIN, J.D.; MORRISON- COLLISTER, K.; COTTER, S.M; MOORE, A. S.** 2004. Hepatotoxicity Associated with CCNU (Lomustine) Chemotherapy in Dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine. Vol 18: 75 – 80.
19. **MADDISON, J.** 2001. Diagnosing Liver Disease in Dogs: What do the Tests Really Mean?. World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings. <<http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings.plx?CID=wsava2001&PID=pr00128&O=VIN>> [consulta: 28-06-2004].
20. **MANDIGERS, P.J. J.; VAN DEN INGH, T. S. G. A. M.; BODE, P.; TESKE, E.; ROTHUIZEN, J.** 2004. Association between Liver Cooper concentration and Subclinical Hepatitis in Doberman Pinscher. Journal of Veterinary Internal Medicine. Vol 18: 647 – 650.
21. **MUKHOPADHYAY, S.; MAITRA, U.;** 2004. Chemistry and biology of bile acids. Current Science. Vol 87(12): 1666- 1683. <[http://eprints.iisc.ernet.in/archive/00003061/01/Chemistry\\_and\\_biology.pdf](http://eprints.iisc.ernet.in/archive/00003061/01/Chemistry_and_biology.pdf)> [consulta: 05-05-2005].
22. **PARTINGTON, B.P.; BILLER, D.S.** 1995. Hepatic Imaging with Radiology and Ultrasound. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. Vol 25(2): 305-335.

23. **REBAR, A. H.** 2003. Liver Profiling I & II. Western Veterinary Conference. <<http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings.plx?CID=acvc2001&PID=pr00429&O=VIN>>
24. **RICHTER, K.** 1996. Diseases of the liver. **In:** Tams, T. R. Handbook of Small Animal Gastroenterology. First Edition. Saunders. Pennsylvania, USA. pp 371–459.
25. **RICHTER, K.** (a) 2002. Practical Laboratory Evaluation of Liver Disease. American College of Veterinary Internal Medicine. <<http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings.plx?CID=acvim2002&PID=pr01368&O=VIN>> [consulta: 26-06-2004].
26. **RICHTER, K.** (b) 2002. Canine Hepatopathy. Western Veterinary Conference 2002. <<http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings.plx?CID=acvim2002&PID=pr01368&O=VIN>> [consulta: 26-06-2004].
27. **RICHTER, K.** 2003. Diseases of the liver and hepatobiliary systems. **In:** Tams, T. R. 2003. Handbook of Small Animal Gastroenterology. Second Edition. Saunders. Pennsylvania, USA. Pp 286 – 352.
28. **RUTGERS, H.C.; STRADLEY, R. P.; JOHNSON, S. E.** 1988. Serum bile acid analysis in dogs with experimentally induced cholestatic jaundice. American Veterinary Research. Vol 49(3): 317-320.
29. **SEVELIUS, E.; JÖNSSON, L.** 1996. Liver Disease. **In:** Thomas, D. A; Simpson, J.W; Hall, E. J. 1996. Manual of canine and feline gastroenterology. First Edition. British Small Animal Veterinary Association. Gloucestershire, U.K. pp. 191-220.
30. **SIROIS, M.; ANTHONY, E.** 2002. Clinical Chemistry Applications. Atlantic Coast Veterinary Conference. <<http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings.plx?CID=acvc2002&PID=pr02447&O=VIN>> [consulta: 28-06-2004].
31. **STROMBECK, D.R.; GRIBBLE, D.** 1978. Chronic Active Hepatitis in the dog. J.A.V.M.A. Vol 173 (4):380 – 386.
32. **TABOADA, J.; DIMSKI, D.S.** 1995. Hepatic Encephalopathy: Clinical Signs, Pathogenesis, and Treatment. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. Vol 25(2): 337-354.
33. **TAMS, T. R.** 2001. Liver Disease: Diagnostic Evaluation. Atlantic Coast Veterinary Conference. <<http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings.plx?CID=acvc2001&PID=pr00429&O=VIN>> [consulta: 28-06-2004].

34. **TWEDT, D.C.** 1985. Cirrhosis: A Consequence of Chronic Liver Disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. Vol 15(1): 151-176.
35. **TOBIAS, K. M.** 2002. Portosystemic Shunts: Diagnosis and Medical Management. *Western Veterinary Conference*.  
 <<http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings.plx?CID=wvc2002&PID=pr00949&O=VIN>> [consulta: 28-06-2004].
36. **WILLIAMS, D. A.** 2003. New Information on Bile Acids. *American Collage of Veterinary Internal Medicine*.  
 <<http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings.plx?CID=acvim2003&PID=pr04324&O=VIN>> [consulta: 28-06-2004].
37. **WILLIAMS, L.** 2004. Laboratory evaluation of the liver. *In: Thrall. M. A. 2004. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Pennsylvania. USA. Pp 240-255.
38. **YAPHÉ, W.L.** 2004. Diagnostic of hepatic disease.  
 <<http://www.vin.com/Members/SearchDB/misc/m05000/m04183.htm>> [consulta: 30-06-2004].