



UNIVERSIDAD DE CHILE

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

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ÁCIDOS BILIARES SÉRICOS EN EQUINOS PURA SANGRE CHILENOS

JOSÉ GONZALO VIDAL FAEZ

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

**SANTIAGO, CHILE
2011**

MEMORIA DE TITULO

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ÁCIDOS BILIARES SÉRICOS EN EQUINOS PURA SANGRE CHILENOS”

José Gonzalo Vidal Faez*

*Departamento de Ciencias Clínicas. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. Santa Rosa 11735. La Pintana.

Resumen

Las concentraciones séricas de ácidos biliares totales fueron determinadas en equinos clínicamente sanos pertenecientes a la raza Pura Sangre Chilena (PSCh), a través de un método enzimático colorimétrico, estableciéndose diferencias significativas entre ambos sexos, con un intervalo referencial para hembras de $4,05 \pm 1,28 \mu\text{mol /L}$ y $4,95 \pm 1,50 \mu\text{mol /L}$ para los machos. Las pruebas diagnósticas más comúnmente utilizadas están destinadas a determinar daño hepático, pero no logran ser medidores específicos de alteraciones en la funcionalidad. Dada la necesidad de implementar una prueba diagnóstica de funcionalidad hepática en equinos de manera precoz, sensible y específica, se postula la medición de los niveles de ácidos biliares. El propósito de este estudio, considerando el desconocimiento de estos rangos para esta raza en particular, fue determinar y estandarizar el valor sérico de la concentración de ácidos biliares en equinos PSCh, dada su alta sensibilidad para detectar insuficiencia hepática, de modo de poner a disposición del médico veterinario una herramienta diagnóstica de enfermedad hepatobiliar en combinación con la utilización de otras pruebas convencionales para tales fines, que permita de este modo instaurar el diagnóstico y tratamiento oportuno en equinos que cursen con algún tipo de enfermedad hepática.

Palabras claves: Ácidos biliares, Equino, Hígado, Enfermedad hepatobiliar.

Abstract

Serum total bile acids were determined in clinically healthy horses belonging to the Chilean Horse breed (PSCh), through an enzymatic colorimetric method, establishing significant differences between sex, with a female and male reference range of $4.05 \pm 1.28 \text{ mmol / L}$ and $4.95 \pm 1.50 \text{ mmol / L}$ respectively. The most commonly used diagnostic tests are intended to identify liver damage, but lack to be specific in measuring functional status. Because of the need to establish a sensitive and specific diagnostic test for liver function in horses, we suggest the bile acid test. The aim of this study, was to determine and standardize the serum concentration of bile acids in the Chilean horse breed, due to its high sensitivity in detecting liver failure, so as to make available a diagnostic tool for hepatobiliary disease in combination with the use of other conventional tests for such purposes, thus allowing to establish the diagnosis and treatment in horses that is accompanied by some form of liver disease.

Key Words: Bile acids, Horse, Liver, Hepatobiliary disease.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad hepática en equinos es relativamente frecuente. El identificarla clínicamente requiere aplicar un amplio espectro de exámenes auxiliares guiados por una completa anamnesis y un exhaustivo examen clínico, este último basado en signos tan inespecíficos como anorexia, pérdida de peso, diarrea o constipación, ictericia, encefalopatía, taquicardia, dolor abdominal, edema ventral, ascitis, fasciculaciones musculares, disfagia y fotosensibilidad entre otros (Tennant *et al.*, 1973; West, 1996).

Debido a su compromiso en muchos procesos metabólicos, el hígado está expuesto a lesiones por numerosas infecciones, alteraciones metabólicas y tóxicas (Tennant y Hornbuckle, 1980), por ende se hace necesario, al momento de realizar un diagnóstico e instaurar un tratamiento, diferenciar los términos lesión e insuficiencia. Una lesión no necesariamente cursará con insuficiencia, debido a la gran capacidad de reserva y la habilidad regenerativa que tiene el hígado, dado por la gran capacidad funcional, que hace que muchas de las

patologías sean frecuentemente reversibles (West, 1996).

La mayoría de los signos presentes en una falla hepática aparecen repentinamente, independiente de cual sea la causa o duración de la enfermedad subyacente, generalmente se presentan después de la pérdida de más del 75% de la capacidad funcional del hígado (West, 1996; Divers, 1998), en este caso es imposible distinguir por medio de la examinación clínica entre una hepatitis aguda y una cirrosis crónica (Tennant *et al.*, 1973).

Las pruebas diagnósticas más frecuentemente usadas determinan daño hepático, pero no son medidores específicos de alteraciones en la funcionalidad del órgano. Debido a la necesidad de implementar una prueba diagnóstica de funcionalidad hepática equina de manera precoz y específica, se postula la determinación de los ácidos biliares (ABs) como indicador de dicha funcionalidad (West, 1989), pues el hígado es el único órgano encargado del metabolismo, síntesis, conjugación, transporte y excreción de los mismos; y por lo tanto, la determinación de estos ácidos se considera específica para este

órgano (Anwer *et al.*, 1975). Puesto que en equinos, que padecen de algún tipo de enfermedad hepatobiliar, el hígado pierde la habilidad para extraer y excretar eficientemente los ácidos biliares plasmáticos (West, 1989), observándose en estos ejemplares un rápido aumento en la concentración sérica de ABs entre 24 a 48 horas de iniciada la enfermedad, siempre que comprometa la función del órgano.

La síntesis de ABs a partir de colesterol sucede exclusivamente en el hígado (Center, 1996), siendo estos los principales componentes de la bilis, representando aproximadamente un 85% de los sólidos biliares. La composición de los AB séricos varía mucho entre equinos normales, siendo los principales el ácido quenosoxicólico, el deoxicólico y el ursodesoxicólico (Reed *et al.*, 2005), los cuales tienen como función emulsificar los lípidos presentes en la dieta y solubilizar los productos de la digestión de las grasas (Cunningham, 1999).

Posterior a la síntesis, la mayoría de los ácidos biliares se conjugan en el hígado antes de ser secretados hacia la bilis. En el caballo los ácidos biliares son

conjugados con taurina (Tennant, 1997), a diferencia de otras especies en que son conjugados con glicina (Savage, 2000). Una vez conjugados en el hígado son activamente secretados dentro de los canalículos y son excretados hacia duodeno a través del conducto biliar (Mukhopadhyay y Maitra, 2004). En aquellas especies como los equinos y las ratas, que no presentan vesícula biliar, parece ser que el esfínter de Oddi no es funcional y la bilis se secreta hacia el intestino durante todo el ciclo digestivo (Cunningham, 1999), de este modo, en el caballo, la gran parte de los ácidos biliares secretados son reabsorbidos por el intestino y retornan eficientemente al hígado a través de la circulación portal (Anwer *et al.*, 1975). Esta elevada eficiencia de extracción explicaría las bajas concentraciones sistémicas comparadas con las concentraciones portales, a diferencia de lo ocurrido en otras especies (Hoffmann *et al.*, 1987; Mendel *et al.*, 1988), esto debido a que aproximadamente el 90% del total de estos ácidos biliares se encontrarían confinados a la circulación enterohepática (Gronwall, 1977), circulación que en el equino se produce 38 veces por día (Pearson, 1987; Duncan *et al.*, 2005),

constituyéndose en un indicador sensible de enfermedad hepática (Pearson, 1987); por lo tanto, cualquier disminución en la eficiencia de extracción debida a una disminución en el flujo hepático o daño hepatocelular incrementará las concentraciones sistémicas de los ABs, siendo éste el fundamento para el uso de los ácidos biliares como indicador de disfunción hepática (Engelking y Sawkat, 1999). Por otra parte la ausencia de vesícula biliar en esta especie y los numerosos ciclos enterohepáticos de los ABs descritos en ponies (Anwer *et al.*, 1975), indicarían que no son almacenados, sino que estarían continuamente ciclando, por lo que su concentración sérica no sería afectada por las variaciones diurnas (West, 1989), alimentación (Hoffmann *et al.*, 1987), sexo o edad del ejemplar (West, 1989). En consecuencia se asume que las concentraciones séricas de AB son un mejor indicador del estado funcional del hígado comparado con los estudios tradicionales para tal efecto (West, 1989). 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 (West, 1989). De

acuerdo a diversos autores, la determinación de la concentración de los ABs en sangre constituiría un indicador sensible de enfermedad hepatobiliar como necrosis, lipidosis, neoplasia, colestasis, cirrosis (Hoffmann *et al.*, 1987; Mendel *et al.*, 1988; West, 1989; Kaneko *et al.*, 1992; West, 1996), por lo que la introducción de esta medición en la práctica clínica en combinación con la utilización de otras pruebas convencionales permitiría llegar a un diagnóstico diferencial acabado (Rudolph, 1990; Engelking y Sawkat, 1999), puesto que en el país, dentro de la práctica veterinaria equina, aún no existen pruebas de rutina disponibles para la medición de ABs.

Considerando el desconocimiento de los rangos específicos de ABs para la raza de equinos Pura Sangre chilenos (PSCCh) y ante los escasos y contradictorios rangos de referencia disponibles para otras razas equinas, el propósito de esta investigación consiste en estandarizar el intervalo de referencia para la concentración sérica de ABs totales (ABTs) en equinos Pura Sangre chilenos, como una prueba de diagnóstico de enfermedad hepática, a su vez de establecer las posibles diferencias

significativas entre sexos que pudiesen existir, con el fin de poner a disposición del médico veterinario un método de apoyo al diagnóstico, monitoreo y pronóstico de la funcionalidad hepática.

MATERIALES Y MÉTODOS

La concentración total de ácidos biliares séricos fue determinada en 40 ejemplares Pura Sangre chilenos (PSCh), clínicamente sanos, machos y hembras, de similar condición corporal y peso, con edades que fluctuaron entre cinco y 17 años, todos pertenecientes a tres criaderos de la Región Metropolitana en la zona de Pirque, los cuales fueron sometidos a las mismas condiciones de manejo, alimentación y entrenamiento habituales para esta raza, y que a su vez no recibieron tratamiento médico durante el mes previo al estudio y toma de muestras.

Se descartó preñez y lactancia en las hembras y los ejemplares se encontraban en entrenamiento deportivo al momento del estudio.

Tamaño muestral:

Se determinó para este estudio construir dos grupos. El grupo 1 constituido por ejemplares machos, y el grupo 2 constituido por hembras, para cada grupo fue designado un tamaño muestral de 20 individuos, obteniéndose un total de 40 individuos para la medición.

El tamaño muestral se determinó utilizando el programa InfoStat[®] /Profesional Versión 2004d.1 (Universidad de Córdoba, Argentina), con el fin de detectar diferencias de dos unidades en las mediciones, con un 95% de confianza, un error de 0,05 y una potencia del 90%.

A cada ejemplar le fue asignado un número y una ficha clínica individual, incluyendo los datos obtenidos en el examen clínico y exámenes de laboratorio complementarios.

Las muestras fueron obtenidas de animales clínicamente sanos, estado que fue determinado y confirmado mediante anamnesis, examen clínico y los exámenes de laboratorio complementarios, los cuales entregaron valores que se encontraron dentro de

rangos referenciales fisiológicos normales para esta especie.

Obtención de las muestras:

Las muestras fueron obtenidas con los ejemplares en ayuno y antes de realizar actividad física mediante venipunción yugular con jeringas de 10 ml, cada muestra de sangre fue distribuida para análisis de bioquímica sanguínea, hemograma y determinación sérica de ABTs.

El traslado de las muestras se realizó dentro de dos horas a partir de su obtención, fueron conservadas refrigeradas y en un contenedor especialmente habilitado para este fin.

Los tubos fueron trasladados al Laboratorio de Química Clínica Especializada (LQCE), División Veterinaria, donde las muestras fueron procesadas.

Determinación de Ácidos biliares totales (ABTs):

La cuantificación de la concentración sérica de ácidos biliares totales (ABT), fue determinada a través de la prueba enzimática cíclica para ácidos biliares

totales por medio del kit enzimático colorimétrico DZ042A (Diazyme[®] - DZ042A, San Diego, EUA). En presencia de Tio-NAD, la enzima 3alfa hidroxisteroide deshidrogenasa convierte los ácidos biliares en 3 cetoesteroides y Tio-NADH. La tasa de formación de Tio-NADH está determinada por el cambio de absorbancia a 405nm, medida entre los 60 y 120 segundos de la reacción. La lectura del Thio-NADH formado fue detectada por espectrofotometría, realizada en el espectrofotómetro UV-Visible (uv-1650pc Shimadzu- Scientific Instruments-Inc-Japan).

Análisis estadístico

Para la determinación del intervalo de referencia de los valores de ácidos biliares totales en equinos PSCh, fue utilizada la *Prueba de t de Student*, establecida para un 95% de confianza, con un alfa = 0,05, una potencia de 90%, y considerando dos desviaciones estándar; límite mínimo y máximo, además las diferencias entre sexos fueron analizadas mediante un análisis descriptivo a través de histogramas construidos a partir de la distribución de frecuencias dentro de la población.

Fig 1a . Histograma de Distribución de frecuencias de los valores de ácidos biliares totales (ABs $\mu\text{mol/L}$) en ejemplares machos PSCh.

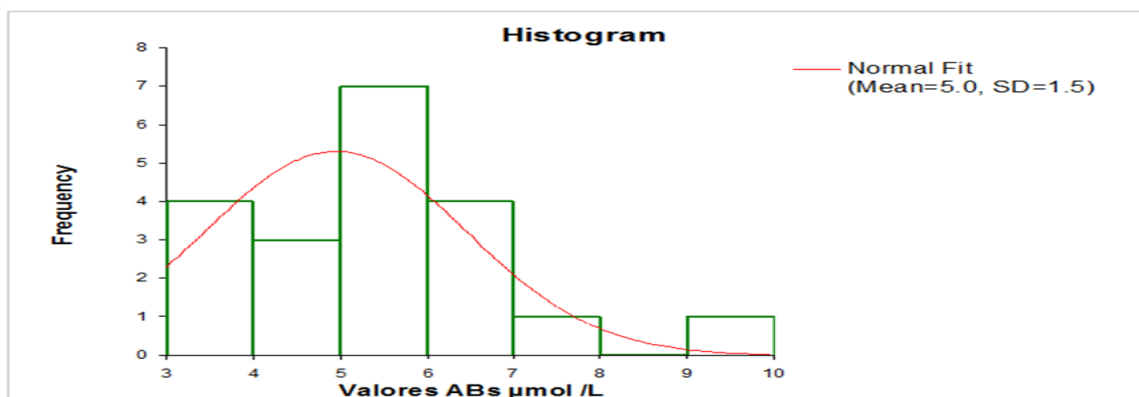
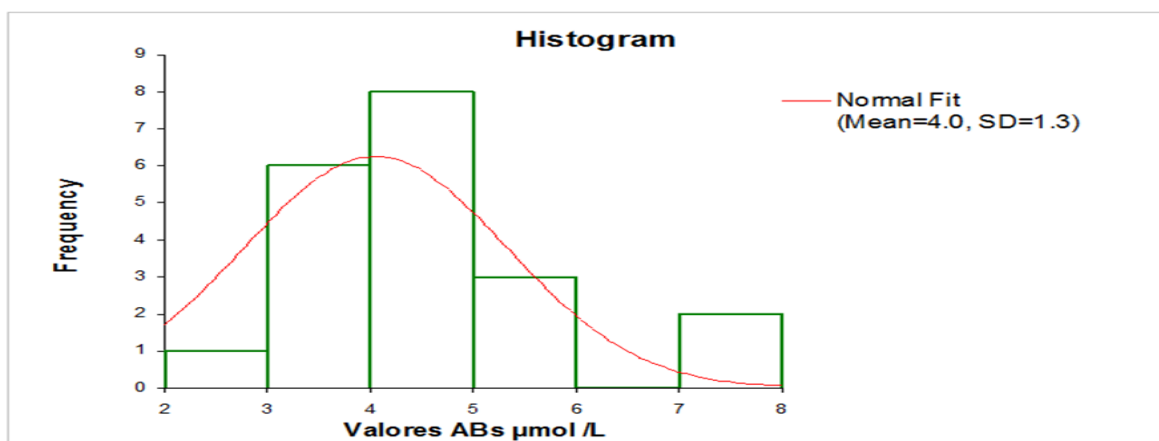


Fig 1b . Histograma de Distribución de frecuencias de los valores de ácidos biliares totales (ABs $\mu\text{mol/L}$) en ejemplares hembras PSCh.



Diferencias entre sexos con un $p < 0,05$, fueron consideradas estadísticamente significativas.

RESULTADOS

Los intervalos de referencia de los niveles de ABs en equinos PSCh construidos a través del análisis estadístico (ANEXO 1), y descriptivo (Figs 1a; 1b) a partir de

los datos obtenidos en ambos grupos de animales, estableció un intervalo de referencia de ABs de $4,95 \pm 1,50 \mu\text{mol/L}$ (Fig 1a) para machos, y de $4,05 \pm 1,28 \mu\text{mol/L}$ (Fig 1b) para hembras pertenecientes a la raza Pura Sangre Chilena, encontrándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos grupos de ejemplares.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Actualmente en la práctica veterinaria el diagnóstico de enfermedad hepatobiliar y determinación de la funcionalidad hepática puede ser obtenido a través de tres tipos de pruebas diagnósticas; para tales fines, el médico veterinario dispone del análisis bioquímico y hematológico sérico, biopsia hepática, e imagenología por medio de ultrasonografía trans-abdominal (Gossett y French, 1984; Rantanen, 1986; West, 1996; Durham *et al.*, 2003). El diagnóstico de enfermedad hepatobiliar por medio de la bioquímica sérica esta basado principalmente en la evaluación de la actividad sérica de las enzimas gamma-glutamil transferasa, sorbitol deshidrogenasa, bilirrubina sérica y concentración de los niveles de ácidos biliares plasmáticos, los cuales constituyen los mejores indicadores de enfermedad hepatobiliar (Divers *et al.*, 1988; West, 1989; Durham *et al.*, 2003). Estudios indican que la medición de los niveles de ácidos biliares plasmáticos provee de valor diagnóstico al momento de interpretar los test de rutina en la detección de enfermedades hepatobiliares, debido a que en todas las formas de enfermedades hepáticas en

equinos esta concentración de ácidos biliares se ve incrementada precozmente, presentando una alta sensibilidad y ausencia de falsos positivos (Frosch y Wagener , 1967 ; Bouchier y Pennington ,1978; Hoffmann *et al.*, 1987; Mendel *et al.*, 1988; West, 1989; Kaneko *et al.*, 1992), siendo de este modo de un gran valor diagnóstico como prueba hepática de rutina, en la detección de todas las manifestaciones de enfermedades hepatobiliares presentes en equinos (Bouchier y Pennington ,1978).

Se describe que la concentración normal descrita de ácidos biliares en equinos debe ser menor de 15 $\mu\text{mol /L}$ (Pearson, 1987),algunos autores establecen un rango de 8,8 \pm 2.1 $\mu\text{mol/L}$ (West, 1989) incluso en ponies se han descrito concentraciones de 12,9 \pm 1,2 $\mu\text{mol/L}$ (Reed *et al.* , 2005), y cuando exceden este valor se considera que podrían estar indicando algún tipo de enfermedad hepática.

Según estudios de medición de los niveles séricos de ABT en caballos que padecen de enfermedad hepatobiliar, han establecido que una concentración >20 $\mu\text{mol /L}$ podría ser considerado un buen

indicador de enfermedad hepatobiliar con un pronóstico desfavorable (Pearson y Cring, 1993). Si bien existe una serie de valores referenciales para la medición sérica de ABTs descritos en esta especie, muchos de ellos son contradictorios, y extremadamente amplios como lo describe Kaneko, estableciendo un intervalo referencial de 5 a 28 $\mu\text{mol /L}$, que constituye uno de los valores más utilizados actualmente en la clínica veterinaria.

En este estudio se estandarizó un intervalo de referencia para individuos clínicamente sanos, que osciló entre 4,95 \pm 1,50 $\mu\text{mol /L}$ para los ejemplares machos (**Fig 1a**), y un valor de 4,05 \pm 1,28 $\mu\text{mol /L}$ para las hembras (**Fig 1b**) pertenecientes a la raza Pura Sangre chilena.

Si bien los escasos estudios de medición de ABs indican que no existirían diferencias significativas entre ejemplares de diferentes edades y sexo (West ,1989), en este estudio fue posible establecer que dicha diferencia entre sexos estaría presente ($p < 0,05$).

La causa que explicaría el efecto del sexo sobre los valores de ABs se desconoce, por lo que se hace necesario profundizar

en estudios conducentes a determinar tal efecto así como la funcionalidad hepática de estos individuos, de modo de disponer de un mayor número de herramientas complementarias, que permitan al médico veterinario realizar un diagnóstico precoz y certero, aumentando así las posibilidades de instaurar un tratamiento adecuado que lleve a la pronta recuperación del individuo.

Si bien este estudio es el primero a realizarse en la raza Pura Sangre chilena, estableciéndose un intervalo referencial bastante estrecho en sus valores en comparación a otros estudios realizados en otras razas, se hace necesario implementar nuevas investigaciones acerca del funcionamiento del metabolismo hepático en estos ejemplares, que logren solventar alguna explicación satisfactoria para dilucidar las diferencias entre sexos e inter-raciales, de modo de lograr un entendimiento más acabado en esta raza.

Agradecimientos

Al Dr. Enrique Pinto por su ayuda, preocupación, y dedicación constante durante el desarrollo de este estudio y de los últimos años de mi carrera.

A mis padres y hermanos, por todo el amor que me han entregado siempre y a Daniela, por su amor y ayuda, sin la cual este estudio nunca se hubiese realizado.

ANEXO 1. Concentración sérica de ácidos biliares totales ($\mu\text{mol/L}$) en equinos Pura Sangre Chilenos (PSCh)

Concentración sérica de ABT expresadas en $\mu\text{mol /L}$		
n° ejemplar	Sexo individuos	
	Machos (M)	hembras (H)
1	5	4
2	5	3
3	6	5
4	4	4
5	7	4
6	4	4
7	6	3
8	3	3
9	5	7
10	5	7
11	3	4
12	4	2
13	5	4
14	6	5
15	5	3
16	5	5
17	6	3
18	3	3
19	9	4
20	3	4
N	20	20
n total	40	
Media	4,95 a	4,05 b
Media M/H	4,5	
Mediana	4 a	5 b
Mediana M/H	4	
D E	1,5	1,28
D E M/H	1,45	
Mínimo	3	2
Máximo	9	7

DE= desviación estándar ABT= ácidos biliares totales n= tamaño muestral
a, b =letras distintas en columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)
entre los diferentes grupos (M/H).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

-ANWER, M.S.; GRONWALL, R.R.; ENGELKING, L.R.; KLENTZ, R.D. 1975.

Bile acids kinetics and bile secretion in the pony. American Journal of Physiology. 229: 592-597.

-BOUCHIER, I. A.; PENNINGTON, C.R. 1978. Serum bile acids in hepatobiliary disease. Gut, 19: 492-496.

-CENTER, S.A. 1996. Pathophysiology of liver disease: Normal and abnormal function.

In: Guilford, W.; Center, S.A.; Strombeck, D.R.; Williams, D.A. Strombeck's Small Animal Gastroenterology. Third Edition. Saunders Company. Philadelphia, USA. pp. 553 – 632.

-CUNNINGHAM, J. 1999. Digestión y Absorción: los procesos no fermentativos. **In:**

Fisiología Veterinaria. 2ª ed. McGraw Hill Interamericana. D.F, México. pp. 326 - 337.

-DIVERS, T.J.; BERNARD, W.V.; REEF, V.B. 1988. Equine disease and liver failure-

causes, diagnosis and treatment. **In:** Proceedings of the 10th Bain- Fallon Memorial Lecture Equine Diagnostics and Therapeutics. Equine Veterinarians Australia. Artarmon, Australia. pp. 35-46.

-DIVERS, T.J. 1998. Metabolic manifestations of hepatobiliary disease in horse. **In:** T.

Watson (ed), Metabolic and Endocrine Problems of the Horse. W.B. Saunders, Harcourt Brace and Company Ltd., London . pp. 113-127.

-DUNCAN, R.J.; LATIMER, K.S.; MAHAFFEY, E.A.; PRASSE, K.W. 2005. Duncan and Prasse's Patología Clínica Veterinaria. 4ª ed. Multimédica. Sant Cugat del Vallés, España. pp. 248 - 259.

-DURHAM, A.E.; NEWTON, J.R.; SMITH, K.C.; HILLYER, M.H.; HILLYER, J.L.L.; SMITH, M.R.W.; MARR, C.M. 2003. Retrospective analysis of historical, clinical, ultrasonographic, serum biochemical and haematological data in prognostic evaluation of equine liver disease. Equine Veterinary Journal. 35 (6): 542-547.

-ENGELKING, L.R.; SAWKAT, M. 1999. Hígado y Árbol Biliar. **In:** Gastroenterología Veterinaria. 2ª ed. Intermédica. Pennsylvania, USA. pp. 195 – 253.

-FROSCH, B.; WAGENER, H. 1967. Quantitative determination of conjugated bile acids in serum in acute hepatitis. Nature, 213: 404-405.

-GOSSETT, K.A.; FRENCH, D.D. 1984. Effect of age on liver enzyme activities in serum of healthy Quarter Horse. American Journal of Veterinary Research. 45 (2): 354-6.

-GRONWALL, R. 1977. Plasma Bile Acids. In: Proceedings of the First International Symposium in Equine Hematology. American Association of Equine Practitioners, pp. 255-257.

-HOFFMANN, W.E.; BAKER, G.; RIESER, S.; DORNER, J.L. 1987. Alterations in selected serum biochemical constituents in equids after induced hepatic disease. American Journal of Veterinary Research. 48(9): 1.343-1.347.

-KANEKO, J.J.; RUDOLPH, W.G.; WILSON, D.W.; CARLSON, G.P. 1992. Bile acid fractionations by high performance liquid chromatography in equine liver disease. Veterinary Research Communications. 16: 161-172.

-MENDEL, V.E.; WITT, M.R.; GITCHELL, W.S.; GRIBBLE, D.N.; ROGERS, Q.R.; SEGALL, H.J.; KNIGHT, H.D. 1988. Pirrolizidine alkaloid-induced liver disease in horses: An early diagnosis. American Journal of Veterinary Research. 49(4): 572-578.

-MUKHOPADHYAY, S.; MAITRA, U. 2004. Chemistry and biology of bile acids. Current Science. 87 (12): 1666 – 1683

-PEARSON, E.G. 1987. serum bile acids for diagnosis of chronic liver disease in horse. **In:** Proceedings 5th of annual forum American College of Veterinary Internal Medicine . pp. 71-76.

-PEARSON, E.G.; CRAIG, A.M. 1993. Serum bile acids for diagnosis of chronic liver disease in horse. Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine. 4: 1071-1075.

-RANTANEM, N.W. 1986. Diseases of the liver. Veterinary Clinics of North America; Equine Practice. 2: 105-114.

-**REED, S.; BAYLY, W.M; SELTON, D.C.** 2005. Alteraciones del Aparato Gastrointestinal. **In:** Medicina Interna Equina. 2ª ed. Inter-Médica. Buenos Aires, Argentina. pp. 1065 – 1072.

-**RUDOLPH, W.G.** 1990. Los ácidos biliares y su aplicación al diagnóstico de las afecciones hepáticas en los animales domésticos. Archivos de Medicina Veterinaria. 22(1): 7-15.

-**SAVAGE, C.J.** 2000. Patología Clínica. **In:** Secretos de la Medicina de Equinos. 1ª Ed. Interamericana McGraw Hill. D.F, México. pp. 38 – 48.

-**TENNANT, B.C.; EVANS, C.D.; SCHWARTZ, L.W.; GRIBBLE, D. H.; KANEKO, J.J.** 1973. Equine Hepatic Insufficiency. Veterinary Clinics of North America. 3: 279-289.

-**TENNANT, B.C.; HORNBUCKLE, W.E.** 1980. **In:** Anderson .NV: ed.Veterinary Gastroenterology. Lea and Febiger Philadelphia, USA. pp.593-620.

-**TENNANT .B.** 1997. hepatic function. **In:** clinical biochemistry of domestic animals, 5th ed. Kaneko. J, Harvey. J, Bruss, M (eds.). Academic Press. San Diego, California, USA. Pp. 327-349.

-**WEST, H.J.** 1989. Evaluation of total plasma bile acid concentrations for the diagnosis of hepatobiliary disease in horses. Research in Veterinary Science. 46: 264-270.

-**WEST, H.J.** 1996. Clinical and Pathological Studies in horse with hepatic disease. Equine Veterinary Journal. 28 (2): 146-156.