



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

**CARACTERIZACIÓN DE INMUNOGLOBULINEMIA EN POTRILLOS
FINA SANGRE DE CARRERA PERTENECIENTES A UN HARAS DE LA
ZONA SUR DE CHILE**

Nayma Jerman Alfaro Medina

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

Profesor Guía: Dr. Enrique Antonio Pinto Peña
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

Financiado por Laboratorio de Química Clínica Especializada

SANTIAGO, CHILE
2018



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

**CARACTERIZACIÓN DE INMUNOGLOBULINEMIA EN POTRILLOS
FINA SANGRE DE CARRERA PERTENECIENTES A UN HARAS DE LA
ZONA SUR DE CHILE**

Nayma Jermen Alfaro Medina

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

Nota Final

Profesor Guía Enrique Pinto Peña

Profesor Corrector Adolfo Godoy Pinto

Profesor Corrector Lorena Aguilar Guzmán

Financiado por Laboratorio de Química Clínica Especializada

Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias

SANTIAGO, CHILE

2018

AGRADECIMIENTOS

A Olga, mi madre y Luis, mi padrino, quien ha sido como mi padre. Este logro es nuestro, sin ustedes no hubiese llegado hasta acá. A mi madre le debo su amor y apoyo incondicional, que a pesar de tus problemas de salud siempre logras salir adelante para seguir ayudándome, eres quien me ha enseñado a ser una mujer de palabra y has tratado de darme siempre lo mejor, contigo he compartido mis alegrías y mis tristezas. A mi padrino, por siempre darme su enorme cariño y preocupación, por consentirme desde que era niña con juguetes y sigues haciéndolo incluso ahora que crecí, ahora apoyándome si quiero realizar algún curso y siempre velar porque no me falte nada, atesorar tus detalles donde me demuestras tu cariño, como el simple hecho de preocuparte de que no me quede hasta tarde estudiando o incluso arreglar mis cosas para cuando tenía turno. Ambos han dado lo mejor de sí mismos, para hacer de mí una buena persona. Los amo, son todo para mí. La vida me premió con una familia como la nuestra.

A mi maestro, el Dr. Enrique Pinto. Por formarme profesional y personalmente, además de regalarme su linda amistad. Le debo el cariño, la confianza, los consejos y los bonitos recuerdos que me ha entregado a lo largo de mi formación. Sin duda se ha ganado toda mi admiración y respeto por el tremendo docente y persona que es. Gracias por inculcarme valores, que sin ellos nunca se puede aspirar a ser un buen profesional si es que no se es buena persona primero y mejorar mi calidad humana. Si bien con esta memoria nos haremos colegas, siempre será mi “profe”. Me siento afortunada de que me haya formado, ya que cada cosa que he aprendido, es gracias a usted. Lo quiero mucho.

A Maritza, por ser como mi segunda madre y siempre preocuparse de mí.

A mis amigos Marcela, Nicsia, Camilo, Consuelo, Daniela. Por siempre apoyarme cuando lo he necesitado, por todos los lindos momentos que marcaron mi etapa universitaria, debido a que ustedes se encontraban en ellos. Gracias por siempre creer en mí. A mis amigos ya titulados: Nicole, Christian, Karina y Fabrizio. Quienes me han ayudado en todo este proceso, solucionando dudas, entregando conocimientos y un gran apoyo cada vez que lo he necesitado, ya sea profesional o personalmente. Son tremendos.

Al Dr. Claudio Omón, por hacer posible la realización de este estudio en el Haras Don Alberto, por su tremenda disposición de ayudarme en la toma de muestras y aclarar dudas. Fue una ayuda fundamental para que esto resultara, junto al personal del haras.

A Mariana Díaz, por su infinita paciencia asesorándome en la parte estadística de este estudio, ayudarme con cada duda que me surgió y por tener una voluntad de oro.

Al Dr. Pablo Espinoza del Laboratorio LQCE, por permitirme realizar este estudio con ustedes, y a Katherine Montoya (Bioquímica) por solucionar mis dudas respecto a las técnicas realizadas para la obtención de los resultados de este trabajo.

A mis profesores correctores, el Dr. Adolfo Godoy y la Dra. Lorena Aguilar, por ayudarme en todo este proceso.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	iv
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
IgM	6
IgG.....	7
IgE	8
IgA.....	9
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Obtención de muestras.....	11
Procesamiento y Análisis de Muestra.....	11
Análisis Estadístico	12
RESULTADOS.....	13
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIÓN.....	28
BIBLIOGRAFÍA.....	29
ANEXO	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM e inmunoglobulinas totales) en potrillos FSC entre cuatro y seis meses de edad	13
Tabla 2. Frecuencia para la concentración de IgA (mg/dL).	14
Tabla 3. Frecuencia para la concentración de IgG (mg/dL).	14
Tabla 4. Frecuencia para la concentración de IgM (mg/dL).....	15
Tabla 5. Frecuencia para la concentración de inmunoglobulinas totales (mg/dL).	15
Tabla 6. Comparación de la concentración de inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM e inmunoglobulinas totales) entre equinos hembras y machos, FSC entre cuatro y seis meses de edad.....	16
Tabla 7. Intervalos de referencia de la media para IgA, IgG, IgM e inmunoglobulinas totales.....	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La concentración de inmunoglobulinas no presenta diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras.	17
Figura 2. No existe una relación lineal entre los valores de inmunoglobulinas séricas totales y proteínas séricas totales.	19

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue caracterizar las concentraciones de los isotipos de inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgG e IgM) presentes en potrillos Fina Sangre de Carrera (FSC) de entre cuatro a seis meses de edad. Tal caracterización consistió en determinar la concentración de las inmunoglobulinas en los potrillos, comparar la concentración según sexo, establecer valores de referencia de inmunoglobulinas para los potrillos del estudio y correlacionar los niveles de inmunoglobulinas séricas totales con los niveles de proteínas séricas totales. El estudio fue realizado en el haras Don Alberto y se utilizó un total de 60 individuos. A cada potrillo se le extrajo 7 mL de sangre, para medir las inmunoglobulinas, realizar un perfil bioquímico y hemograma para asegurar que estuviesen clínicamente sanos. Los resultados de las inmunoglobulinas fueron sometidos a un análisis exploratorio de datos, se utilizaron intervalos de confianza asociados a prueba de T-Student, análisis de varianza de una vía con test de Tukey, correlación de Pearson y regresión lineal. En todo el estudio se utilizó un $p < 0,05$. Los valores de las inmunoglobulinas obtenidos resultaron ser distintos a los existentes en la literatura para equinos adultos. Los niveles de IgE no se pudieron determinar debido a la escasa concentración, lo cual fue asociado a la edad de los ejemplares. No se observaron diferencias en su concentración atribuibles al sexo, lo que también puede explicarse por la edad de los potrillos. Finalmente, no hubo correlación entre los valores de inmunoglobulinas séricas totales y proteínas séricas totales, que puede asociarse a que las variaciones en los valores de inmunoglobulinas podrían ser atribuidas al reciente desarrollo del sistema inmune del potrillo y no repercutirían significativamente en los valores de proteínas séricas totales. El tamaño muestral del estudio no permite considerar estos resultados como valores de referencia para la especie, y por lo tanto sólo podrían ser utilizados para el haras Don Alberto, aunque serán de gran utilidad, ya que no existe esta información para la etapa etaria de equinos FSC de este estudio.

Palabras clave: inmunoglobulinas, isotipos, IgA, IgE, IgG, IgM, equinos, potrillos, Fina Sangre de Carrera.

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the values of the immunoglobulins isotypes (IgA, IgE, IgG and IgM) present in Thoroughbred foals between four to six months old. Such characterization consisted in determine the concentration of immunoglobulins in the foals, compare the concentration according to sex, establish reference values of immunoglobulins for foals for the foals of the study and correlate the levels of total serum immunoglobulins with the levels of the total serum proteins. The study was carried out at haras Don Alberto and a total of 60 individuals were used. 7 mL of blood were extracted per foal and poured, to measure the immunoglobulins, perform a biochemical profile and blood count to ensure that they were clinically healthy. The immunoglobulins results were subjected to an exploratory data analysis, confidence intervals associated with T-Student test, one-way analysis of variance with Tukey test, Pearson correlation and linear regression were used. For the whole study $p < 0.05$ was used. The values of the immunoglobulins obtained were found turned out to be different to those existing in the literature for adult horses. IgE levels could not be measured due to the low concentration associated with the age of the specimens. There were no differences in their concentration attributable to sex, which can also be explained by the age of the foals. Finally, there was no correlation between the values of total serum immunoglobulins and total serum proteins, which may be associated with the fact that variations in the immunoglobulin values could be attributed to the recent development of the foal's immune system and would not have a significant effect on total serum protein values. The sample size of the study does not allow to consider these results as reference values for the species, and therefore they could only be used by haras Don Alberto, although they will be very useful, since this information does not exist for the equine age stage and breed of this study.

Key words: immunoglobulins, isotypes, IgA, IgE, IgG, IgM, horses, foals, thoroughbred.

INTRODUCCIÓN

La integridad del sistema inmune es crucial para una neutralización efectiva de patógenos y toxinas, por lo que algún defecto en uno o más componentes de este sistema puede llevar a serias y algunas veces fatales, inmunodeficiencias (Camargo *et al.*, 2009).

Actualmente existe una variedad de pruebas serológicas que utilizan suero o plasma, permitiendo al clínico, en este caso de equinos, apoyar su diagnóstico frente a enfermedades infecciosas. La serología se define como la detección de anticuerpos dirigidos en contra de un epítipo de algún agente patógeno en el suero o plasma de un paciente. Dentro de las ventajas de realizar estas pruebas se encuentran: la facilidad de muestreo (sólo se necesita una muestra de sangre), la información que otorgan acerca del funcionamiento del sistema inmune humoral, la capacidad de establecer tiempos de infección, y su fácil disponibilidad en laboratorios diagnósticos, proveyendo resultados rápidos y a menudo, de bajo costo (Zimmerman y Crisman, 2008).

Dado que el tener exámenes complementarios que ayuden a evaluar el sistema inmune es una gran herramienta frente a distintos cuadros, toma gran importancia el tener una aproximación de los valores referenciales que sirven de orientación.

En la actualidad se han descrito las concentraciones de isotipos de inmunoglobulinas en los equinos adultos, existiendo variaciones según raza; sin embargo, la gran mayoría de los estudios se enfocan en determinar sólo ciertos isotipos dependiendo de los objetivos de éstos. En lo que a potrillos se refiere, aún existe falta de información, puesto que la determinación de inmunoglobulinas se ha realizado principalmente en neonatos y no en potrillos de otras edades.

El objetivo del presente estudio es caracterizar la concentración de los isotipos de inmunoglobulinas en potrillos Fina Sangre de Carrera (FSC) entre cuatro y seis meses de edad, pertenecientes a un haras de la zona sur de Chile, estableciendo valores referenciales de utilidad para la práctica clínica.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El sistema inmune es una red integrada que se compone por varios tipos de células como lo son varias citoquinas y ciertas proteínas plasmáticas que funcionan en sinergia para eliminar agentes infecciosos (bacterias, parásitos, hongos, entre otros) y antígenos nocivos (Harvey, 2012).

El sistema inmune está compuesto por las respuestas innatas y adaptativas, cada una de ellas mediada por componentes celulares y solubles. Las principales diferencias entre ellas radican en la especificidad y la capacidad de memoria que caracteriza a la respuesta adaptativa (Lunn y Horohov, 2004).

La inmunidad innata responderá de la misma manera y con los mismos tiempos frente a un daño repetido por un organismo invasor. Se desencadena producto de que la composición química de los microorganismos invasores difiere de los componentes de las células propias del cuerpo. Esta inmunidad está compuesta por neutrófilos, basófilos, eosinófilos, macrófagos, mastocitos y células *natural killer* (NK), junto con el sistema del complemento, enzimas como la lisozima y proteínas de unión a carbohidratos que promueven la destrucción microbiana. Si esta respuesta no es capaz de controlar la invasión, interviene la respuesta adaptativa (Harvey, 2012).

La respuesta inmune adaptativa es mediada por linfocitos T o B. Estas células del sistema inmune provienen de las células madres hematopoyéticas que durante la etapa embrionaria se encuentran dentro de la médula ósea (Lunn y Horohov, 2004; Bevilaqua, 2016), y comprenden los progenitores linfoides comunes, que dan origen a las células *natural killer* (NK), linfocitos B y T (Bevilaqua, 2016).

Bajo la influencia del timo, equivalente equino de la bursa de Fabricio y médula ósea, la progenie de células precursoras se diferencian en linfocitos T y B, respectivamente (Crisman y Scarratt, 2008). La respuesta inmune adaptativa consiste en mecanismos efectores humorales y celulares. El componente humoral está mediado por las inmunoglobulinas o anticuerpos encontrados en el plasma y en líquidos tisulares. Los anticuerpos son producidos por linfocitos B, que son pequeñas células linfoides que se

caracterizan por expresar moléculas de inmunoglobulinas en su superficie celular (Lunn y Horohov, 2004).

Los receptores antígeno-específicos de las células B son anticuerpos o inmunoglobulinas que se encuentran unidos a la superficie celular. Una molécula de anticuerpo está compuesta por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas que forman una molécula con forma de "Y" unidas por puentes disulfuro. La cadena ligera puede dividirse en dos dominios: uno carboxi-terminal conservador y otro amino-terminal muy variable. El análisis de las cadenas pesadas revela una estructura de dominio similar con un dominio amino-terminal muy variable y la presencia de tres dominios constantes. La región de enlace con el antígeno correspondiente a la porción de la molécula de anticuerpo formada por la asociación de terminales amino de una cadena ligera y una pesada, mientras que el extremo carboxilo de una cadena pesada determina el isotipo de la molécula (Lunn y Horohov, 2004). Existen varias cadenas pesadas diferentes que son: α , γ , ϵ , μ y δ que generarán IgA, IgG, IgE, IgM e IgD, respectivamente (Tizard, 2009).

En el inicio de una respuesta inmune, los linfocitos B inmaduros secretarán grandes cantidades de IgM, pero después de la exposición frente a un antígeno, el linfocito B se activa y cambiará el isotipo de su cadena pesada. Consiste en reemplazar la región constante de una cadena pesada por otra (Lunn y Horohov, 2004).

Los genes que codifican las cinco regiones diferentes constantes de la cadena pesada están ordenados secuencialmente en el cromosoma (C- δ , C- μ , C- γ , C- ϵ y C- α). Al producirse el cambio de isotipo sólo cambia el dominio constante de la cadena pesada y no implica un cambio en el efecto sobre la especificidad para un antígeno. En este proceso participan los linfocitos T, mediante la producción de citoquinas, por ejemplo, la IL-4 que induce el cambio en el linfocito B para que sintetice IgE, por el contrario el interferón- γ (INF- γ) bloquea esta inducción y aumenta la producción de IgG. Finalmente, los linfocitos B que ya fueron activados tienen dos opciones: pueden transformarse en células plasmáticas secretoras de anticuerpos con una corta vida o en células B de memoria con una vida prolongada (Lunn y Horohov, 2004).

El desarrollo del sistema inmune equino ocurre durante la vida fetal, en donde los linfocitos T funcionales se encuentran presentes a los 100 días de gestación y los linfocitos B funcionales se encuentran a los 200 días de gestación (Crisman y Scarratt, 2008). Esto sugiere que los potrillos normales son inmunocompetentes al nacer (Giguère y Polkes, 2005; Franco y Oliver-Espinosa, 2016; Freccero *et al.*, 2017; Crisman y Scarratt, 2008) a pesar de ser hipogamaglobulinémicos, con una concentración sérica de IgG casi ausente, ya que sus inmunoglobulinas autólogas no son significativamente detectables en suero hasta aproximadamente los dos meses de edad. Más aún, Ahoki *et al.* (2013) afirman que los potrillos nacen agamaglobulinémicos, dada su escasa concentración de inmunoglobulinas. Todo lo anterior se debe a que esta especie desarrolla una placenta epiteliocorial no invasiva, placentación que no permite ninguna transferencia de inmunoglobulinas desde la madre hacia el feto durante la gestación (Wagner *et al.*, 2006). Sin embargo, Giguère y Polkes (2005) afirman que la producción de inmunoglobulinas es detectable en el suero de los fetos mayores de 185 días, y la concentración de IgM es de aproximadamente 16 mg/dL en potrillos recién nacidos y sin mamar. Con respecto a la concentración de IgG, mencionan que es normalmente baja y lo que refleja es el grado de estimulación antigénica en el útero, determinándose una concentración sérica de entre 0,2 a 17 mg/dL en potrillos neonatos y que no han ingerido calostro (Giguère y Polkes, 2005).

La inmunidad humoral inicial es provista por las inmunoglobulinas adquiridas pasivamente por consumo de calostro dentro de las primeras 24 horas de vida. Los anticuerpos maternos son considerados mediadores importantes de la inmunidad pasiva que se le provee a los potrillos, protegiéndolos de infecciones hasta que el sistema inmune propio produzca cantidades suficientes de anticuerpos (Wagner, 2006).

La absorción de macromoléculas, incluyendo las inmunoglobulinas, ocurre por pinocitosis, siendo un proceso eficiente en las primeras tres a seis horas de vida, disminuyendo hasta una eficiencia mínima a las 20 horas (Franco y Oliver-Espinosa, 2016).

El consumo de calostro en potrillos normales ocurre dentro de las primeras dos horas después del nacimiento, y los anticuerpos maternos pueden ser detectados entre las cuatro y seis horas posteriores en el suero del neonato (Franco y Oliver-Espinosa, 2016). Además se cree que existen otros componentes importantes en el calostro como el factor de

crecimiento epidermal, el cual estimula el desarrollo intestinal y ayuda en la transferencia de anticuerpos (Andruskevich *et al.*, 2013).

Se describen en la literatura diferentes factores que pueden influenciar de forma negativa la absorción neonatal de inmunoglobulinas calostrales, resultando en una falla en la transferencia pasiva (FTP) de éstas (Franco y Oliver-Espinosa, 2016). Los factores pueden ser de la yegua o del potrillo; los primeros pueden incluir problemas como la mala calidad del calostro en yeguas viejas, lactancia prematura o una producción baja secundaria a una gestación prolongada por intoxicación con festuca; mientras que los factores del potrillo pueden ser una inhabilidad para pararse, tener un reflejo de succión disminuido o una pobre absorción por un cierre prematuro del tracto gastrointestinal (Sturgill y Horohov, 2010). La FTP de inmunoglobulinas está asociada con un mayor riesgo de infección y de muerte, afectando entre un 10 a 20% de los potrillos. Los potrillos con transferencia pasiva adecuada tienen niveles de concentración de IgG séricos mayores a 800 mg/dL, por lo que una FTP es total cuando los niveles van entre 200 y 400 mg/dL y parcial cuando los valores están entre 400 y 800 mg/dL (Fouché *et al.*, 2014).

El calostro equino es rico en IgG, y contiene IgM e IgA en menores proporciones (Freccero *et al.*, 2017; Giguère y Polkes, 2005). Las concentraciones séricas de IgA e IgM materna decaen rápidamente, teniendo vidas medias entre tres y cinco días, siendo indetectables en la mayoría de los potrillos entre las tres a cuatro semanas de edad. El número de linfocitos circulantes aumenta linealmente entre los tres y seis meses, período que coincide con el aumento de concentración de IgG e IgM séricas, sugiriendo la activación del sistema inmune humoral del potrillo. En presencia de transferencia de inmunidad pasiva, la producción de IgG e IgA llega a niveles comparables con adultos cerca de las ocho a 12 semanas de edad. Para muchos patógenos importantes, la concentración de los anticuerpos maternos en potrillos cae a niveles no protectivos a los dos o tres meses (Giguère y Polkes, 2005). Si bien el vacunar a un potrillo activaría la producción de anticuerpos, se ha demostrado que la interferencia materna realiza un *clearance* de los antígenos de la vacuna antes de que el sistema inmune del potrillo pueda responder (Sturgill y Horohov, 2010). En la influenza equina y el tétanos, los anticuerpos maternos pueden persistir hasta aproximadamente los seis meses de edad en potrillos nacidos de yeguas vacunadas en los

últimos dos meses de preñez, lo que se ve interferido en potrillos vacunados antes de alcanzar esa edad, evitando una adecuada respuesta inmune (Giguère y Polkes, 2005). Es por esta razón que la *American Association of Equine Practicioners* (AAEP) recomienda que la mayoría de las vacunas deberían aplazarse hasta que el potrillo tenga entre cuatro a seis meses de edad (Sturgill y Horohov, 2010).

Así también, los potrillos viven en ambientes con una gran cantidad de patógenos, muchos de los cuales son capaces de producir alguna enfermedad. Los desórdenes inmunológicos, dentro de ellos la inmunodeficiencia, son relativamente comunes en estos animales, en comparación con la ocurrencia en equinos adultos (Giguère y Polkes, 2005). La inmunodeficiencia se define como un estado en el cual la habilidad del sistema inmune de prevenir las enfermedades infecciosas se encuentra comprometida o completamente ausente (Crisman y Scarratt, 2008). El grupo más prevalente de inmunodeficiencias que se han descrito en la literatura se relaciona con los linfocitos B y se han descrito en humanos, caninos, felinos, equinos y bovinos. Este tipo de inmunodeficiencias se caracteriza por una producción inadecuada o bajos niveles de una o más clases de inmunoglobulinas (Camargo *et al.*, 2009), destacándose la importancia de evaluar los valores de cada isotipo frente a la sospecha de alguna patología.

Isotipos de inmunoglobulinas

IgM

Es la primera inmunoglobulina producida por los fetos, responsable de la respuesta inmune primaria frente a un antígeno extraño, teniendo un rol específico en la activación del sistema del complemento (Walther *et al.*, 2015; Perkins *et al.*, 2003). El isotipo IgM normalmente precede al cambio de isotipo hacia IgG y aparece tempranamente en infecciones agudas, participando en la respuesta inmune primaria mediada por anticuerpos (Keggan *et al.*, 2013). La persistencia en la exposición al antígeno induce aumentos en otros isotipos, mayoritariamente de IgG, pero no causa un aumento de la concentración sérica de IgM. La IgM sérica en un equino adulto representa aproximadamente el 10% de las inmunoglobulinas séricas totales, y en contraste a la IgG sérica, la IgM materna tiene una corta vida media de entre cinco a 16 días. Los niveles de IgM en potrillos neonatos que

no han ingerido calostro es de 16- 32 mg/dL (Giguère y Polkes, 2005; Tallmadge, 2016). Mientras que los potrillos que ya ingirieron calostro muestran concentraciones de 34- 54 mg/dL (Tallmadge, 2016)

Se han descrito en la literatura deficiencias de IgM en potrillos jóvenes y esporádicamente en equinos adultos las razas Árabe y Cuarto de Milla, en donde los niveles de los otros isotipos se encuentran normales (Perkins *et al.*, 2003).

IgG

Este isotipo con sus siete subclases, cumple todas las funciones de una molécula de inmunoglobulina como lo es la unión de antígenos, la fijación del complemento, y la unión a varias células fagocíticas, linfocitos, plaquetas, mastocitos y basófilos (Walther *et al.*, 2015). Es por esto que la insuficiencia de IgG, a menudo se asocia con una alta morbilidad y mortalidad de animales, siendo de especial importancia para los neonatos, sobre todo de especies unguladas, ya que carecen de inmunoglobulinas al nacer (Hou *et al.*, 2016). Constituye alrededor del 75% de los anticuerpos y contribuye a la protección contra severos patógenos como el Virus de la Influenza Equina, *Streptococcus equi* y *Rhodococcus equi*, entre otros. Adicionalmente, la respuesta en mucosa y sistémica de la IgG limita la diseminación y severidad del Virus Herpes Equino 1. Por estas razones, se considera que la IgG juega un rol importante en el suero y los compartimentos mucosos de los equinos (Walther *et al.*, 2015). La capacidad de absorción de inmunoglobulinas calostrales por el tracto intestinal del potrillo es mayor durante las primeras seis horas de vida, declinando hasta el punto de no ocurrir absorción a las 24 horas posteriores al nacimiento, lo que se traduce en que la mayor concentración sérica de IgG se alcanza al cumplirse un día de nacido.

El catabolismo de IgG es alto en las primeras cuatro semanas de vida, y el aumento del volumen plasmático contribuyendo en la dilución de la IgG, reduciendo la concentración de inmunoglobulina transferida maternalmente. Como resultado, la concentración sérica de los potrillos neonatos cae a sus niveles más bajos entre el primer y segundo mes de edad (Aoki *et al.*, 2013). Hammer *et al.* (2000) comprobaron que la administración oral de IgG equina a los potrillos que ingirieron calostro a las diez y 12 horas de nacido, no generó una diferencia significativa en su nivel plasmático. La concentración de IgG en potrillos que no

han ingerido calostro va de los 0,2 a 17 mg/dL (Giguère y Polkes, 2005), por el contrario, aquellos potrillos que a las 12 horas de nacido han ingerido calostro muestran concentraciones de 8 mg/mL de este isotipo (Veronesi *et al.*, 2014). Se describe que niveles >500 mg/dL son protectivos en el neonato equino (Tallmadge, 2016).

La concentración de IgG en los fluidos corporales puede ser utilizada para propósitos diagnósticos y terapéuticos. Por ejemplo, los niveles de IgG aumentan en la mayoría de las infecciones, hiperinmunizaciones, enfermedades hepáticas, malnutrición severa, disproteinemia, granulomas de hipersensibilidad, desórdenes dermatológicos, mieloma de IgG y artritis reumatoide. En contraste, los niveles de IgG pueden disminuir por condiciones como agammaglobulinemia, aplasia linfóide, inmunodeficiencia combinada severa, leucemia linfoblástica crónica y falla en la transferencia de inmunidad pasiva (Hou *et al.*, 2016).

IgE

Corresponde al isotipo con menor concentración en suero (Keggan *et al.*, 2013). Además de ser responsable de la respuesta inmune contra parásitos, también es responsable de las alergias tipo I que resultan en enfermedades como eczema de verano, urticaria y obstrucción recurrente de vías aéreas. El carácter polimórfico de los genes de IgE puede influenciar en sus funciones efectoras, unión de mastocitos y basófilos, y consecuentemente en el nivel de severidad de las reacciones alérgicas (Walther *et al.*, 2015). Se ha sugerido que las altas concentraciones de IgE en el suero de un equino normal son producidas por una alta carga parasitaria (Wagner, 2009). Los niveles de IgE en el suero de la yegua, el calostro y el suero del potrillo están correlacionados, pero la eficiencia de la transferencia de IgE a los potrillos aún no está clara. Sorpresivamente, el nivel de IgE total detectado en el suero a los seis meses de edad está significativamente relacionado con los niveles encontrados al primer, segundo y tercer año de edad, sugiriendo que a los seis meses los potrillos ya sintetizan IgE, con niveles de 318 ng/mL. La evidencia científica sugiere la existencia de un mínimo efecto de la IgE materna en la respuesta inmune del potrillo, ya que ésta disminuye antes de la síntesis de IgE por parte de él (Marti *et al.*, 2009).

IgA

Esta inmunoglobulina predomina en la respuesta inmune de la mucosa del tracto respiratorio, gastrointestinal y genitourinario. En los fluidos corporales como la leche, la secreción nasal y la saliva, aparece como una molécula dimérica llamada IgA secretora, mientras que en suero aparece de forma monomérica (Walther *et al.*, 2015; Veronesi *et al.*, 2014). La IgA secretora se ha identificado como la inmunoglobulina predominante en las secreciones nasales de los equinos, y se ha demostrado que existe una respuesta con este tipo de anticuerpos nasales frente al virus Influenza (Mair *et al.*, 1987). Los niveles de concentración sérica de IgA en potrillos neonatos es de 40-58 mg/dL (Tallmadge, 2016).

En el trabajo de Camargo y *et al.* (2009) se menciona que se han encontrado pocos estudios disponibles que se enfoquen a la respuesta humoral equina, por lo que el médico veterinario que se desempeña en clínica no tiene un acceso a los parámetros necesarios para diferenciar un sistema inmune saludable de uno que presenta enfermedad.

Finalmente, y como se mencionó con anterioridad, a partir de los tres meses de edad comienza la producción de inmunoglobulinas por parte del potrillo, pudiendo ser similar a la del adulto, puesto que a esta edad la gran mayoría de los anticuerpos maternos decae. Por esta razón, el presente estudio pretende establecer qué ocurre con los niveles sanguíneos de los distintos isotipos de inmunoglobulinas en potrillos de entre cuatro y seis meses de edad, información que en un futuro puede servir de aproximación al estudio en ejemplares adultos.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la inmunoglobulinemia en potrillos FSC entre cuatro y seis meses de edad, pertenecientes a un haras de la zona sur de Chile.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar concentración de inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgE e IgM) en potrillos FSC entre cuatro y seis meses de edad.
2. Comparar la concentración de inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgE e IgM) entre equinos hembras y machos, FSC entre cuatro y seis meses de edad.
3. Establecer los valores de referencia de inmunoglobulinas séricas de potrillos FSC entre cuatro y seis meses de edad, para el Laboratorio de Química Clínica Especializada (LQCE).
4. Correlacionar los niveles de proteínas totales séricas (gr/dl) con los niveles de inmunoglobulinas totales séricas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el presente estudio se utilizaron 60 potrillos FSC entre cuatro y seis meses de edad; 30 hembras y 30 machos, pertenecientes al “Haras Don Alberto”, ubicado en la ciudad Los Ángeles, región del Bío-Bío, Chile. Todos los ejemplares se encontraban sometidos al mismo manejo sanitario y de crianza extensiva en los potreros del haras.

Como requisito para este estudio los ejemplares no debían estar cursando ninguna enfermedad y/o tratamiento médico. Para corroborar lo anterior fueron sometidos a un examen clínico general evaluando frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, temperatura, coloración de mucosas y tiempo de llene capilar. Todas las evaluaciones fueron apoyadas por los antecedentes registrados en las fichas clínicas del haras y por un hemograma y perfil bioquímico. Cualquier alteración en alguno de los parámetros antes mencionados, fue razón para excluir al ejemplar del estudio.

Obtención de muestras

Se realizó la toma de muestras durante la mañana a los potrillos acompañados de sus respectivas madres. Se les extrajo 7 mililitros (mL) de sangre, mediante la punción de la vena yugular, utilizando una jeringa de 10 mL con aguja calibre 21 G y 1 ½ pulgadas. Se vertieron 3 mL de sangre en un tubo de muestra con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante para la posterior realización del hemograma y 4 mL en un tubo de muestra sin aditivo para la realización del perfil bioquímico, sólo con el fin de corroborar que los ejemplares estuvieran clínicamente sanos. La medición de las inmunoglobulinas se llevó a cabo con el suero proveniente del tubo de muestra sin aditivo.

Las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente y, dentro del mismo día de su obtención, recepcionadas por el LQCE, ubicado en la ciudad de Santiago, región Metropolitana.

Procesamiento y Análisis de Muestra

El procesamiento y análisis de las muestras estuvo a cargo de la División de Veterinaria del LQCE. El programa de evaluación externa de calidad del área veterinaria del laboratorio

está a cargo de PREVECAL®, mientras que el control de calidad interno se sustenta en *Bio-Rad* nivel 1 y nivel 2 (*Lyphochek*®).

Wiener CP-19® y *Biosystems* BA-400® son los proveedores de equipos y reactivos para desarrollar el análisis hematológico y bioquímico, respectivamente.

Para el análisis de las inmunoglobulinas se realizó la medición de los isotipos de éstas. Se realizó con los equipos *Biosystems* BA-400® (IgA, IgG e IgM) e *Immulate*® (IgE). La inmunoglobulina A, G, M y E, presentes en la muestra fueron precipitadas en presencia de anticuerpos de cabra antiinmunoglobulinas humanas (A, G, M y E respectivamente) humana. La dispersión de luz generada por los complejos antígeno-anticuerpo es proporcional a la concentración de inmunoglobulina y fue cuantificada por turbidimetría en el caso de las inmunoglobulinas A, G y M. En el caso de la inmunoglobulina E se realizó el mismo procedimiento, pero la cuantificación, se realizó a través de quimioluminiscencia.

Análisis Estadístico

Los datos del estudio fueron registrados en una planilla Excel y sometidos a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks. Posteriormente, se realizó un análisis exploratorio de datos, para caracterizar medidas de tendencia central y de dispersión, junto con la realización de tablas de frecuencia. Para realizar la caracterización de los valores de inmunoglobulinemia, se emplearon intervalos de confianza, asociado a la prueba de T-Student, utilizando un valor de significancia $p < 0,05$. Para determinar si existen diferencias significativas en los valores de inmunoglobulinemia según sexo, los datos se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía, y se compararon los promedios mediante el test de Tukey, utilizando un valor de significancia $p < 0,05$.

Para evaluar la relación de los valores de las proteínas con los niveles de inmunoglobulinas séricas se utilizó el análisis de correlación de Pearson y relación lineal. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa *Infostat*® y los resultados están presentados mediante tablas y gráficos.

RESULTADOS

Determinación de la concentración de inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgE e IgM) en potrillos FSC entre cuatro y seis meses de edad.

Los datos obtenidos en la medición de inmunoglobulinas en los potrillos fueron analizados concluyendo que los datos poseen una distribución normal y se realizó un boxplot para cada variable a través del cálculo de percentiles (Anexo 1) y así comprobar que no existiesen valores atípicos.

Se logró determinar la concentración (mg/dL) de los isotipos de inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM e inmunoglobulinas totales), tal como lo muestra la Tabla 1. Además, con la suma de los niveles de estos tres isotipos (IgA, IgG e IgM) se calculó la concentración de inmunoglobulinas totales en potrillos. También se obtuvo valores de tendencia central como la media, de dispersión como la desviación estándar y los valores mínimos y máximos que se encontraron en cada variable.

Los valores relacionados con el isotipo IgE que estaba contemplado dentro del análisis de las inmunoglobulinas y los objetivos específicos del presente estudio, no se encuentran disponibles debido al nulo nivel sérico en los potrillos pertenecientes en el estudio, lo cual será tratado en la discusión.

Tabla 1. Concentración de inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM e inmunoglobulinas totales) en potrillos FSC entre cuatro y seis meses de edad.

Variable (mg/dL)	Media	Desviación Estándar	Valor Mínimo	Valor Máximo
IgA	8,93	3,75	2	17
IgG	292,58	15,3	261	335
IgM	53,83	17,75	18	96
Inmunoglobulinas totales	355,35	21,42	318	403

Media: promedio del conjunto de valores; **Desviación Estándar:** índice numérico de la dispersión del conjunto de datos.

Posteriormente, se calcularon medidas de frecuencia para cada isotipo de inmunoglobulina para determinar con mayor detalle la distribución de los animales que se congregaba según la concentración de inmunoglobulinas que presentaban. Para esto, el grupo total de potrillos se subdividió en cinco clases (grupos) con la misma amplitud en base a la cantidad de inmunoglobulinas séricas, otorgándoles a cada clase un valor mínimo (límite inferior) y un

valor máximo (límite superior). El promedio o marca de clase que corresponde al promedio del límite inferior y límite superior; la frecuencia absoluta representa el número exacto de ejemplares que poseen valores dentro de tal clase; y la frecuencia relativa es el porcentaje de los ejemplares que poseen valores dentro de la clase.

En el caso de la IgA (Tabla 2), se obtuvo que la mayor cantidad de ejemplares (56%) presentaban valores que se encontraban entre 5 a 11 mg/dL, ubicándose más centrales y cercanos a valores más bajos, arrojando que sólo un 25% de los ejemplares posee concentraciones que van de 11 a 17 mg/dL.

Tabla 2. Frecuencia para la concentración de IgA (mg/dL).

Clase	Límite Inferior	Límite Superior	Promedio	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa
1	2	5	3,5	11	0,18
2	5	8	6,5	17	0,28
3	8	11	9,5	17	0,28
4	11	14	12,5	10	0,17
5	14	17	15,5	5	0,08

Clase: intervalo con igual amplitud; **Promedio:** valor promedio entre el límite inferior y superior de cada clase; **Frecuencia Absoluta:** número de veces que aparece un valor dentro del intervalo; **Frecuencia Relativa:** cociente de dividir la frecuencia absoluta por el número total de ejemplares del estudio.

Mientras que, en el caso de la IgG (Tabla 3), el mayor porcentaje de los animales (63%) presentaba concentraciones entre 275,8 a 305,4 mg/dL, repitiéndose un fenómeno similar al de IgA, en donde las concentraciones tenían un mayor porcentaje de frecuencia son aquellos que tienen un valor más promedio. Sólo un 21% presenta concentraciones de 305,4 a 335 mg/dL.

Tabla 3. Frecuencia para la concentración de IgG (mg/dL).

Clase	Límite Inferior	Límite Superior	Promedio	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa
1	261	275,8	268,4	9	0,15
2	275,8	290,6	283,2	20	0,33
3	290,6	305,4	298	18	0,30
4	305,4	320,2	312,8	11	0,18
5	320,2	335	327,6	2	0,03

Clase: intervalo con igual amplitud; **Promedio:** valor promedio entre el límite inferior y superior de cada clase; **Frecuencia Absoluta:** número de veces que aparece un valor dentro del intervalo; **Frecuencia Relativa:** cociente de dividir la frecuencia absoluta por el número total de ejemplares del estudio.

En similitud a los isotipos anteriores, un 62% de los animales presenta una concentración de IgM, (Tabla 4) entre 33,6 a 64,8 mg/dL, valores que son más centrales y sólo un 25% posee valores más altos, en donde la concentración va entre 64,8 a 96 mg/dL.

Tabla 4. Frecuencia para la concentración de IgM (mg/dL).

Clase	Límite Inferior	Límite Superior	Promedio	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa
1	18	33,6	25,8	8	0,13
2	33,6	49,2	41,4	18	0,30
3	49,2	64,8	57	19	0,32
4	64,8	80,4	72,6	11	0,18
5	80,4	96	88,2	4	0,07

Clase: intervalo con igual amplitud; **Promedio:** valor promedio entre el límite inferior y superior de cada clase; **Frecuencia Absoluta:** número de veces que aparece un valor dentro del intervalo; **Frecuencia Relativa:** cociente de dividir la frecuencia absoluta por el número total de ejemplares del estudio.

Para la concentración de inmunoglobulinas totales (IgA, IgG e IgM) en potrillos, se concluyó que un 73% posee una concentración entre 318 a 369 mg/dL (Tabla 5). Lo que se debe a que la concentración de cada isotipo que compone esta concentración total, tiene una distribución de valores similares, observándose que un bajo porcentaje (18%) presenta una concentración entre 386 a 403 mg/dL.

Tabla 5. Frecuencia para la concentración de inmunoglobulinas totales (mg/dL).

Clase	Límite Inferior	Límite Superior	Promedio	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa
1	318	335	326,5	14	0,23
2	335	352	343,5	16	0,27
3	352	369	360,5	14	0,23
4	369	386	377,5	10	0,17
5	386	403	394,5	6	0,1

Clase: intervalo con igual amplitud; **Promedio:** valor promedio entre el límite inferior y superior de cada clase; **Frecuencia Absoluta:** número de veces que aparece un valor dentro del intervalo; **Frecuencia Relativa:** cociente de dividir la frecuencia absoluta por el número total de ejemplares del estudio.

Comparación de la concentración de inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgE e IgM) entre equinos hembras y machos, FSC entre cuatro y seis meses de edad.

En la Tabla 6 se pueden observar las concentraciones de IgA, IgM e inmunoglobulinas totales, agrupadas por el sexo de los potrillos. Para comparar la concentración de dichas inmunoglobulinas, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía con test de Tukey y $p < 0,05$, obteniéndose para IgA un $p = 0,3747$; IgG $p = 0,3987$; IgM $p = 0,2191$ e inmunoglobulinas totales $p = 0,0731$, todos los cuales son valores mayores a $p > 0,05$, por lo que se afirma que las diferencias de las medias de ambos sexos no son significativas.

Tabla 6. Comparación de la concentración de inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM e inmunoglobulinas totales) entre equinos hembras y machos, FSC entre cuatro y seis meses de edad.

Sexo	Variable (mg/dL)	Media	Desviación Estándar	Valor Mínimo	Valor Máximo
Hembra	IgA	9,37	3,92	2	17
Macho	IgA	8,5	3,58	3	17
Hembra	IgG	294,27	16,19	264	335
Macho	IgG	290,9	14,43	261	324
Hembra	IgM	56,67	16,36	18	96
Macho	IgM	51	18,88	19	87
Hembra	Inmunoglobulinas totales	360,3	19,95	325	403
Macho	Inmunoglobulinas totales	350,4	22,02	318	397

Media: promedio del conjunto de valores; **Desviación Estándar:** índice numérico de la dispersión del conjunto de datos.

Basándonos en la información contenida en la Tabla 6, la Figura 1 muestra los gráficos en A, B, C y D, correspondientes a los niveles de inmunoglobulinas IgA, IgG, IgM e inmunoglobulinas totales (mg/dL) según sexo respectivamente, en donde los valores en las barras corresponden a la media de cada variable. Las líneas sobre las barras corresponden a la desviación estándar de cada valor. Las letras iguales, sobre cada barra indican que no hay diferencia estadística entre los niveles de inmunoglobulinas comparándolas según sexo, evaluadas a través del test de Tukey, considerando un $p < 0,05$.

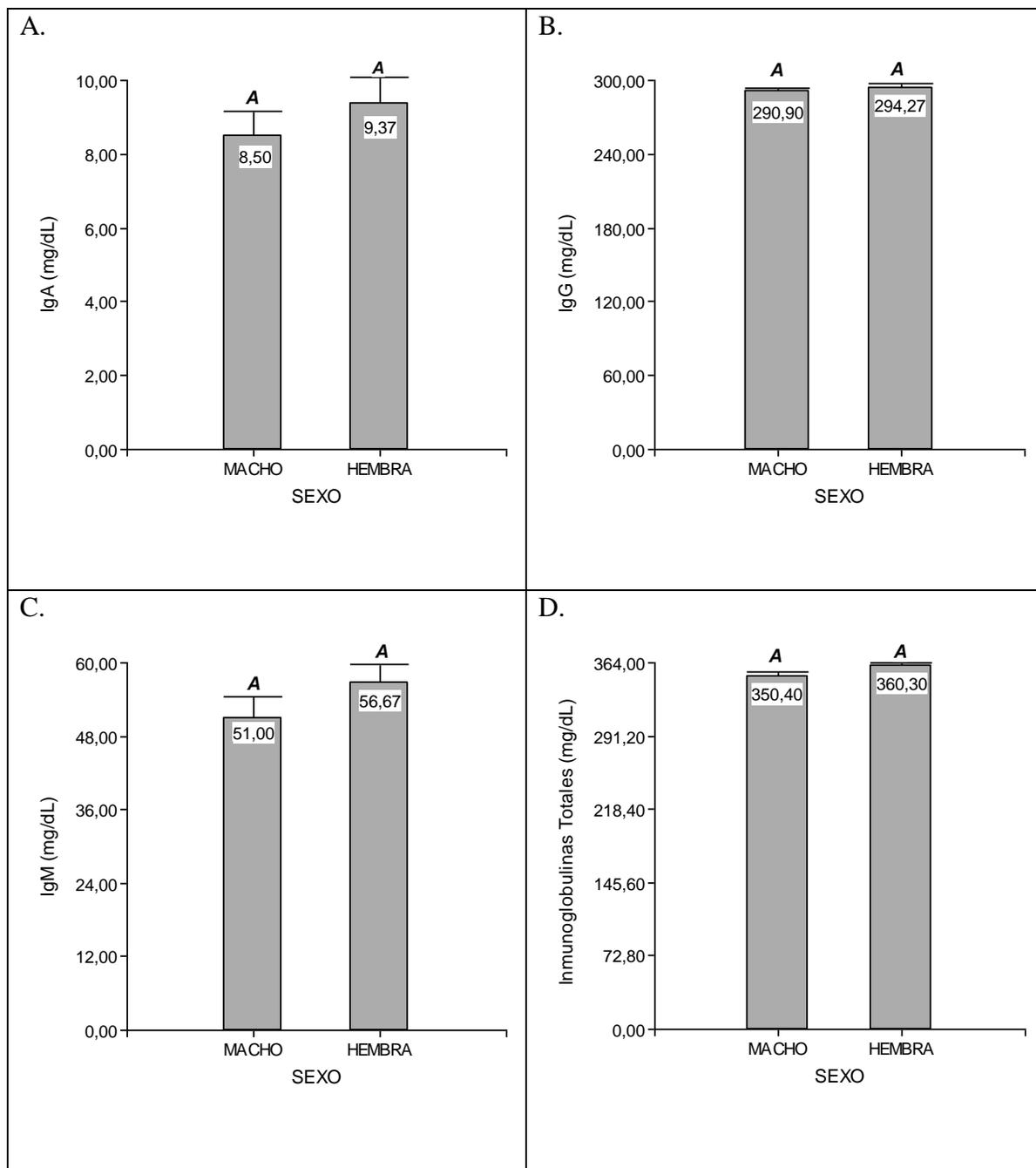


Figura 1. La concentración de inmunoglobulinas no presenta diferencias estadísticas entre machos y hembras. En los cuadros señalados con las letras A, B, C y D se observa la concentración de IgA, IgG, IgM e inmunoglobulinas totales, respectivamente, comparadas según sexo. Las letras iguales indican que no existe diferencia estadística al evaluarlos mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía, y comparación de los promedios mediante el test de Tukey, utilizando un $p < 0,05$. Líneas sobre las barras corresponden a la desviación estándar y cifras dentro de las barras corresponden a la media de los valores.

Determinación de los valores de referencia de inmunoglobulinas aplicables a potrillos FSC, entre cuatro y seis meses de edad, para el Laboratorio de Química Clínica Especializada (LQCE).

Los valores de referencia para la concentración de los isotipos de inmunoglobulinas e inmunoglobulinas totales (Tabla 7) fueron calculados por intervalos de confianza debido a la distribución paramétrica de los datos, el cálculo se obtuvo mediante la fórmula (Wittwer, 2012):

$$\text{IR} = \mu \pm 2 \sigma^2$$

IR: Intervalo de referencia; μ : media; σ^2 : desviación estándar.

Para calcular el intervalo de referencia superior e inferior se realiza de la siguiente manera:

$$\text{Intervalo de Referencia Superior} = \mu + 2 \sigma^2$$

$$\text{Intervalo de Referencia Inferior} = \mu - 2 \sigma^2$$

Tabla 7. Intervalos de referencia de la media para IgA, IgG, IgM e inmunoglobulinas totales.

Variable (mg/dL)	Estimación de la media	Desviación Estándar	Límite Inferior (95%)	Límite Superior (95%)
IgA	8,93	0,48	7,97	9,90
IgG	292,58	1,98	288,63	296,54
IgM	53,83	2,29	49,25	58,42
Inmunoglobulinas totales	355,35	2,77	349,82	360,88

Media: promedio del conjunto de valores; **Desviación Estándar:** índice numérico de la dispersión del conjunto de datos.

De los datos que se observan en esta tabla, el valor de las inmunoglobulinas totales es el que presenta la mayor desviación estándar. La IgM e IgG también presentan una desviación estándar más marcada, sobretodo la primera, si se compara con la que se obtuvo en el caso de IgA.

Correlación de los niveles de proteínas totales séricas (gr/dl) con los niveles de inmunoglobulinas totales séricas.

El último objetivo de este estudio buscaba correlacionar estadísticamente los niveles de proteínas séricas totales (gr/dL) con los niveles de inmunoglobulinas séricas totales (mg/dL), a través de correlación de Pearson. Se determinó un valor de $p= 0,08$ ($p < 0,05$), por lo que se concluyó que ambas variables no tienen correlación. Además, en la Figura 2 se puede observar que cuando ambas variables son sometidas a un análisis de relación lineal tampoco hay una relación entre ellas, pues ante valores similares de proteínas séricas totales, los valores de inmunoglobulinas son distintos, por lo que no se puede deducir un valor aproximado de proteína sérica a partir de un valor de inmunoglobulinas totales determinado, o viceversa.

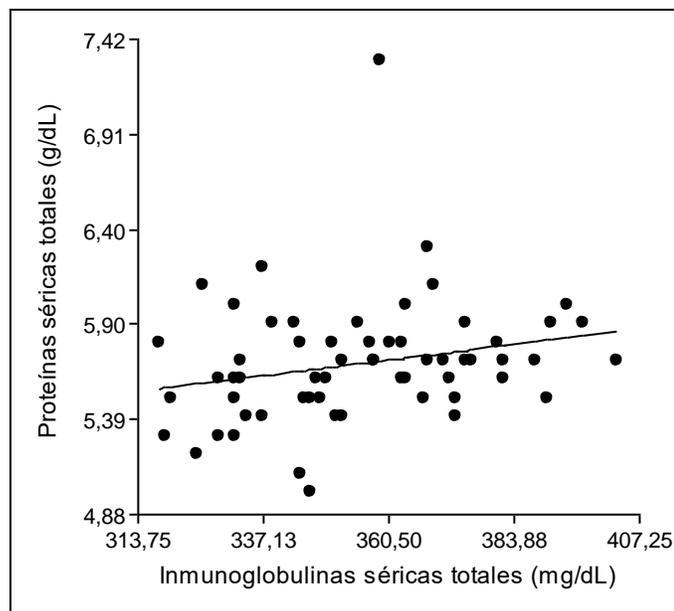


Figura 2. No existe una relación lineal entre los valores de inmunoglobulinas séricas totales y proteínas séricas totales. En el eje de las abscisas se observa la concentración de inmunoglobulinas séricas totales y en el de las ordenadas, la concentración de proteínas séricas totales. Con valores similares de proteínas séricas (g/dL) se observan distintos niveles de inmunoglobulinas totales (mg/dL). No se puede deducir un valor aproximado de proteína sérica a partir de un nivel de inmunoglobulinas totales determinado o viceversa.

DISCUSIÓN

Hasta la fecha la concentración sérica de los isotipos de inmunoglobulinas en potrillos de entre cuatro a seis meses no se encuentra descrita en la literatura, por lo que sólo se puede realizar una aproximación con aquellos valores que han sido descritos para potrillos neonatos o equinos adultos. Además, estos valores en muchas publicaciones no se encuentran representados como un valor de referencia con intervalo, sino que con la media y desviación estándar. Si bien Wittwer (2012) ha señalado que para la elaboración de intervalos de referencia se requiere de un tamaño de muestra (n) mayor a 120 individuos, la dificultad de acceder a este número de ejemplares bajo las mismas condiciones, el mismo autor ha sugerido un tamaño de muestra a partir de 40 individuos en estudios que requieran establecer un intervalo de referencia para algún valor que presente distribución paramétrica (como en nuestro caso). Cabe destacar, que la mayoría de los trabajos que han sido citados en esta investigación tienen un tamaño de muestra similar o incluso inferior al de este estudio.

Entre los trabajos que describen la concentración de inmunoglobulinas en equinos adultos, se encuentra el realizado por Camargo *et al.* (2009), quienes establecieron valores para IgA (196 ± 73 mg/dL), IgG (2704 ± 1424 mg/dL) e IgM (70 ± 30 mg/dL). Similares determinaciones registraron McGuire y Crawford (1972), para lo cual utilizaron unos *kits* comerciales, donde las concentraciones registradas fueron: IgA (153 ± 86 mg/dL), IgG (1334 ± 350 mg/dL) e IgM (120 ± 31 mg/dL). De igual manera Kohn *et al.* (1989) determinaron valores para IgA (305 ± 237 mg/dL), IgG (2463 ± 1337 mg/dL) e IgM (136 ± 218 mg/dL), y McFarlane *et al.* (2001) obtuvieron valores de IgA (261 ± 14.9 mg/dL), IgG (1447 ± 26.3 mg/dL) e IgM (75 ± 8.2 mg/dL), siendo similares a los que exponen Camargo *et al.* (2009) y McGuire y Crawford (1972). Sheoran *et al.* (2000) obtuvieron valores de IgA mucho menores en comparación a los otros estudios mencionados (40 ± 30 mg/dL) y para IgG (2320 ± 860 mg/dL) fue similar a los otros ensayos.

En cuanto a la información disponible sobre la concentración de isotipos de inmunoglobulinas en potrillos, ésta es muy escasa, destacándose los valores para IgA (40-58 mg/dL), IgM (16-32 mg/dL) e IgG (0,2 – 17 mg/dL y 8 mg/mL; pre y post consumo de calostro, respectivamente).

Nuestro estudio realizado en el haras Don Alberto, estableció los valores para IgA ($8,93 \pm 3,75$ mg/dL), IgG ($292,58 \pm 15,3$ mg/dL), IgM ($53,83 \pm 17,75$ mg/dL) e inmunoglobulinas totales ($355,35 \pm 21,42$ mg/dL), los cuales presentan una diferencia bastante evidente con los disponibles en literatura para equinos adultos, lo que justifica el haber realizado nuestros análisis, ya que demuestra que existen diferencias en las concentraciones de estas moléculas en las diferentes edades del equino. Por otra parte, cuando se compara la concentración de inmunoglobulinas estudiadas con los datos de potrillos neonatos, también encontramos diferencias, pero no tan marcadas como cuando se comparan con adultos. Lo que se contrasta con la afirmación de Giguère y Polkes (2005), quienes plantean que los potrillos en presencia de transferencia de inmunidad pasiva, cerca de las ocho a 12 semanas de vida, producen una cantidad de IgG e IgA comparable a la de los adultos.

Todo lo anterior nos permite deducir que, si bien los potrillos entre cuatro a seis meses de edad ya han iniciado su producción de anticuerpos autólogos, este proceso no es lo suficientemente eficiente para alcanzar los niveles sanguíneos de un equino adulto.

Un estudio anterior (Espinosa, 2015), determinó la concentración de inmunoglobulinas en equinos neonatos FSC de hasta tres días de edad sometidos a un tratamiento de plasma hiperinmune en el mismo haras. Dicho trabajo midió la concentración de globulinas en tres diferentes tiempos: potrillos recién nacidos antes de ingerir calostro; 24-36 horas post parto (con ingesta de calostro) y 24-36 horas post tratamiento con plasma hiperinmune. Se determinó entonces concentraciones de globulinas de 529 mg/dL, 1994 mg/dL y 2127 mg/dL respectivamente. Si bien, estas concentraciones tienen diferencias con los niveles que presentan los potrillos de este estudio, se debe tener en cuenta que el estudio de Espinosa considera a todas las globulinas (α , β y γ globulinas), además de que el plasma hiperinmune entrega anticuerpos que el potrillo no es capaz de producir, situación diferente a los potrillos de cuatro a seis meses de edad que ya sintetizan inmunoglobulinas en una concentración menor, pero son autólogas. Los anticuerpos que otorga el plasma hiperinmune pueden persistir hasta 60 días en los potrillos, como es el caso de los anticuerpos contra *Rhodococcus equi* (Bevilaqua, 2014), de manera que no interfieren en nuestra medición.

Según Camargo *et al.* (2009) ha habido otros reportes en la literatura donde han cuantificado los isotipos de inmunoglobulinas, pero la mayoría de estos estudios utilizan distintas técnicas para su medición, ya sea *kits* comerciales y/o analizan un pequeño número de animales, por lo que es difícil aplicar esos resultados en la clínica.

Cabe destacar que si bien en la literatura sólo algunos autores mencionan diferencias en las concentraciones de estos isotipos de inmunoglobulina según raza, es bueno considerar que todos los estudios han sido realizados en distintas razas que quizás no se podrían comparar entre sí y que también podrían presentarse diferencias al compararse con los equinos FSC del presente estudio.

En este estudio no se pudo cuantificar la concentración del isotipo IgE en los potrillos entre cuatro a seis meses de edad, pese a haber utilizado la técnica de quimioluminiscencia, que tiene una mayor sensibilidad en la detección de los anticuerpos, lo cual se sustenta en lo que describe la literatura respecto a esta inmunoglobulina. La IgE puede detectarse en el suero de los potrillos en las primeras ocho a 12 semanas de nacido, pero estos anticuerpos son exclusivamente de origen materno, los que fueron transferidos a través del consumo de calostro (Wagner *et al.*, 2009; Wagner *et al.*, 2006). Esta transferencia de anticuerpos IgE a los neonatos a través del calostro ha sido descrita en humanos, caprinos y equinos. Además, la IgE no es detectable en los potrillos previo al consumo de calostro, apoyando la teoría de que su origen es exclusivamente materno (Wagner *et al.*, 2010).

En un estudio previo realizado por Wagner *et al.* (2003), se observó que había ausencia de IgE detectable en potrillos de cinco a seis meses de edad. Es por esto que posteriormente Wagner *et al.* (2006) estudiaron la edad en la cual se empezaba a detectar la IgE autóloga en los potrillos y concluyeron que esto ocurre entre los nueve y 11 meses de edad, presentando concentraciones de 20 a 30 $\mu\text{g/mL}$.

Por otro lado Marti *et al.* (2009), a diferencia de Warner *et al.* (2006), concluyeron que la síntesis de IgE en potrillos ocurría a partir de los seis meses de edad con una concentración de 318 ng/mL , y valores que obtenidos a esta edad no se correlacionaban con los detectados cuando estos potrillos eran neonatos, pero sí mostrando una alta correlación con los valores del primer al tercer año de edad, confirmando así que la IgE medida correspondía a la sintetizada por el potrillo. Además, se realizó un estudio de inmunohistoquímica de los

linfonodos de potrillos de seis meses de edad, donde encontraron linfocitos B productores de IgE, corroborando que la concentración de IgE corresponde a anticuerpos autólogos. Sumado a lo anterior, esta menor concentración de IgE en potrillos podría explicarse debido a que en su corta edad, estos animales se han visto enfrentados a una menor carga parasitaria o alérgenos en comparación a equinos de mayor edad.

Las concentraciones de IgE descritas para equinos adultos y potrillos de 18 meses son $84,0 \pm 0,99 \mu\text{g/mL}$ y $56 (50-81) \mu\text{g/mL}$, respectivamente (Wagner, 2009; Wagner *et al.*, 2006). Sin embargo, en el suero humano, la IgE se detecta en concentraciones de ng/mL y tiene una corta vida media, de aproximadamente dos días. Por lo tanto, la concentración total de IgE reportada en equinos adultos es sustancialmente mayor que en los humanos, además de que las variaciones entre individuos también son elevadas. Esto podría deberse a que los equinos, generalmente se ven expuestos a altas cargas parasitarias, similar a lo que ocurre en los caprinos, en los que también se puede detectar una concentración normal de IgE, alcanzando niveles de los $\mu\text{g/mL}$ (Wagner, 2009; Wagner *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2006).

Es de interés que en un futuro se siguiera estudiando la variación de la concentración de IgE en distintas edades del equino FSC y si existe concordancia con las conclusiones que se han obtenido en los estudios mencionados.

A diferencia de nuestro estudio, los trabajos científicos que han evaluado las inmunoglobulinas y sus isotipos en los equinos, no han mencionado el haber determinado si existen diferencias atribuidas al sexo de los animales. Se ha descrito en la literatura que en humanos y otros vertebrados, los estrógenos aumentan la sobrevivencia de los linfocitos B y también producen una activación policlonal de IgG e IgM, mientras que la testosterona produce un efecto contrario, por lo que en ejemplares hembras es posible encontrar una mayor cantidad de inmunoglobulinas (Roved *et al.*, 2017; Oertelt-Prigione, 2017).

En el caso de los humanos se ha descrito que es mayor la incidencia de enfermedades autoinmunes en mujeres cuando alcanzan la pubertad, en comparación a los hombres (Oertelt-Prigione, 2017). En el caso de los equinos, la pubertad en promedio se alcanza a las 80 semanas de edad, y aunque en ambos sexos se encuentran altos niveles de hormonas esteroideas al nacimiento, éstos disminuyen rápidamente y permanecen bajos hasta que se alcanza la pubertad (Wulf *et al.*, 2018). Por lo tanto, puede ser que la edad de los

ejemplares del estudio sea la razón por la cual no se observan diferencias significativas según sexo, ya que es una edad en la cual se encuentran bajos los niveles de hormonas esteroideas que pudiesen afectar la respuesta inmune.

El último punto sujeto a discusión en esta memoria es la correlación entre la concentración de proteínas séricas totales y las inmunoglobulinas totales, ya que la literatura menciona que a partir de los cinco meses de edad se observa un aumento lineal de linfocitos T y B (respuesta humoral) en potrillos, mostrando valores mayores de los que se encuentran en los adultos, lo cual es el reflejo de la exposición a múltiples antígenos ambientales (Tallmadge, 2016). Cabe destacar que las proteínas séricas totales, se utilizan, entre otros como una herramienta diagnóstica que sugiere cambios o problemas de la función hepática o sistema inmune (Abeni *et al.*, 2013). Las proteínas séricas incluyen a la albúmina y globulinas, las cuales usualmente son cuantificadas en un perfil bioquímico estándar (Crisman *et al.*, 2008). La albúmina es la proteína sérica más osmóticamente activa, transporta muchas sustancias y constituye aproximadamente entre 47- 70% del total de las proteínas séricas (Crisman *et al.*, 2008; Abeni *et al.*, 2013; Blanco y Blanco, 2017). En contraste a la albúmina, las globulinas son un grupo heterogéneo de proteínas que tienden a migrar en grupos en la electroforesis de proteínas séricas (Crisman *et al.*, 2008). Incluyen los anticuerpos, moléculas inflamatorias, proteínas hemostáticas y fibrinolíticas, y proteínas transportadoras de lípidos, vitaminas y hormonas (Abeni *et al.*, 2013). Estos grupos son conocidos como α -globulinas, β -globulinas y γ -globulinas. Hay condiciones fisiológicas o patológicas que pueden causar cambios en las concentraciones de albúmina y globulinas, y su cuantificación por electroforesis es una herramienta diagnóstica de gran valor (Crisman *et al.*, 2008; Abeni *et al.*, 2013).

Uno de los cambios más importantes en las proteínas séricas totales ha sido asociado con condiciones inflamatorias que llevan a un aumento de la síntesis de proteínas de fase aguda positivas. Las α -globulinas responden principalmente a inflamación aguda, mientras que las β -globulinas se elevan en cuadros de inflamación y hepatopatía, y las γ -globulinas aumentan durante una infección crónica o inflamación, como resultado de la producción de anticuerpos. La albúmina es una proteína de fase aguda negativa, ya que disminuye en el plasma durante condiciones inflamatorias (Abeni *et al.*, 2013).

Por otra parte cuando se habla sólo del aumento de la fracción de las γ - globulinas, nos encontramos frente a una hipergamaglobulinemia, la cual puede ser causada por una gamopatía policlonal (algunos o todos los grupos de inmunoglobulinas pueden estar aumentados) o gamopatía monoclonal (aumento de un tipo de inmunoglobulina). Una gamopatía policlonal a menudo se asocia con infecciones agudas, enfermedad inflamatoria crónica, como la hepatitis, pleuroneumonía, enfermedades inmunomediadas, neoplasia o un desorden supurativo crónico, mientras que la gamopatía monoclonal ocurre poco frecuentemente en el equino y ha sido asociada con mieloma de células plasmáticas, linfoma maligno y causas idiopáticas (Crisman *et al.*, 2008).

La hipoglobulinemia puede ser causada por una reducción en las fracciones α , β o γ - globulinas y ocurre por una variedad de desórdenes. Por ejemplo, la falla en la transferencia pasiva de inmunidad en potrillos es asociada con una deficiencia de γ -globulinas (Crisman *et al.*, 2008).

Las inmunoglobulinas casi en su totalidad forman parte de las γ -globulinas, y estas a su vez son parte de las proteínas séricas totales, por lo que se esperaría que existiese una correlación entre ambas variables, sin embargo, esto no se observó en nuestros resultados, ya que los potrillos que presentaron variaciones en las concentraciones de inmunoglobulinas, mostrándose un valor similar de proteínas séricas totales entre los otros individuos del estudio, lo que puede ser explicado por el hecho de que solo se evaluaron ejemplares clínicamente sanos y por lo tanto, las variaciones en los niveles de inmunoglobulinas fueron mínimos, insuficientes para ser reflejados en el total de proteínas séricas. Cabe mencionar que la albúmina al ser una proteína de fase aguda negativa, elevará o disminuirá su concentración dependiendo de la cantidad de globulinas, para así mantener la presión oncótica en un equilibrio. Como se mencionó anteriormente, el mayor porcentaje de proteínas séricas totales se encuentra constituido por la albúmina (47-70 %) y en un menor porcentaje las globulinas, y dentro de ellas las inmunoglobulinas, de las cuales se cabe destacar que IgG es la que constituye el 75% (Walther *et al.*, 2015), en comparación a IgM que constituye un 10%. Dado que la albúmina tiene un porcentaje mayor dentro de las proteínas séricas totales, se podría pensar que leves variaciones en las concentraciones de

inmunoglobulinas séricas, no repercutan de manera significativa en los niveles de proteínas séricas totales de los potrillos sanos.

El hecho de que existan variaciones en la concentración de inmunoglobulinas séricas totales debido a diferencias de niveles de IgG e IgM, puede explicarse porque éstas van generándose en un orden específico según la cadena de los genes que las codifican, secretándose en normalidad primero IgM y posteriormente IgG, fenómeno como respuesta frente a una infección que se denomina *switching* isotípico (Tizard, 2009; Lunn y Horohov, 2004) y al existir este orden puede que ciertos potrillos hayan sido muestreados en distintos momentos dentro de este proceso productivo y puede explicarse por eso la diferencia en la concentración de inmunoglobulinas séricas totales. Si bien se podría tener como teoría que algunos ejemplares estuvieran con algún cuadro infeccioso que clínicamente no se observaba, es difícil de considerar ya que los niveles de anticuerpos se encuentran más bajos incluso que el valor protector que se menciona en potrillos, los que según Tallmadge (2016) para la IgG debieran ser >500 mg/dL. Sobre lo cual se podría deducir que los ejemplares del estudio dada su edad, recién están regulando su sistema inmune, respondiendo a patógenos habituales del ambiente, pero que no alcanzan a producir una patología de base, de una manera similar como explicaba Tallmadge (2016) el aumento lineal de la respuesta humoral en los potrillos de la misma edad de nuestro estudio.

En un estudio realizado por Hurcombe *et al.* (2012) se elaboró una fórmula que permitiese calcular la concentración de IgG a partir de la concentración de inmunoglobulinas séricas totales y de la concentración de proteínas séricas totales en potrillos menores de siete días de edad, y a la vez, evaluar si existía correlación en los valores de IgG calculados a través de la fórmula y en los valores obtenidos por la medición exacta de IgG. Se determinó que no había diferencias estadísticas entre estas últimas dos concentraciones nombradas y por lo tanto, se pudo comprobar que las variables estaban correlacionadas. Sin embargo, nuestros resultados muestran diferencias con los de estos autores. Esta discrepancia, podría ser atribuida a que los potrillos del trabajo anterior aún no alcanzaban la edad en que se sintetizan anticuerpos propios, que es a partir de las cuatro a cinco semanas de edad (Bevilaqua, 2014), así como no se están sintetizando los distintos isotipos de

inmunoglobulinas, y por el contrario, son los anticuerpos maternos los que se encuentran cumpliendo la función protectora en el potrillo.

Finalmente, esta memoria de título entrega por primera vez los valores de referencia de isotipos de inmunoglobulinas en potrillos FSC entre cuatro a seis meses de edad, momento en que la literatura describe como el inicio de la producción autóloga. La disponibilidad de información que permita analizar las concentraciones de inmunoglobulinas en pacientes de estas edades permitirá evaluar en mejor detalle la respuesta inmune del equino frente a una patología, ya que los exámenes complementarios de rutina son más generales y muchas veces puede enmascarar un problema relacionado al isotipo del anticuerpo. Cabe destacar que dado el tamaño de muestra, estos resultados son aplicables sólo a ejemplares de este estudio, por lo cual resultaría interesante en un futuro seguir ampliando el estudio en potrillos con un mayor tamaño de muestra y también evaluar un estudio en equinos adultos de la misma raza de este trabajo, así como desarrollarlo en otras razas disponibles en el país, para disponer de información basada en la realidad nacional.

CONCLUSIÓN

Las concentraciones de los isotipos de inmunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) fueron determinadas en potrillos FSC de entre cuatro a seis meses de edad, cuyos valores fueron distintos a los descritos previamente para otras razas y edades.

No se observaron diferencias estadísticas en la evaluación según sexo de los potrillos, probablemente debido a que aún no alcanzan la pubertad.

La concentración de IgE no pudo ser determinada en potrillos FSC entre cuatro a seis meses de edad, posiblemente debido a que su síntesis comienza a partir de los seis meses de edad.

Los valores de proteínas séricas totales no se correlacionaron con los valores de inmunoglobulinas totales séricas, eventualmente debido a que se evaluaron sólo potrillos sanos.

Se establecieron valores de referencia para los isotipos de inmunoglobulinas en potrillos FSC de cuatro a seis meses de edad del haras Don Alberto, los que serán utilizados por el Laboratorio de Química Clínica Especializada.

BIBLIOGRAFÍA

ABENI, F.; DAL PRÁ, A.; BERTIN, G.; CALAMARI, L. 2013. Serum Protein Fraction in Mature Horses and Relationship with Metabolic and Hematological Parameters. *J Equine Vet Sci* 33: 905-911.

ANDRUSKEVICH, S.; PERRY, P.; HOUP, K.; HOUP, T. 2013. The relation of maternal fluid balance to offspring passive immunity. *Physiology & Behaviour* 122: 155-158.

AOKI, T.; HONDA, H.; ISHII, M. 2013. Immunologic Profiles of Peripheral Blood Leukocytes and Serum Immunoglobulin G Concentrations in Perinatal Mares and Neonatal Foals (Heavy Draft Horse). *J Equine Vet Sci* 33: 989-995.

BEVILAQUA, M. 2014. Immunotherapy. **In:** Sellon, D.; Long, M. *Equine Infectious Diseases*. Second Edition. Elsevier. Gainesville, USA. pp. 584-597.

BEVILAQUA, M. 2016. The Immune System. **In:** *Equine Clinical Immunology*. Wiley Blackwell. Ames, USA. pp. 1-10.

BLANCO, A.; BLANCO, G. 2017. Proteins. **In:** *Medical Biochemistry*. Elsevier. Kansas City, USA. pp. 21- 71.

CAMARGO, M.; KURIBAYASHI, J.; BOMBARDIERI, C.; HOGE, A. 2009. Normal distribution of immunoglobulin isotypes in adult horses. *The veterinary journal* 182: 359-361.

CRISMAN, M.; SCARRATT, W.; ZIMMERMAN, K. 2008. Blood Proteins and Inflammation in the Horse. *Vet Clin Equine* 24: 285-297.

CRISMAN, M.; SCARRATT, W. Immunodeficiency Disorders in Horses. *Vet Clin Equine* 24: 299-310.

ESPINOSA, M. 2015. Determinación de globulinas en neonatos equinos Fina Sangre de Carrera sometidos a tratamiento de plasma hiperinmune. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 25 p.

FOUCHÉ, N.; GRAUBNER, C.; HOWARD, J. 2014. Correlation between serum total globulins and gamma globulins and their use to diagnose failure of passive transfer in foals. *Vet J* 202: 384-386.

FRANCO, M.; OLIVER-ESPINOSA, O. 2016. Risk Factors Associated With Failure of Passive Transfer of Colostral Immunoglobulins in Neonatal Paso Fino Foals. *J Equine Vet Sci.* 44: 100-104.

FRECCERO, F.; MARIELLA, J.; LANCI, A.; COTIGNOLI, C.; CASTAGNETTI, C. 2017. Efficacy and Safety of a Commercial Fresh-Frozen Hyperimmune Plasma in Foals with Failure of Passive Transfer of Immunity. *J Equine Vet Sci* 48:174-181.

GIGUÉRE, S.; POLKES, A. 2005. Immunologic Disorders in Neonatal Foals. *Vet Clin North Am Equine Pract* 21: 241-272.

HAMMER, C.; TYLER, H.; MILLER, P. 2000. Effects of oral administration of concentrated equine serum IgG to newborn foals on passive immunity. *J Equine Vet Sci* 20(5): 337-338.

HARVEY, J. 2012. Immunohematology. **In:** Stevens, A.; Lowe, J.; Scott, I. *Veterinary Hematology.* Elsevier. Gainesville, USA. pp. 177-190.

HOU, S.; SHAW, R.; RILEY, C. 2016. Chemometric analysis of attenuated total reflectance infrared spectral data for quantitation of immunoglobulin G in equine plasma and serum. *Chemometr Intell Lab Syst* 156: 108-114.

HURCOMBE, S.; MATTHEWS, A.; SCOTT, V.; WILLIAMS, J.; KOHN, C.; TORIBIO, R. 2012. Serum Protein Concentrations as Predictors of Serum Immunoglobulin G Concentrations in Neonatal Foals. *J Vet Emerg Crit Car.* 22 (5): 573-579.

KEGGAN, A.; FREER, H.; ROLLINS, A.; WAGNER, B. 2013. Production of seven monoclonal equine immunoglobulins isotyped by multiplex analysis. *Vet Immunol and Immunopathol* 153: 187-193.

KOHN, C.; KNIGHT, D.; HUESTON, W. 1989. Colostral and serum IgG, IgA and IgM concentrations in Standardbred mares and their foals at parturition. *J Am Vet Med Assoc* 195:64–68.

LUNN, P.; HOROHOV, D. 2004. *The Equine Immune System*. **In:** Reed, S.; Bayly, W.; Sellon, D. *Equine Internal Medicine*. Second Edition. Saunders. Philadelphia, USA. pp. 1-67.

MAIR, T.; STOKES, C.; BOURNE, F. 1987. Quantification of Immunoglobulins in Respiratory Tract Secretions of the Horse. *Vet Immunol Immunopathol* 14: 197-203.

MARTI, E.; EHRENSPERGER, F.; BURGER, D.; OUSEYE, J.; DAY, M.; WILSON, D. 2009. Maternal transfer of IgE and subsequent development of IgE responses in the horse (*Equus caballus*). *Vet Immunol and Immunopathol* 127: 203-211.

MCFARLANE, D.; SELLON, D.; GIBBS, S. 2001. Age-related quantitative alterations in lymphocyte subsets and immunoglobulin isotypes in healthy horses. *Am J Vet Res* 62: 1413-1417.

MCGUIRE, T.; CRAWFORD, T. 1972. Identification and quantification of equine serum and secretory immunoglobulin A. *Infect Immun* 6: 610–615

OERTELT-PRIGIONE, S. 2017. Immune response- The impact of biological sex and gender. **In:** Legato, M. *Principles of Gender-Specific Medicine*. Third edition. Elsevier. Berlin, Germany. pp. 309-321.

PERKINS, G.; NYDAM, D.; FLAMINIO, M.; AINSWORTH, D. 2003. Serum IgM Concentrations in Normal, Fit Horses and Horses with Lymphoma or Other Medical Conditions. *J Vet Intern Med* 17: 337-342.

ROVED, J.; WESTERDAHL, H.; HASSELQUIST, D. 2017. Sex differences in immune responses: Hormonal effects, antagonistic selection, and evolutionary consequences. *Horm Behav* 88: 95-105.

SHEORAN, A.; TIMONEY, J.; HOLMES, M.; KARZENSKI, S.; CRISMAN, M. 2000. Immunoglobulines isotypes in sera and nasal mucosal secretions and their neonatal transfer and distribution in horses. *Am J Vet Res* 61: 1099-1105).

STURGILL, T.; HOROHOV, D. 2010. Vaccination Response of Young Foals to Keyhole Limpet Hemocyanin: Evidence of Effective Priming in the Presence of Maternal Antibodies. *J Equine Vet Sci* 30 (7): 359-364.

TALLMADGE, R. 2016. **In:** Bevilaqua, M. *Equine Clinical Immunology*. Wiley Blackwell. Ames, USA. pp. 11-22.

TIZARD, I. 2009. *Inmunología Veterinaria*. 9ª edición. Editorial Saunders. St. Louis. Estados Unidos. pp 170-180.

VERONESI, M.; DALL'ARA, P.; GLORIA, A.; SERVIDA, F.; SALA, E.; ROBBE, D. 2014. IgG, IgA, and lysozyme in Martina Franca donkey jennies and their foals. *Theriogenology* 81: 825-831.

WAGNER, B.; RADBRUCH, A.; ROHWER, J.; LEIBOLD, W. 2003. Monoclonal anti-equine IgE antibodies with specificity for different epitopes on the immunoglobulin heavy chain of native IgE. *Vet Immunol and Immunopathol* 92: 45-60.

WAGNER, B.; FLAMINIO, J.; HILLEGAS, J.; LEIBOLD, W.; ERB, H.; ANTCZAK, D. 2006. Occurrence of IgE in foals: Evidence for transfer of maternal IgE by the colostrum and late onset of endogenous IgE production in the horse. *Vet Immunol and Immunopathol* 110: 269-278.

WAGNER, B. 2009. IgE in horses: Occurrence in health and disease. *Vet Immunology and Immunopathol* 132: 21-30.

WAGNER, B.; MILLER, W.; ERB, H.; LUNN, P.; ANTCZAK, D. 2009. Sensitization of skin mast cells with IgE antibodies to *Culicoides* allergens occurs frequently in clinically healthy horses. *Vet Immunology and Immunopathol* 132: 53-61.

WAGNER, B.; STOKOL, T.; AINSWORTH, D. 2010. Induction of interleukin-4 production in neonatal IgE+ cells after crosslinking of maternal IgE. *Vet Immunology and Immunopathol* 34: 436-444.

WALTHER, S.; RUSITZKA, T.; DIESTERBECK, U.; CZERNY, C. 2015. Equine immunoglobulins and organization of immunoglobulin genes. *Dev Comp Immunol* 53: 303-319.

WILSON, D.; HARWOOD, L.; TORSTEINSDOTTIR, S.; MARTI, E. 2006. Production of monoclonal antibodies specific for native equine IgE and their application to monitor total serum IgE responses in Icelandic and non-Icelandic horses with insect bite dermal hypersensitivity. *Vet Immunology and Immunopathol* 112: 156-170.

WITTWER, F. 2012. *Manual de Patología Clínica Veterinaria. Segunda Edición.* Valdivia, Chile. 200 p.

WULF, M.; BEYTHIEN, E.; ILLE, N.; AURICH, J.; AURICH, C. 2018. The stress response of 6-month-old foals to abrupt weaning is influenced by their sex. *J Vet Behav* 23: 19-24.

ZIMMERMAN, K.; CRISMAN, M. 2008. Diagnostic Equine Serology. *Vet Clin North Am Equine Pract* 24:311-334.

ANEXO

Anexo 1. Diagramas de caja para las variables IgA, IgG, IgM e inmunoglobulinas totales (figuras A, B, C y D, respectivamente). Dentro de cada diagrama, la línea horizontal representa la mediana, el punto representa la media, los límites de la caja representan a los percentiles 25 y 75 y los límites superior e inferior representan los percentiles 5 y 95.

