

Capítulo 3

BIOQUÍMICA CLÍNICA DE PROTEÍNAS Y COMPUESTOS

NITROGENADOS



3.1 Características de aminoácidos y proteínas

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes en los seres vivos, constituyendo cerca del 50% del peso vivo (en base seca). Son también las biomoléculas más versátiles en cuanto a funcionalidad, y esta versatilidad funcional está determinada por el número, la clase y la secuencia de los aminoácidos que componen sus unidades estructurales.

Los aminoácidos como unidades básicas de las proteínas

Todas las proteínas están constituidas a partir de veinte tipos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, variando en las diferentes proteínas solo el número y la secuencia de los aminoácidos. Los aminoácidos son moléculas pequeñas, con peso molecular promedio de 130 Da. Todos tienen en común la presencia de un grupo carboxilo y de un grupo amina unidos al mismo carbono (α), y difieren entre sí en la estructura de su grupo residual (grupo R). Además de los veinte aminoácidos que hacen parte de las proteínas (aminoácidos proteicos), existen otros que tienen funciones metabólicas diversas, como por ejemplo la ornitina y la citrulina, que son metabolitos intermediarios del ciclo de la urea.

Clasificación de los aminoácidos

Los aminoácidos pueden ser clasificados en cuatro grupos, en función de la estructura de sus grupos residuales (grupos R), de acuerdo con la polaridad y la carga (**Figura 3.1**), así:

(1) Aminoácidos polares sin carga (Asn, Cys, Gln, Ser, Tyr, Thr): son hidrofílicos y su polaridad puede ser dada por los grupos hidroxilo, amida o sulfhidrilo (tiol), que forman puentes de hidrógeno con el agua;

asparagina y glutamina son amidas de los ácidos aspártico y glutámico, respectivamente; la cisteína puede sufrir oxidación en su grupo sulfhidrilo (SH) y formar un compuesto dimérico (Cys-Cys o cistina) por unión de dos cisteínas mediante un puente disulfuro (S-S); esos puentes son comunes en las proteínas y contribuyen a estabilizar la molécula.

(2) Aminoácidos polares cargados negativamente o aminoácidos ácidos (Asp, Glu): la carga está determinada por los grupos carboxilo ionizados.

(3) Aminoácidos polares cargados positivamente o aminoácidos básicos (Arg, His, Lys): la carga positiva está determinada por los grupos guanidino (Arg), imidazol (His) o amina (Lys).

(4) Aminoácidos no polares (Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val): sus grupos R pueden ser alifáticos o aromáticos, y en todos los casos hidrofóbicos; la glicina es el aminoácido más simple; la prolina es un iminoácido (grupo amina secundario), pues el carbono α está unido con el extremo del grupo R, ciclizando la molécula y dejándola más rígida.

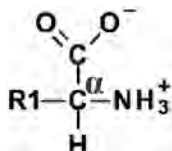
Los aminoácidos con cadenas laterales aromáticas (His, Phe, Tyr, Trp) absorben la luz ultravioleta a 280 nm, constituyéndose en la base para el análisis de proteínas, usando la espectrofotometría de luz ultravioleta (UV).

El organismo de los mamíferos no puede sintetizar todos los aminoácidos que forman parte de las proteínas. Diez de los veinte aminoácidos proteicos son aminoácidos esenciales, esto significa que deben ser incorporados en la dieta de los mamíferos (**Figura 3.1**). Sin estos aminoácidos el organismo no puede sintetizar las proteínas de reposición y las requeridas en los procesos de crecimiento o aquellos procesos que exigen síntesis proteica (gestación, lactación, etc.). La arginina puede ser considerada como un aminoácido

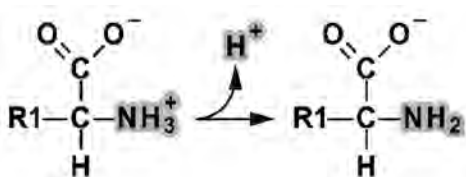
no esencial en los adultos. Sin embargo, durante el crecimiento no son sintetizadas cantidades adecuadas de este aminoácido, tornándolo esencial en animales jóvenes. Los requerimientos de metionina aumentan si la dieta no incorpora cisteína, aminoácido que es sintetizado a partir de la metionina. Efecto similar ocurre con la fenilalanina, cuyos requerimientos aumentan cuando no se suministra tirosina en la dieta. La glicina es un aminoácido esencial en las aves.

Propiedades químicas de los aminoácidos

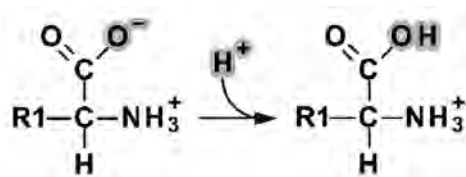
Los aminoácidos pueden estar ionizados en soluciones acuosas, en por lo menos dos grupos ionizables: el grupo ácido (carboxilo) y el grupo amina del carbono α :



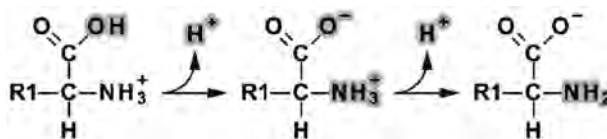
Por tener dos cargas eléctricas opuestas, la forma completamente ionizada se llama ion dipolar o *zwitterion* (ion híbrido). Esta característica influye para aumentar el punto de fusión de los aminoácidos libres, debido a que las cargas hacen más estables y unidas las moléculas entre sí. Los α -aminoácidos en forma dipolar pueden actuar como ácidos al ceder protones y como bases al aceptar protones, teniendo por tanto doble propiedad, por lo cual son llamados compuestos anfóteros, o sea que actúan como ácido o como base dependiendo del pH del medio. El aminoácido en forma de *zwitterion* que cede el H del grupo amina actúa como ácido:



Mientras tanto, el aminoácido *zwitterion* que acepta un H^+ en su grupo carboxilo ionizado actúa como base:



La forma completamente protonada de los aminoácidos puede ceder dos iones H^+ y, por tanto, comportarse como ácido diprótico:



Las tres posibles formas de protonación anteriores hacen que los aminoácidos tengan una curva de titulación típica de sus grupos ionizables. En esta curva hay dos planicies correspondientes a las zonas con mayor capacidad tamponante. En el primer estadio, titulación del grupo carboxilo, este grupo a pH de 1 se encuentra completamente protonado (con carga positiva). En la medida en que se adiciona OH^- (base para neutralizar el ácido) al sistema, comienza a ocurrir pérdida de protones (ionización) del grupo carboxilo, el cual es el primero en disociarse, hasta llegar al punto medio de la titulación (pK_1), o sea, cuando existen cantidades equimolares de las formas donadora y receptora de protones del grupo carboxilo:

$$\frac{[R-CH(NH_3^+)COOH]}{[R-CH(NH_3^+)COO^-]} = 1$$

Es posible continuar con la titulación del grupo carboxilo hasta alcanzar el punto de completa ionización. En este punto la forma del aminoácido es dipolar isoelectrónica, y este valor de pH se conoce como punto isoelectrónico. En el segundo estadio de la titulación comienza a ocurrir pérdida de protones del grupo amina (titulación del grupo NH_3^+): al llegar al punto medio de la titulación (pK_2) habrá cantidades equimolares de las formas donadora y receptora de protones del grupo amina:

$$\frac{[R-CH(NH_3^+)COO^-]}{[R-CH(NH_2)COO^-]} = 1$$

La titulación finaliza próximo del pH 12, donde la forma predominante del aminoácido está completamente desprotonada (con carga negativa). Mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch es posible calcular la proporción de las formas receptora/donadora de protones en un determinado pH. El pH del medio determina el estado de protonación de los grupos amina y carboxilo de los aminoácidos y, por tanto, determina su carga eléctrica. Esta característica

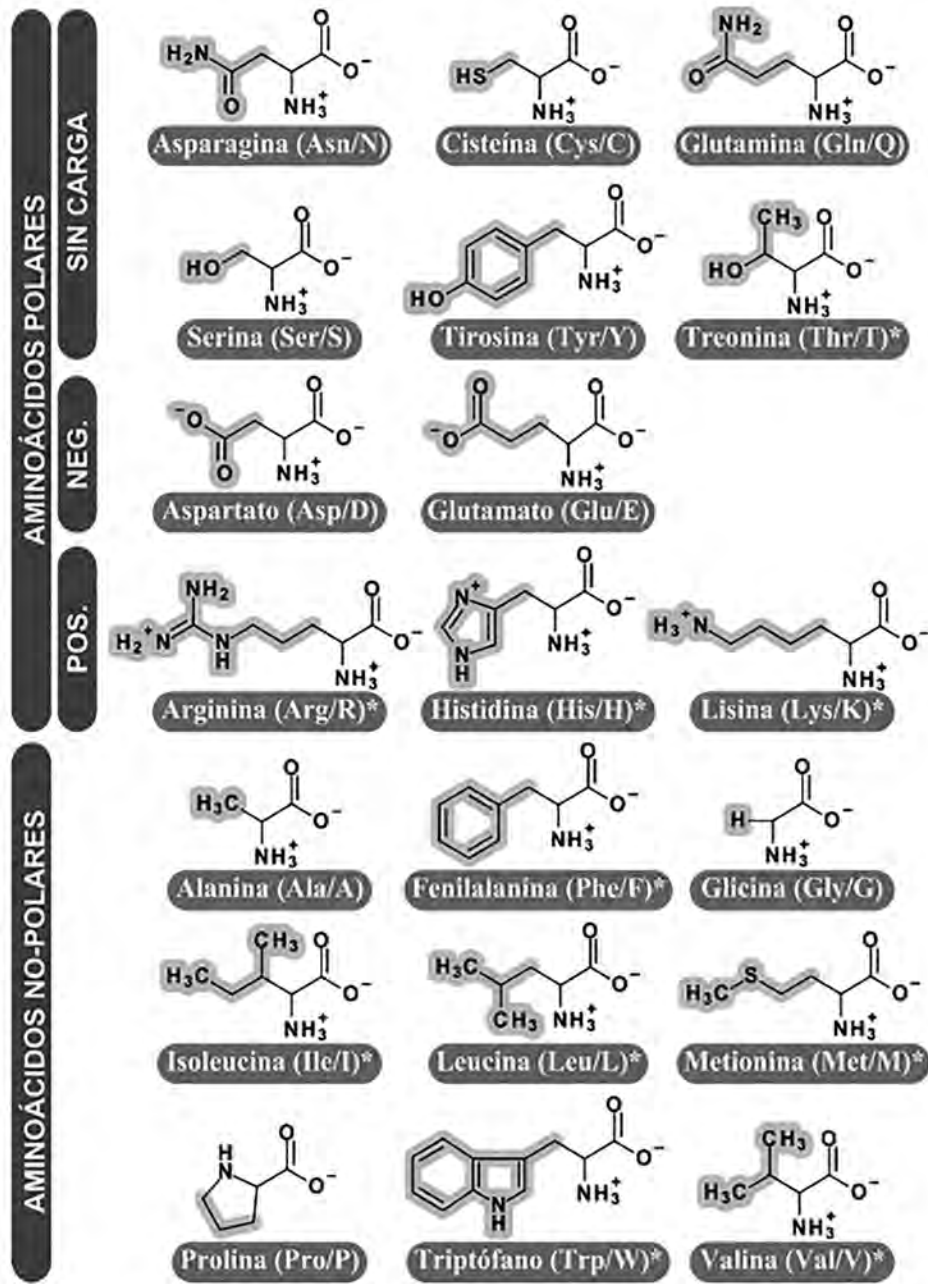


Figura 3.1. Estructura y clasificación de los aminoácidos

Además de los nombres, son mostrados entre paréntesis los códigos de tres y de una letras para cada aminoácido. Los aminoácidos considerados esenciales para mamíferos están indicados por un asterisco. Las cadenas laterales de los aminoácidos se muestran sombreadas. POS., carga positiva; NEG., carga negativa.

es importante para los métodos de análisis de los aminoácidos, pues cada aminoácido tiene diferentes pK para sus grupos amina y carboxilo y para aquellos grupos susceptibles de ser ionizados, existentes en sus residuos.

Aminogramas

Los métodos de análisis para aminoácidos explotan su característica de tener carga eléctrica de acuerdo al pH del medio. Así, uno de los métodos más usados,

la cromatografía de intercambio iónico, usa resinas de intercambio catiónico, o sea, grupos con carga negativa como el sulfonato (SO_3^-), los cuales atraen iones positivos (cationes). Si la solución con la mezcla de aminoácidos a ser analizada está en un pH ácido (por ejemplo pH 3,0), entonces la mayoría de los aminoácidos estarán protonados (con carga positiva) aunque con cargas eléctricas de diferente valor entre los diferentes aminoácidos. La interacción entre los aminoácidos y la resina de intercambio catiónico será específica para cada uno, siendo más fuerte entre los aminoácidos básicos (con mayor carga positiva) que entre los aminoácidos ácidos (con mayor carga negativa). El *buffer* usado para eluir los aminoácidos puede modificar su pH, por ejemplo aumentando y por tanto modificando la carga eléctrica de los aminoácidos que están interactuando con la resina, para así terminar de eluir todos los aminoácidos. Este es el principio del analizador automático de aminoácidos, el cual usa generalmente tres tipos de *buffer* en secuencia de pH 3,25, 4,25 y 5,28. El orden de elución de los aminoácidos es: Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Cys, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, Lys, His, Arg. Los aminoácidos eluidos son posteriormente analizados fotométricamente al reaccionar con la ninhidrina, compuesto que genera un complejo de color violeta leído a 570 nm y cuya intensidad de color es proporcional a la concentración del aminoácido.

Péptidos y proteínas

Los aminoácidos pueden unirse entre sí covalentemente a través de enlaces peptídicos, en los cuales el grupo α -carboxilo de un aminoácido se condensa con el grupo α -amina de otro aminoácido, con la salida de una molécula de agua (**Figura 3.2**). El enlace peptídico es rígido y no puede rotar debido a que la unión C-N tiene un carácter parcialmente doble, haciendo resonancia con la unión C=O. Esta limitación para rotar disminuye el número de posibles conformaciones que las proteínas puedan tomar. Existe un pequeño dipolo en el enlace peptídico debido a las cargas parciales sobre los átomos de oxígeno (δ^-) y de nitrógeno (δ^+), lo que permite la formación de puentes de H entre diferentes enlaces peptídicos, o sea, entre el H unido al N de una unión con el O unido al C de otra unión:



Los péptidos tienen una extensión que varía de acuerdo al número de aminoácidos que los conforman: pueden ser dipéptidos (2 aminoácidos), tripéptidos (3 aminoácidos), tetrapéptidos (4 aminoácidos), y así sucesivamente hasta oligopéptidos (10-20 aminoácidos) o polipéptidos, los cuales tienen pesos moleculares de hasta 10.000 Dal (cerca de 90 aminoácidos). Polipéptidos mayores con función conocida se consideran proteínas. Por convención, la lectura de la secuencia de los aminoácidos de un péptido se hace de izquierda (extremo amina) a derecha (extremo carboxilo). Existen algunos péptidos pequeños con actividad biológica, principalmente teniendo funciones de hormonas o de transmisores nerviosos (como la oxitocina o las endorfinas). Algunas hormonas peptídicas de bajo peso molecular incluyen insulina (51 aminoácidos), glucagón (29 aminoácidos), ACTH (39 aminoácidos), GnRH (10 aminoácidos), oxitocina (9 aminoácidos) y TRH (la menor hormona peptídica, con 3 aminoácidos).

Clasificación de las proteínas

Las proteínas se pueden clasificar por su forma y su solubilidad, así:

(1) Por la forma, las proteínas pueden ser fibrosas y globulares. Las proteínas fibrosas son insolubles en agua, largas y resistentes, generalmente constituyendo estructuras como la α -queratina del pelo y la lana, la fibroína de la seda o el colágeno del tejido conectivo. En ocasiones también participan de procesos contráctiles como la miosina y la actina del músculo o las proteínas de los microtúbulos (tubulina y dineína). Las proteínas globulares son solubles en sistemas acuosos y se doblan sobre sí para dar una forma esférica. La mayoría de las proteínas son de tipo globular, incluyendo las enzimas, las hormonas proteicas, las proteínas transportadoras, los anticuerpos, y las proteínas de membranas y ribosomas.

(2) Por la solubilidad, las proteínas pueden ser: (a) albúminas: solubles en agua y soluciones salinas; (b) globulinas: poco solubles en agua, pero solubles en soluciones salinas; (c) prolaminas: solubles en soluciones de etanol a 70% pero insolubles en agua, ricas en arginina; (d) histonas: proteínas básicas, solubles en soluciones salinas; (e) escleroproteínas: insolubles en agua y soluciones salinas, ricas en glicina, alanina y prolina.

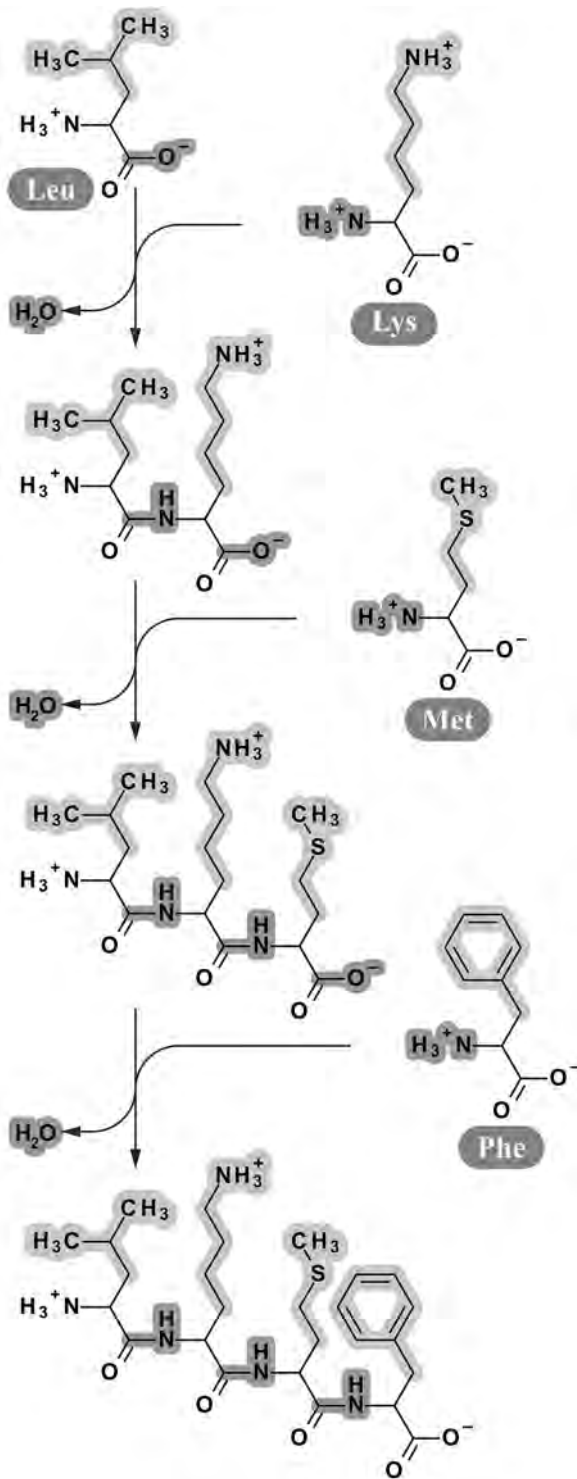


Figura 3.2. Polimerización de los aminoácidos mediante enlaces peptídicos

En esta figura se muestra la formación del tetrapéptido Leu-Lys-Met-Phe. Las cadenas laterales de los aminoácidos están resaltadas en fondo gris claro. En cada aminoácido están resaltados en gris oscuro el hidroxilo del grupo carboxilo y el grupo amino que participan de la unión peptídica (también resaltada en gris oscuro en el péptido).

Niveles de organización estructural de las proteínas

La organización tridimensional que toman las proteínas es fundamental para su actividad, siendo dependiente de las interacciones que existen entre los residuos de los aminoácidos. Por tanto, esta organización depende de los aminoácidos que conforman las proteínas y de cómo esos aminoácidos interactúan entre sí para dar una conformación determinada. Un cambio en la conformación generalmente lleva a la inactividad de la proteína. Las proteínas con su conformación funcional, o sea aquella necesaria para su actividad biológica, se denominan proteínas nativas. Existen cuatro niveles de estructuración de las proteínas:

1. Estructura primaria: se refiere al número, tipo y secuencia de los aminoácidos que conforman la proteína, así como a la localización de los enlaces disulfuro y los enlaces intra- e intercatenarios, los cuales pueden ser enlaces no covalentes, tales como puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, interacciones hidrofóbicas e interacciones de Van der Waals. La estabilidad de una proteína está definida por la suma de la energía libre de formación de los enlaces. A pesar de que los enlaces covalentes tiene mayor variación de energía libre de formación ($\Delta G = -200$ a -460 kJ/mol) que los enlaces no covalentes ($\Delta G = -4$ a -30 kJ/mol), siendo por tanto más fuertes, la estabilidad estructural de la proteína está determinada por los enlaces débiles formados entre los residuos de los aminoácidos, debido a que estos ocurren en gran número. En general los residuos hidrofóbicos se localizan al lado interior de la proteína, mientras que los residuos hidrofílicos están en el exterior, en contacto con el agua.
2. Estructura secundaria: es la relación estérica o espacial que tienen los aminoácidos entre sí, la cual puede ser de forma muy ordenada, como en la queratina, orientados en una espiral en forma de α -hélice a lo largo de un eje (α -hélice). Estas estructuras son muy estables y rígidas, mantenidas por puentes de H. La formación de la estructura de α -hélice es desfavorecida por los siguientes eventos: repulsión o atracción electrostática entre residuos de aminoácidos cargados, residuos de aminoácidos voluminosos y presencia de prolina.



Las proteínas también pueden estar ordenadas en forma de hoja plegada (conformación β), la cual es una estructura más extendida que la estructura α -hélice, tal como se observa en la fibroína de la seda (β -queratina), organizada en forma de zigzag y no en forma de hélice, también mantenida por puentes de hidrógeno. Otra forma de organización es la conformación llamada *duplaz β* , que consiste en un giro de 180° de la cadena envolviendo aminoácidos ligados a un extremo de una cadena de hoja plegada β . Las tres formas de estructura secundaria pueden coexistir en la misma proteína y son igualmente importantes en la función de la macromolécula.

3. Estructura terciaria: es consecuencia directa de la estructura secundaria y corresponde a la relación estérica total de la proteína, es decir, estableciendo las regiones o dominios de la molécula. Dependiendo de la proporción de formas estructurales secundarias las proteínas pueden dar estructuras terciarias correspondientes a proteínas fibrosas o globulares. Mediante estudios de difracción de rayos X fue posible determinar para las proteínas globulares la proporción de α -hélice y de conformación β , así como el número y la posición de *duplaz β* , e incluso la proporción de regiones dobladas irregularmente o la proporción de segmentos extendidos. En la conformación de la estructura terciaria de las proteínas también influye la clase de residuos de los aminoácidos, los cuales se organizan en función de su polaridad: hidrofílicos en la superficie externa de la proteína, hidrofóbicos en el interior de la proteína, y los de polaridad intermedia, a ambos lados de la proteína.
4. Estructura cuaternaria: esta estructura es exclusiva de las proteínas oligoméricas, esto es, aquellas que poseen más de una cadena unidas por enlaces covalentes. Los protómeros se interrelacionan principalmente mediante enlaces débiles no covalentes o también por enlaces disulfuro. Existen algunas proteínas que poseen grupos químicos diferentes a aminoácidos, tales como lípidos, carbohidratos o metales, llamadas proteínas conjugadas, siendo su grupo no peptídico el prostético. Ejemplos de proteínas conjugadas (y sus grupos prostéticos) son: lipoproteínas (lípidos), glicoproteínas (carbohidratos), metaloproteínas

(metales), fosfoproteínas (fosfatos), hemoproteínas (grupo hemo), o flavoproteínas (nucleótidos flavínicos).

Solubilidad de las proteínas

La solubilidad de las proteínas globulares está afectada por los siguientes factores:

1. Adición de sales: puede aumentar (*salting in*) o disminuir (*salting out*) la solubilidad de una proteína. En el caso del *salting out* ocurre precipitación de la proteína, pues los iones de la sal compiten con la proteína por las moléculas de agua que las rodean, permitiendo que las partículas de proteína se aproximen unas a otras, agrupándose y precipitando. Esta técnica es usada para fraccionar proteínas en solución debido a que las propiedades de solubilidad varían dependiendo de cada proteína.
2. Adición de solventes orgánicos: los solventes orgánicos tienen baja constante dieléctrica, esto es, poseen poca capacidad para mantener dos cargas separadas, permitiendo que las moléculas de proteína interactúen entre sí y precipiten.
3. Calentamiento: en forma moderada el calor ayuda a disolver las proteínas, pero pasando cierto límite, el cual varía de acuerdo a la proteína, ocurre desnaturación de esta. La proteína desnaturada pierde su estructura terciaria debido a la pérdida de las interacciones débiles, se desdobla, formando una estructura aleatoria, y se precipita, aunque sin perder su estructura primaria, esto es, sin que ocurra ruptura de los enlaces peptídicos y por tanto sin pérdida de sus características nutricionales. No obstante, en la desnaturación ocurre pérdida de la acción biológica de la proteína, pues esta acción depende de la estructura terciaria (proteína nativa).
4. Variación del pH: el pH afecta el grado de ionización de los grupos dissociables en los residuos de los aminoácidos, o sea que el pH afecta la carga de las proteínas. El punto isoeléctrico (pI) de una proteína es el pH en el cual la carga líquida de la proteína es igual a cero. Generalmente en ese pH las moléculas de la proteína se agrupan y precipitan, debido a que son afectadas las uniones

electrostáticas que mantienen la estructura terciaria de la proteína. Las características eléctricas de las proteínas son una propiedad que es utilizada para separarlas mediante la técnica de electroforesis. En esta técnica las proteínas migran en un soporte sometido a un campo eléctrico, separándose de acuerdo a su carga y a su peso molecular, tiñéndolas después para poderlas visualizar y cuantificar.

Funciones de las proteínas

Las proteínas son las moléculas más abundantes y más versátiles de las células. Entre sus múltiples funciones están las siguientes:

1. Estructura: muchas proteínas sirven de soporte estructural o protector en diversos organismos. Por ejemplo, colágeno en tendones, cartílagos y tejido conjuntivo; elastina en ligamentos; queratina en cuernos, cascos, pelo, plumas, uñas y caparazones; fibroína en la seda y en las telas de araña; resilina en las alas de los insectos.
2. Hormonas: gran número de hormonas son proteínas o péptidos. Los órganos endocrinos que producen hormonas proteicas incluyen hipotálamo, hipófisis, páncreas, paratiroides, tracto gastrointestinal y placenta.
3. Enzimas: estos compuestos ejemplifican la gran diversidad de las proteínas existentes, ya que son catalizadores biológicos altamente específicos para cada sustrato. Actualmente existen más de dos mil enzimas clasificadas.
4. Transporte: las proteínas en la sangre son el vehículo de transporte de muchos nutrientes. Las lipoproteínas transportan triglicéridos, fosfolípidos y colesterol, la hemoglobina transporta O_2 dentro de los eritrocitos, la transferrina transporta hierro, la ceruloplasmina transporta cobre, la albúmina transporta ácidos grasos, calcio y hormonas esteroideas; ciertos tipos de globulinas transportan hormonas esteroideas y tiroideas.
5. Receptores: muchas hormonas actúan a través de receptores proteicos localizados en las membranas plasmáticas, en el citosol o en el núcleo de las células blanco.
6. Defensa: las inmunoglobulinas o anticuerpos son proteínas producidas por los linfocitos B especializadas en defender el organismo de elementos extraños. El fibrinógeno y la trombina son proteínas de defensa que actúan en la coagulación sanguínea.
7. Contracción: actina y miosina son proteínas que hacen parte de la estructura de la célula muscular y tienen la propiedad de contracción muscular. La tubulina y la dineína son también proteínas contráctiles que actúan en cilios y flagelos, así como en la cauda de los espermatozoides para permitir su locomoción.
8. Reserva de nutrientes: la albúmina es una proteína de la sangre que sirve como almacenadora de aminoácidos; la ovoalbúmina es proteína de reserva de nutrientes en el huevo, y la caseína tiene esta función en la leche; la ferritina es una proteína que almacena hierro.

3.2 Digestión y absorción de las proteínas

Animales monogástricos

Las proteínas que llegan al tracto gastrointestinal de los animales monogástricos son atacadas en primera instancia en el estómago por el ácido clorhídrico (HCl), secretado por las células parietales de las glándulas gástricas, lo que causa desnaturación proteica. También actúa la pepsina (peso molecular 33 kDal), enzima proteolítica secretada por las células principales del epitelio gástrico en la forma de pepsinógeno (peso molecular 40 kDal), el cual es rápidamente activado a pepsina debido al medio ácido del estómago (pH alrededor de 2,0). La contribución del estómago para el proceso digestivo de las proteínas es del 20%. La pepsina hidroliza las proteínas en su extremo aminoterminal, donde haya aminoácidos aromáticos (Tyr, Phe, Trp). La digestión de las proteínas es completada en el duodeno, donde las enzimas proteolíticas secretadas por el páncreas terminan de hidrolizar los péptidos. Estas enzimas (tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa) son secretadas como zimógenos inactivos (tripsinógeno, quimotripsinógeno y procarboxipeptidasa). El tripsinógeno es activado a tripsina por una enzima secretada por las células intestinales: la enteropeptidasa. La tripsina puede



activar el quimotripsinógeno y la pro-carboxipeptidasa. La tripsina y la quimotripsina atacan los enlaces peptídicos de la proteína con diferente especificidad: la tripsina ataca uniones Lys-Arg y la quimotripsina ataca el extremo carboxilo donde haya Phe, Tyr o Trp. La carboxipeptidasa, junto con otras enzimas secretadas por las células de la mucosa duodenal, como aminopeptidasa y dipeptidasa, son exopeptidasas, o sea que atacan solamente enlaces peptídicos de aminoácidos terminales.

La secreción enzimática está controlada hormonalmente: la actividad secretoria en el estómago es controlada por la gastrina (17 aminoácidos), hormona secretada por las células G de la región pilórica del estómago, y que estimula las células parietales para secretar ácido clorhídrico. El estímulo para la secreción de gastrina es la presencia de proteínas en el estómago y la excitación del nervio vago. La colecistoquinina (CCK), hormona polipeptídica de 33 aminoácidos, es secretada por la mucosa del duodeno y del yeyuno, por estimulación vagal y la presencia de péptidos en el tracto digestivo. Esta hormona estimula la secreción enzimática del páncreas, además de aumentar la motilidad del estómago y del intestino, al tiempo que estimula la secreción biliar y la contracción vesicular. La acción de la CCK es ayudada por la secretina, otra hormona intestinal de 27 aminoácidos, que estimula el páncreas para secretar bicarbonato y así elevar el pH intestinal a cerca de 7,0, lo cual es necesario para alcanzar el pH óptimo de las enzimas proteolíticas del páncreas. Otras hormonas tienen función inhibitoria sobre la secreción gástrica: la secretina, el péptido gástrico inhibitorio (GIP) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP).

Los productos resultantes de la hidrólisis enzimática de las proteínas son aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos, que son absorbidos en los 2/3 proximales del intestino delgado. La absorción de los aminoácidos y de los oligopéptidos producidos por la hidrólisis de los péptidos se realiza por un mecanismo activo. Después de absorbidos, en la célula epitelial del intestino delgado se realiza una hidrólisis total para que solo salgan aminoácidos libres al sistema portal hepático. La única excepción a este tipo de absorción se observa en los mamíferos neonatos, en los cuales ocurre absorción de inmunoglobulinas del calostro en las primeras 48 horas de vida, mediante un mecanismo de pinocitosis. Este evento es especialmente importante

en especies con placentación epitelio-corial (rumiantes, cerda, yegua), en las cuales no hay mezcla de sangre materna y fetal durante la gestación, por tanto, no hay transmisión placentaria de γ -globulinas.

Animales rumiantes

Las proteínas que entran al rumen son rápidamente degradadas por los microorganismos hasta aminoácidos, los cuales son reutilizados por las bacterias para sintetizar sus propias proteínas. Parte de los aminoácidos son degradados hasta amonio y esqueletos carbonados. Estos últimos sufren fermentación hasta ácidos grasos volátiles. Las bacterias del rumen son especialmente activas en los procesos de síntesis proteica y pueden utilizar como sustratos para esa síntesis, además de los aminoácidos, otras fuentes de nitrógeno no proteico (amonio, nitratos, amidas) como precursores para formar nuevos aminoácidos. Los protozoarios suplen sus necesidades de proteínas consumiendo bacterias. La urea que ingresa al rumen, sea con la dieta o con la saliva, es rápidamente atacada por la ureasa, enzima de origen bacteriano que la hidroliza en dos moléculas de amonio, liberando CO_2 :



El NH_4^+ en el rumen, en presencia de adecuada cantidad de compuestos energéticos que sirvan de fuente de esqueletos carbonados, actúa como sustrato para que las bacterias puedan sintetizar aminoácidos, los cuales a su vez son necesarios para la síntesis de proteína bacteriana. El NH_4^+ en exceso en el rumen se absorbe en la forma de NH_3 , y vía portal va al hígado, donde se metaboliza en el ciclo de la urea. Esta sustancia puede pasar a la circulación (donde recibe el nombre de BUN o nitrógeno ureico sanguíneo) y ser excretada por la orina, por la leche, o reciclada de nuevo al rumen vías sanguínea o salivar. Los anteriores eventos permiten que el rumiante economice compuestos nitrogenados y obtenga proteína a partir de fuentes de nitrógeno no proteico, como la urea, que es utilizada como fuente suplementaria en la dieta de esos animales. La proteína microbiana es digerida en el abomaso y el intestino de igual forma que en los monogástricos, con absorción de aminoácidos en el duodeno y el yeyuno. En el ciego ocurre hidrólisis proteica, pero no hay absorción de aminoácidos.

3.3 Catabolismo de las proteínas

Los aminoácidos, unidades estructurales de las proteínas, pueden oxidarse para contribuir con producción de energía en el organismo. Las proteínas que se degradan para obtener aminoácidos con destino a la oxidación pueden provenir de la dieta (proteínas exógenas) o del propio organismo (proteínas endógenas). El tipo de alimentación influye marcadamente en el origen de estas proteínas: los animales carnívoros pueden obtener 90% de los requerimientos de energía a partir de las proteínas de la dieta, mientras que en los herbívoros solo una pequeña fracción de las necesidades energéticas son cubiertas por proteínas exógenas. También ocurre degradación oxidativa de los aminoácidos cuando hay un exceso de ingestión de proteínas en la dieta y para metabolizar parte de los aminoácidos producidos en la proteólisis intracelular, la cual ocurre normalmente en todos los tejidos del organismo. La degradación de los aminoácidos incluye su desaminación. El grupo NH_4^+ debe ser rápidamente metabolizado debido a su toxicidad, sea mediante su incorporación a otros aminoácidos para ser reciclado, o mediante su excreción en la forma de urea (en los mamíferos) o de ácido úrico (en las aves).

Catabolismo de los aminoácidos

Los aminoácidos son degradados oxidativamente cuando están en exceso, en el caso de dietas con un nivel de proteínas que exceda las necesidades del organismo, en situaciones en que las necesidades energéticas obligan a usar aminoácidos como fuente de energía (agotamiento de las reservas de glicógeno y de triglicéridos), o en el caso de proteólisis intracelular. Aunque poco se conoce sobre esta última, se sabe que se realiza a una velocidad elevada, evidenciada por el constante retorno metabólico (*turnover*) de las proteínas endógenas. Las proteínas endógenas pueden sufrir hidrólisis hasta aminoácidos, que pueden ser reciclados para la síntesis de nueva proteína, o funcionar como sustratos energéticos. Por otro lado, si el organismo está en balance positivo de proteínas (mayor ingreso que gasto), la proteólisis endógena aumenta. En caso de balance neutro, la proteólisis endógena también ocurre, aunque a una velocidad menor. En ese caso se considera que la tasa de retorno metabólico diario de las proteínas está en torno de 0,6% del peso corporal (por ejemplo, una vaca de 500

kg degrada 3.000 g de proteína endógena por día). El 25% de esa proteína, en la forma de aminoácidos, es completamente oxidada para la producción de energía o es convertida en precursores gliconeogénicos para la formación de glucosa. El 75% restante se recicla para formar nueva proteína.

La degradación oxidativa de los aminoácidos se realiza por rutas catabólicas específicas, diferentes para cada uno de los veinte aminoácidos proteicos, aunque todas las rutas convergen en uno de los siguientes metabolitos: piruvato, acetil-CoA o compuestos intermediarios del ciclo de Krebs. Con excepción de los que convergen en acetil-CoA, los aminoácidos constituyen sustratos precursores de la gliconeogénesis. El grupo amina de los aminoácidos (NH_4^+) se excreta en forma de urea, ácido úrico o amonio, dependiendo de la especie animal. El catabolismo de los aminoácidos tiene lugar en el hígado, principalmente, y una menor parte en el riñón. La primera etapa de la degradación oxidativa de los aminoácidos es la separación del grupo amina, la cual se realiza mediante dos rutas integradas: transaminación y desaminación oxidativa.

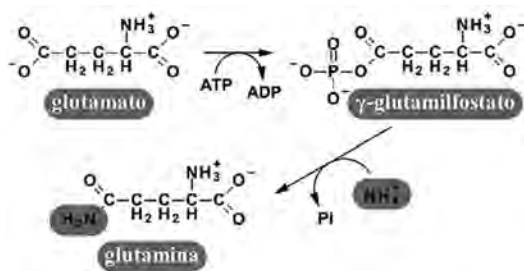
Transaminación

Las reacciones de transaminación de los diferentes aminoácidos son realizadas por enzimas específicas llamadas transaminasas o aminotransferasas, que utilizan como sustrato, además del aminoácido, el α -cetoglutarato, transfiriendo el grupo amina del aminoácido para el carbono α del α -cetoglutarato y formando el α -cetoácido análogo del aminoácido más glutamato. Las aminotransferasas requieren como coenzima el piridoxal-fosfato (forma enzimática de la vitamina B₆), el cual se encuentra como grupo prostético de las transaminasas. Esas enzimas catalizan las reacciones conocidas como ‘biomoleculares ping-pong’: el primer sustrato (aminoácido) se une al sitio activo de la enzima y pierde su grupo amina, produciéndose un α -cetoácido. Este grupo es tomado por el piridoxal-fosfato, que se transforma en piridoxamina-fosfato. Después entra el segundo sustrato (α -cetoglutarato), el cual acepta el grupo amina de la piridoxamina, convirtiéndose en glutamato. Debido a esas reacciones los grupos amina de los diversos aminoácidos son recogidos en un único aminoácido: glutamato. Las reacciones de transaminación son termodinámicamente reversibles ($\Delta G^\circ = 0$ kJ/mol).



Desaminación oxidativa

Mediante la desaminación oxidativa el glutamato que recoge los grupos amina de varios aminoácidos en las reacciones de transaminación es oxidado y desaminado, por acción de la enzima glutamato deshidrogenasa, mediante una reacción que ocurre en la mitocondria de los hepatocitos. La glutamato deshidrogenasa es una enzima alostérica (peso molecular 330 kDal) que tiene seis subunidades idénticas, siendo estimulada por ADP, GDP y algunos aminoácidos, e inhibida por ATP, GTP y NADH. Requiere de NAD⁺ (o NADP⁺) como receptor de los electrones. La acción combinada de las transaminasas y la glutamato deshidrogenasa se conoce como ‘transdesaminación’. Cuando la célula está necesitando de energía (mayor relación ADP/ATP), la acción de la glutamato deshidrogenasa aumenta para suministrar α -cetoglutarato en el ciclo de Krebs. Cuando hay suficiente energía, el GTP producido en el ciclo de Krebs inhibe la glutamato deshidrogenasa. El NH₄⁺ formado puede ser reutilizado para la síntesis de nuevos aminoácidos o ser excretado en forma de urea, en el caso de los vertebrados terrestres (animales ureotélicos), en forma de ácido úrico en los reptiles y en las aves (animales uricotélicos), o en forma de amonio en los peces (animales amoniotélicos). El grupo amina de muchos tejidos es transportado para el hígado como glutamina por la acción de la enzima glutamina sintetasa, en una reacción que requiere de ATP para activar el glutamato y que tiene dos etapas:



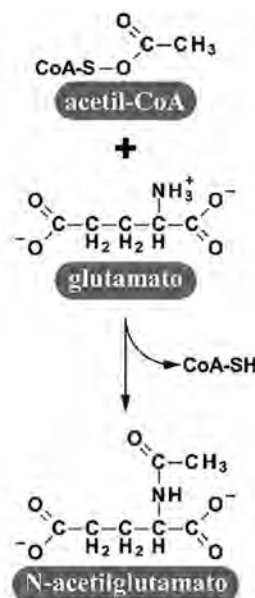
En la mitocondria hepática el amonio se libera de la glutamina para formar glutamato mediante la enzima glutaminasa. La glutamina es el principal transportador de NH₄⁺ en la sangre, teniendo mayores niveles sanguíneos que cualquier otro aminoácido. Su estructura, sin las cargas eléctricas del glutamato, facilita su paso a través de las membranas. El grupo amina también puede ser transportado desde los tejidos (especialmente desde el músculo) al hígado por la alanina, debido a la acción de la enzima alanina aminotransferasa (ALT), que actúa reversiblemente

en ambos tejidos (**Figura 3.3**). La alanina, sin cargas eléctricas en su residuo, atraviesa fácilmente las membranas. La anterior reacción sirve también para remover el piruvato del músculo, producido en la glicólisis. El piruvato puede ser llevado al hígado, donde sirve de precursor de glucosa vía gliconeogénesis. La glucosa puede volver al músculo para servir de fuente de energía (‘ciclo glucosa-alanina’).

Ciclo de la urea

Los animales ureotélicos sintetizan urea a partir del grupo amina liberado por los aminoácidos, mediante una serie de reacciones conocidas como el ciclo de la urea, vía descrita por Krebs y Henseleit en 1932, antes de ser dilucidado el ciclo del ácido cítrico. En ese proceso, que se realiza en el hígado, se incorporan dos grupos amina y un CO₂ en la molécula de urea. Las dos primeras reacciones del ciclo ocurren en la mitocondria del hepatocito y las restantes en el citosol. Las reacciones del ciclo de la urea son las siguientes (los números entre corchetes corresponden a las enzimas de la **Figura 3.4**).

(a) Condensación de NH₄⁺ y CO₂: el CO₂ producido en la respiración celular y el amonio se condensan por medio de la enzima carbamil-fosfato sintetasa-I [4], reacción que es altamente endergónica, requiriendo dos ATP (la forma II de la enzima está en el citosol). La carbamil-fosfato sintetasa es una enzima regulatoria que tiene como modulador estimulador el N-acetilglutamato, compuesto producido a partir de acetil-CoA y glutamato por la enzima N-acetilglutamato sintetasa:



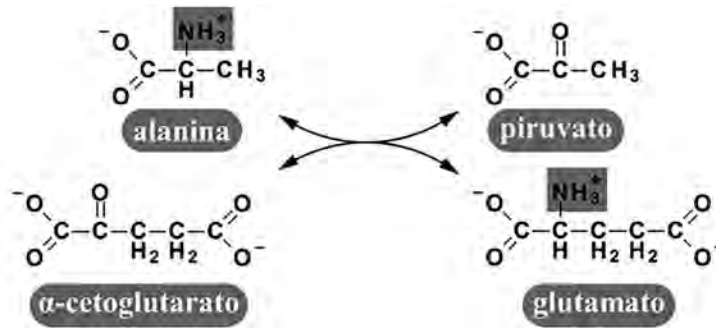


Figura 3.3. Reacción de transaminación catalizada por la enzima alanina aminotransferasa (ALT).

El grupo amino que es transferido del aminoácido para el α-cetoácido está resaltado en fondo gris.

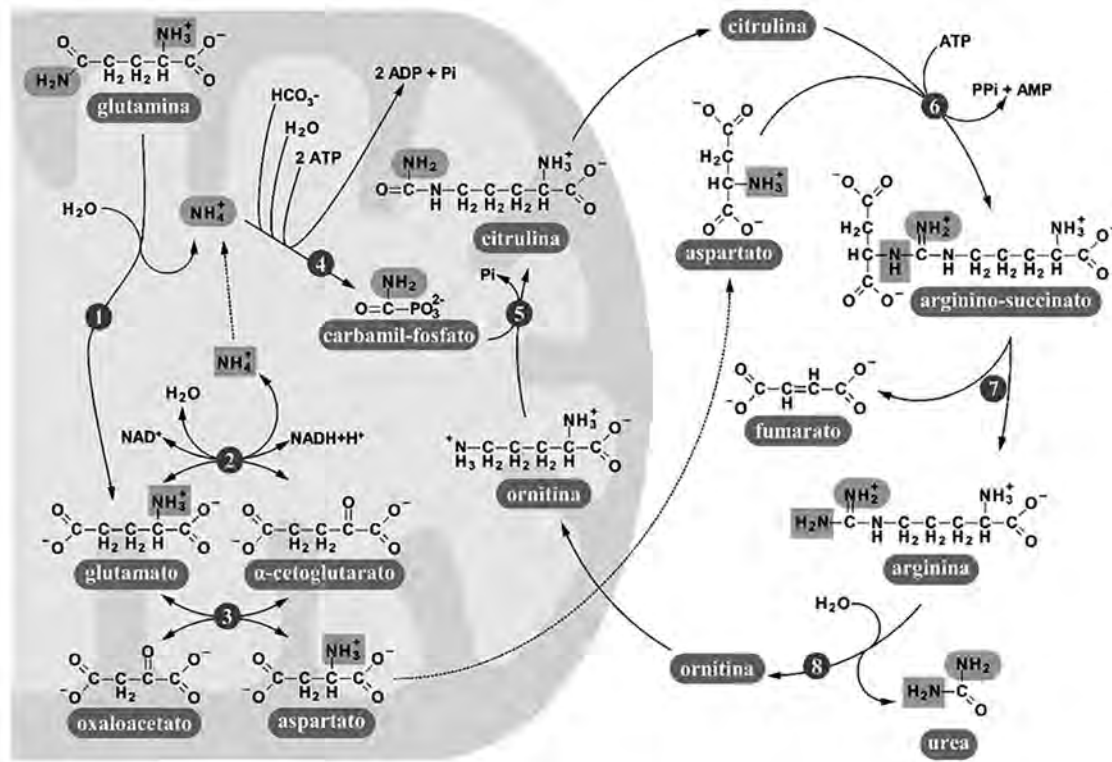


Figura 3.4. Ciclo de la urea

Los dos grupos amino de la glutamina que harán parte de la urea están resaltados en fondo gris. Para facilitar la identificación, uno de ellos tiene bordes rectos y el otro bordes redondos. Las principales enzimas están indicadas: [1] glutaminasa, [2] glutamato deshidrogenasa, [3] aspartato aminotransferasa, [4] carbamil-fosfato transferasa, [5] ornitina-carbamil transferasa, [6] arginina-succinato sintetasa, [7] arginina-succinato liasa, [8] arginasa.

La enzima N-acetilglutamato sintetasa, a su vez, es estimulada por la arginina, compuesto intermediario del ciclo de la urea, que se acumula cuando el ciclo se torna más lento. Así, la arginina estimula la formación de N-acetilglutamato y este estimula la acción de la

carbamil-fosfato sintetasa para aumentar la velocidad de ciclo de la urea.

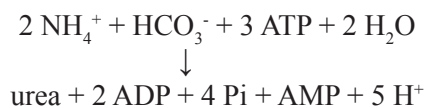
(b) Formación de citrulina: el aminoácido ornitina entra en la mitocondria para condensarse con el grupo

carbamil-fosfato y formar citrulina, a través de la acción de la enzima ornitina-carbamil transferasa [5], reacción facilitada por la hidrólisis del grupo fosfato del carbamil-fosfato. Hasta aquí las reacciones ocurren en la mitocondria. Después, la citrulina abandona la mitocondria para continuar el ciclo en el citosol.

(c) Condensación del aspartato con la citrulina: el aminoácido aspartato (que introduce otro grupo amina en el ciclo) se condensa con la citrulina en una reacción que consume energía, catalizada por la enzima arginina-succinato sintetasa [6]. El AMP producido en la reacción anterior debe ser convertido en ADP mediante la participación de un ATP, lo cual significa que en esta reacción se gastan, realmente, dos ATP.

(d) Excisión de la arginina-succinato: esta quiebra, mediante la enzima arginina-succinato liasa [7], origina fumarato, que ingresa en la mitocondria como intermediario del ciclo de Krebs, más el aminoácido arginina.

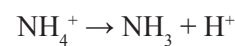
(e) Hidrólisis de la arginina y formación de urea: reacción catalizada por la arginasa [8], la cual tiene como cofactor Mn^{2+} para dar urea y reponer la ornitina, cerrando el ciclo. La ornitina vuelve a la mitocondria a fin de reiniciar un nuevo ciclo, y la urea puede ir al riñón vía sanguínea para ser excretada por la orina. La reacción global del ciclo de la urea se puede escribir así:



La formación de urea es un proceso endergónico, de alto costo energético, en el que se gastan cuatro ATP: dos para formar carbamil-fosfato, uno para formar arginino-succinato y otro para transformar el AMP que se produce en la formación de arginino-succinato en ADP.

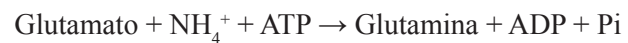
En los rumiantes los niveles sanguíneos de urea son elevados (23-58 mg/dL) debido a la absorción de amonio por el rumen. En estos animales el amonio se debe metabolizar en el hígado para dar urea, la cual se recicla regresando al rumen vías sanguínea o salivar, lo que significa un ahorro de la energía necesaria para la formación de urea y agua para su excreción. En los animales carnívoros la concentración de urea está entre 21 a 60 mg/dL.

La compartimentación en la mitocondria de las primeras dos reacciones del ciclo de la urea impide la salida para la sangre del ión amonio, el cual es altamente tóxico. Esa toxicidad se debe a que el amonio se puede incorporar en el α -cetoglutarato, compuesto intermediario del ciclo de Krebs, para dar glutamato, mediante la enzima glutamato deshidrogenasa (enzima [2], **Figura 3.4**). Un elevado nivel de NH_4^+ puede extraer demasiado α -cetoglutarato y, eventualmente, detener el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria, siendo especialmente sensible el tejido cerebral. Por otro lado, la forma protonada del amonio se disocia en el pH sanguíneo ($pK = 9,5$):



A pH 7,0 la mayoría del amonio se encuentra en la forma protonada (NH_4^+). Sin embargo, cuando hay exceso de NH_4^+ , una parte resulta en NH_3 provocando alcalinidad en los tejidos y causando fallas en el metabolismo celular.

En los peces el amonio se incorpora en el glutamato para formar glutamina en el hígado:



En el riñón la glutamina se vuelve a desaminar liberando amonio directamente por la orina:



El amonio en la sangre de los peces también puede ser eliminada directamente en el agua por las branquias. La excreción de amonio en forma de urea es dependiente de una gran disponibilidad de agua en el organismo. En las aves, cuyo peso corporal total tiene poca proporción de agua, a fin de permitir el vuelo, así como en los reptiles, que viven generalmente en ambientes áridos, el amonio se excreta en forma de ácido úrico, una purina que es intermediaria del catabolismo de los nucleótidos.

Vías catabólicas de los esqueletos carbonados de los aminoácidos

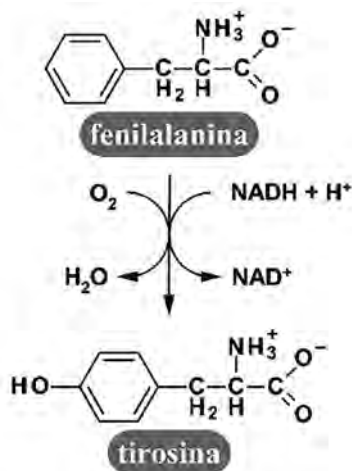
El catabolismo de los aminoácidos no es una vía tan activa como la glicólisis o la oxidación de los ácidos grasos. Las rutas catabólicas de los aminoácidos varían en su actividad, dependiendo de las necesidades

energéticas o biosintéticas del organismo. Existen veinte vías catabólicas, una para cada uno de los veinte aminoácidos proteicos, que convergen en cinco posibles productos finales, los cuales pueden ingresar en el ciclo de Krebs para seguir la oxidación total hasta CO_2 y H_2O , o para salir como precursores de la gliconeogénesis, dependiendo del estado metabólico del organismo. Diez aminoácidos pueden terminar en acetil-CoA, cinco terminan en α -cetoglutarato, cuatro en succinato, dos en fumarato y dos en oxalacetato; empero, varios de esos aminoácidos pueden tener otras rutas.

Vía acetil-CoA

Diez aminoácidos pueden terminar en acetil-CoA para entrar en el ciclo de Krebs: cinco de ellos vía piruvato y los restantes cinco pueden dar acetoacetil-CoA, el cual se rompe para dar dos moléculas de acetil-CoA. Los aminoácidos que generan piruvato son alanina, glicina, serina, cisteína y triptófano. Los aminoácidos triptófano, lisina, fenilalanina, tirosina, leucina e isoleucina producen acetil-CoA y/o acetoacetil-CoA. Estos últimos aminoácidos son llamados 'cetogénicos', aunque fenilalanina y tirosina también pueden producir fumarato, el triptófano puede asimismo formar piruvato y la isoleucina producir succinil-CoA vía propionil-CoA. Leucina es el único aminoácido rigurosamente cetogénico, esto es, que solo puede terminar en acetil-CoA.

En humanos existe una falla genética relacionada con el catabolismo de la fenilalanina: una deficiencia en la síntesis de la enzima fenilalanina hidroxilasa, que convierte fenilalanina en tirosina:



La enzima es una oxidasa que utiliza O_2 directamente para oxidar la fenilalanina: un oxígeno se incorpora como grupo hidroxilo (OH) para formar tirosina y el otro se reduce para dar H_2O , utilizando NADH. La enzima requiere como cofactor tetrahidrobiopterina, que funciona como transportador de los electrones desde NADH hasta O_2 . La deficiencia de fenilalanina hidroxilasa se conoce como fenilcetonuria y consiste en la acumulación de fenilalanina, la cual no se puede metabolizar normalmente. La fenilalanina toma una vía secundaria en la que ocurre transaminación con piruvato y formación de fenilpiruvato, metabolito que es descarboxilado para producir fenilacetato, cuerpo cetónico que da un olor característico a la orina. La fenilcetonuria se presenta en 8 de cada 100.000 individuos y puede causar severo retardo mental si no es tratada en el recién nacido.

Vía α -cetoglutarato

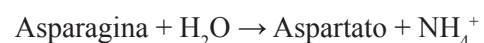
Los aminoácidos arginina, histidina, glutamato, glutamina y prolina son degradados vía α -cetoglutarato y entran directamente al ciclo de Krebs. Las vías catabólicas de todos esos aminoácidos terminan en glutamato, el cual es desaminado y oxidado para dar α -cetoglutarato por medio de la enzima glutamato deshidrogenasa (enzima [2], **Figura 3.4**).

Vía succinil-CoA

Los aminoácidos que son catabolizados vía succinato son metionina, isoleucina, treonina y valina. La isoleucina también puede generar acetil-CoA. Por esta vía los aminoácidos son convertidos en propionil-CoA, y a partir de este en succinil-CoA, mediante las mismas reacciones de la gliconeogénesis, que tiene como precursor el propionato. Esas reacciones son de vital importancia en los rumiantes, que dependen de esta ruta para convertir el propionato de origen ruminal en glucosa, vía succinil-CoA. Una enzima de esta ruta, la metilmalonil-CoA mutasa, es dependiente de la coenzima B_{12} .

Vía oxalacetato (OAA)

Solamente dos aminoácidos, aspartato y asparagina, son catabolizados vía OAA para entrar al ciclo de Krebs. La asparagina es desaminada por la enzima asparaginasa, generando aspartato:



Después, el aspartato sufre transaminación con α -cetoglutarato para dar OAA, mediante acción de la enzima aspartato aminotransferasa (enzima [3], **Figura 3.4**). Los aminoácidos que forman piruvato o metabolitos intermediarios del ciclo de Kebs pueden formar glucosa vía gliconeogénesis y son llamados ‘gliconeogénicos’. Cuatro aminoácidos pueden ser gliconeogénicos o cetogénicos, dependiendo de la ruta que sigan: triptófano, fenilalanina, tirosina e isoleucina.

3.4 Bioquímica del grupo hemo

El grupo hemo es un grupo orgánico funcional presente en varias proteínas, como la hemoglobina o los citocromos, y en algunas enzimas, como la catalasa. El grupo participa de reacciones de oxidorreducción o en el transporte de oxígeno, gracias a la presencia de un núcleo de hierro en su estructura.

Biosíntesis del grupo hemo

El grupo hemo puede ser producido prácticamente por todos los tejidos de los mamíferos, aunque su síntesis es más importante en la médula ósea (reticulocitos) y en el hígado, debido a las necesidades de hemoglobina y citocromos, respectivamente. El hemo está compuesto por un núcleo tetrapirrólico (anillo porfirínico) con un núcleo de hierro en su interior. El grupo deriva de ocho residuos de glicina y de succinil-CoA. Las principales etapas de biosíntesis se muestran en las **Figuras 3.5A** y **3.5B**. Los núcleos pirrólicos están unidos entre sí a través de puentes meteno. Cada núcleo pirrólico, en las posiciones de 1 a 8, pueden tener grupos funcionales que podrían ser de acetil, propionil, metil, etil y vinil. Cuando el núcleo tetrapirrólico no tiene esos grupos se llama porfina. Cuando hay grupos funcionales en las posiciones 1 a 8 se llaman porfirinas y tienen nombres específicos de acuerdo a los grupos presentes. Las porfirinas más abundantes que se encuentran en casi todos los vertebrados son las protoporfirinas, las cuales contienen cuatro grupos metil, dos vinil y dos propionil, existiendo varias formas isoméricas. La más abundante de esas formas es la protoporfirina IX (hemo), presente en la hemoglobina (Hb), la mioglobina (Mb), y en la mayoría de los citocromos, así como en las enzimas catalasa, peroxidasa y citocromo oxidasa. También se puede encontrar en forma libre como metabolito intermediario de los procesos de síntesis y degradación. Los grupos funcionales en cada posición de la protoporfirina IX están relacionados en la **Tabla 3.1**.

Las porfirinas son estables porque los puentes de metileno son oxidados, lo que permite la resonancia de los cuatro anillos pirrólicos. El hierro se liga a los cuatro N del núcleo de la protoporfirina IX y mediante dos enlaces se une a la porción proteica (globina en el caso de la Hb). Por tanto, el hierro queda con seis enlaces, siendo dos de ellos covalentes y cuatro de coordinación. El hierro en la forma reducida (ferrosa, Fe^{2+}) puede unirse al oxígeno. La forma oxidada (férrica, Fe^{3+}) no une O_2 . El punto de control de la síntesis del hemo es la enzima δ -aminolevulinato (ALA) sintetasa de la mitocondria, la cual es inhibida por la hemina (ferriprotoporfirina) y requiere de piridoxal-fosfato como cofactor. Deficiencias de esa vitamina llevarán a disminución de la síntesis de hemo y, por tanto, de Hb (causando anemia). Los eritrocitos no tienen núcleo, mitocondrias ni ribosomas, así que no pueden realizar la vía metabólica de síntesis de la Hb, que es hecha por los reticulocitos en la médula ósea. Las únicas vías metabólicas que los eritrocitos pueden hacer son la glicólisis anaeróbica y la vía de las pentosas-fosfato.

Degradación del grupo hemo

Los eritrocitos tienen una vida media que varía de acuerdo a la especie: puede ser desde 30 días en las aves hasta 160 días en las vacas. En las demás especies los valores son de 60-80 días en perro, gato, cerdo y conejo, y de 120-150 días en la cabra, la oveja y el caballo. La vida media de los eritrocitos humanos es de 120 días. Los eritrocitos son retirados de la circulación por reconocimiento de cambios en la membrana y fagocitados por las células de Küpffer, del sistema retículo-endotelial (principalmente en la médula ósea, bazo e hígado).

Kuster, en 1899, fue el primero en relacionar la bilirrubina con la hemoglobina (Hb). La Hb responde por 85%-90% de los pigmentos biliares formados. Otras proteínas que contienen el grupo hemo en su estructura, como los citocromos, también producen bilirrubina. La degradación de la Hb se inicia con la liberación de globina (fracción proteica) de la fracción hemo. La globina sufre proteólisis hasta aminoácidos, los cuales pueden ser reutilizados. El catabolismo del grupo hemo de la Hb comprende: (a) la degradación del anillo de porfirina, que implica un sistema de procesamiento de sus productos hidrofóbicos, y (b) retención y movilización del hierro, así como su reutilización.

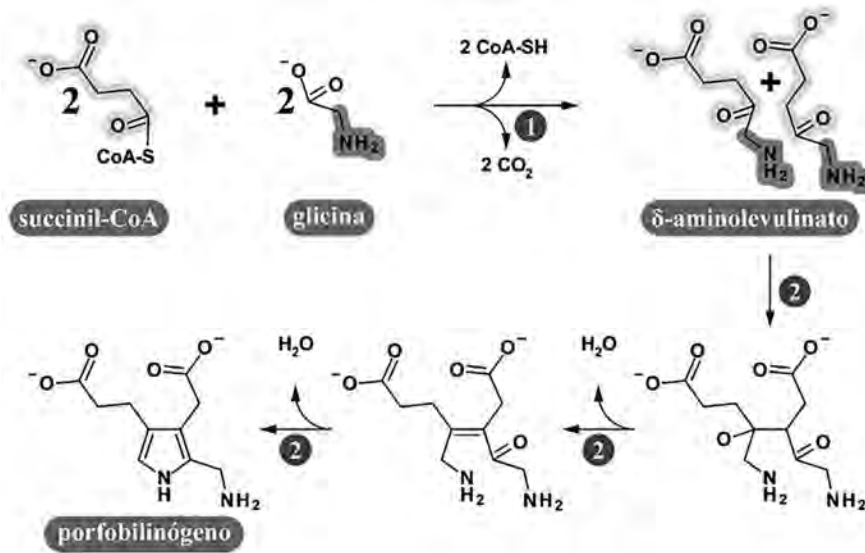


Figura 3.5A. Etapas iniciales de la biosíntesis de grupo hemo

Las partes de las moléculas del succinil-CoA y de la glicina que formarán el porfobilinógeno están resaltadas en fondo gris. Las enzimas son: [1] δ-aminolevulinato (ALA) sintetasa y [2] ALA deshidratasa.

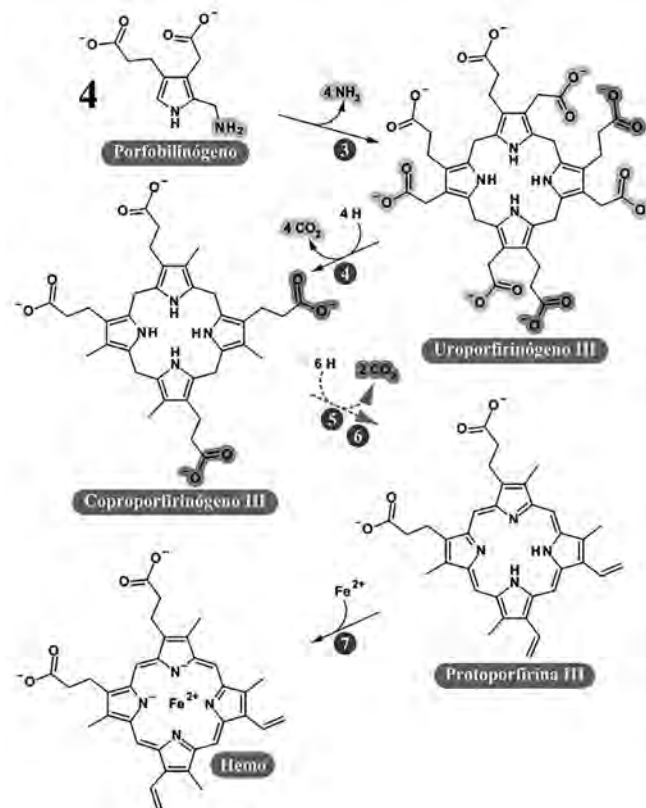


Figura 3.5B. Etapas finales de la biosíntesis de grupo hemo

Los grupos amino y carboxilo que son retirados en la forma de amonio y CO₂, respectivamente, están indicados en fondo gris. Reacciones múltiples están representadas por flechas punteadas. Las enzimas son: [3] uroporfirinógeno sintetasa, [4] uroporfirinógeno descarboxilasa, [5] coproporfirinógeno oxidasa, [6] protoporfirinógeno oxidasa, [7] hemosintetasa (ferroquetalasa).

Tabla 3.1 Grupos funcionales en la estructura del hemo

Posición	Grupo
1	CH ₃ (metil)
2	CH=CH ₂ (vinil)
3	CH ₃ (metil)
4	CH=CH ₂ (vinil)
5	CH ₃ (metil)
6	CH ₃ -CH ₂ -COO ⁻ (propionil)
7	CH ₃ -CH ₂ -COO ⁻ (propionil)
8	CH ₃ (metil)

El grupo hemo (protoporfirina IX más hierro) es oxidado por la enzima hemooxigenasa (en el sistema microsomal), que utiliza O₂, liberando CO + Fe (única fuente de monóxido de carbono en el organismo). El hierro es oxidado de Fe²⁺ a Fe³⁺. El grupo hemo sufre quiebra del puente α-metano (fuente de CO) entre los grupos pirrólicos que tengan residuos de vinilo (CH=CH₂). El anillo, ahora linearizado y sin hierro, se abre, y el producto de la reacción es la biliverdina IX, primer pigmento biliar producido en la degradación. La biliverdina IX sufre reducción (adición de 2H) por la enzima biliverdina reductasa, que utiliza NADPH como coenzima para producir bilirrubina IX.

Metabolismo de la bilirrubina

La **Figura 3.6** presenta un esquema del metabolismo de los pigmentos biliares. La bilirrubina es producida no apenas por los eritrocitos seniles, sino por el catabolismo de las todas las proteínas que contienen el grupo hemo.

La bilirrubina libre es poco soluble en la sangre, siendo transportada por la albúmina y por la α₂-globulina hasta el hígado, donde es conjugada por la enzima glicuronil transferasa a diglicurónido de bilirrubina (**Figura 3.7**). La bilirrubina conjugada es soluble en el plasma y se excreta por la bilis y la orina. En el intestino, hidrolasas bacterianas reducen la bilirrubina para formar urobilinógeno, compuesto incoloro. El urobilinógeno en el intestino es oxidado a estercobilina, uno de los pigmentos de las heces (**Figura 3.8**). Parte del urobilinógeno en el intestino es reabsorbido y regresa a la corriente circulatoria a excretarse vía biliar o urinaria. Así, en la orina se puede encontrar tanto bilirrubina conjugada como urobilinógeno. La

bilirrubina libre se une fuertemente a la albúmina, de forma que no se puede excretar por el riñón.

Del urobilinógeno producido en el intestino por reducción de la bilirrubina, 20% es reabsorbido y el resto es oxidado a estercobilina. La mayor parte de estercobilina se excreta con las heces y una pequeña parte puede ser reabsorbida, convertida en urobilina y excretada por la orina, confiriéndole su coloración amarilla. Del total de urobilinógeno reabsorbido, 90% es reexcretado por la bilis y solamente 10% entra en la sangre y puede ser excretado en la orina. Por tanto, el urobilinógeno presente en condiciones normales en la orina representa apenas 1%-2% del total producido. En la **Figura 3.9** se muestra el ciclo enterohepático normal de los pigmentos biliares. En el plasma se puede encontrar tanto bilirrubina conjugada o directa, como bilirrubina libre (de hecho unida a proteínas) o indirecta. Los términos 'directa' e 'indirecta' se refieren a que la bilirrubina conjugada reacciona directamente con el reactivo de Ehrlich (sales de diazonio) para rendir pigmentos azo, mientras que la bilirrubina libre solo reacciona después de la adición de etanol (indirectamente) para poder romper en enlace no covalente con la albúmina. En el laboratorio se determina la bilirrubina total por el método del metanol, propuesto por Malloy y Evelyn en 1937, y la bilirrubina conjugada (directa), por el método de Van der Bergh. La bilirrubina libre (indirecta) es calculada por diferencia entre la bilirrubina total menos la directa. Los valores sanguíneos referenciales de las bilirrubinas total y directa de algunas especies se muestran en la **Tabla 3.2**. El umbral renal de eliminación de bilirrubina conjugada es de 0,4 mg/dL. Una tercera forma de bilirrubina que se une covalentemente a la albúmina ha sido reportada en casos de disturbios hepatocelulares.

Variaciones de bilirrubinemia entre las especies

El caballo puede presentar una ictericia fisiológica debido al alto tenor de bilirrubina libre en condiciones normales, especialmente en ayuno (hasta 7 mg/dL), que se ve exacerbada con alto consumo de carotenoides y xantofilas. En hepatopatías el caballo puede tener niveles de hasta 25 mg/dL de bilirrubina total, siendo menos de 10% de ese valor bilirrubina conjugada. En la anemia hemolítica y en anemia infecciosa equina los niveles de bilirrubina total pueden ir a 70 mg/dL (la mayoría bilirrubina libre). La causa de la hiperbilirrubinemia de ayuno en los caballos es

debida a la disminución de la excreción por el hígado (debido a la ausencia de vesícula biliar), y no a una mayor producción del pigmento.

En los rumiantes, a diferencia de los equinos, no hay grandes aumentos de bilirrubina, aun en disturbios hepáticos. Se considera que hay ictericia cuando los niveles de bilirrubina directa en la sangre pasan de 2,0 mg/dL. En general se puede considerar que, si la bilirrubina en exceso es más de 50% conjugada,

se trata de ictericia hepática, y si es más de 90 % conjugada se trata de una ictericia obstructiva. Niveles proporcionalmente mayores de bilirrubina libre reflejan una ictericia hemolítica. En bovinos y equinos es aconsejable utilizar otros indicadores de la función hepática, diferentes de bilirrubina (colesterol, albúmina, enzimas como ALT, GGT, LDH, FA). Se considera que un aumento muy grande de bilirrubina en bovinos, debido a una lesión hepática, representa un estado terminal con muy mal pronóstico.

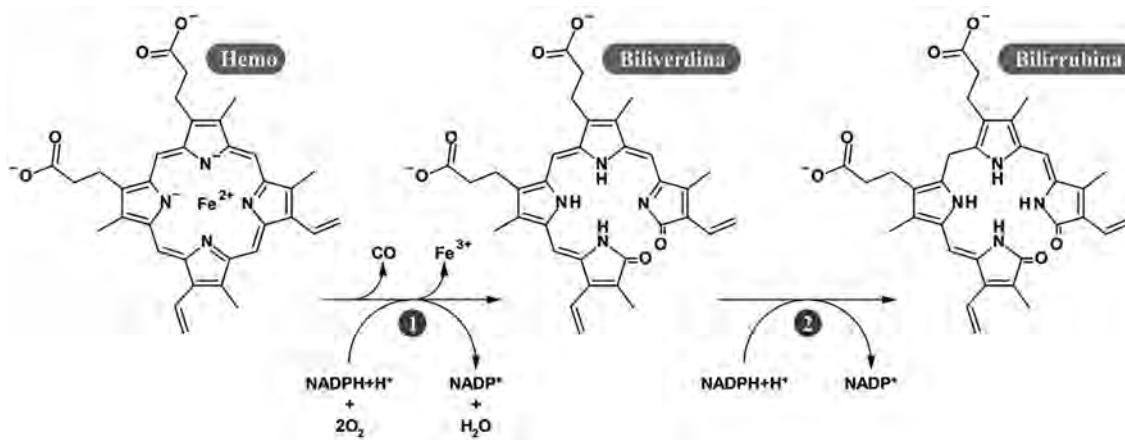


Figura 3.6. Catabolismo del hemo y formación de bilirrubina

Las enzimas participantes en esta parte de la ruta catabólica son: [1] hemo oxigenasa y [2] biliverdina reductasa.

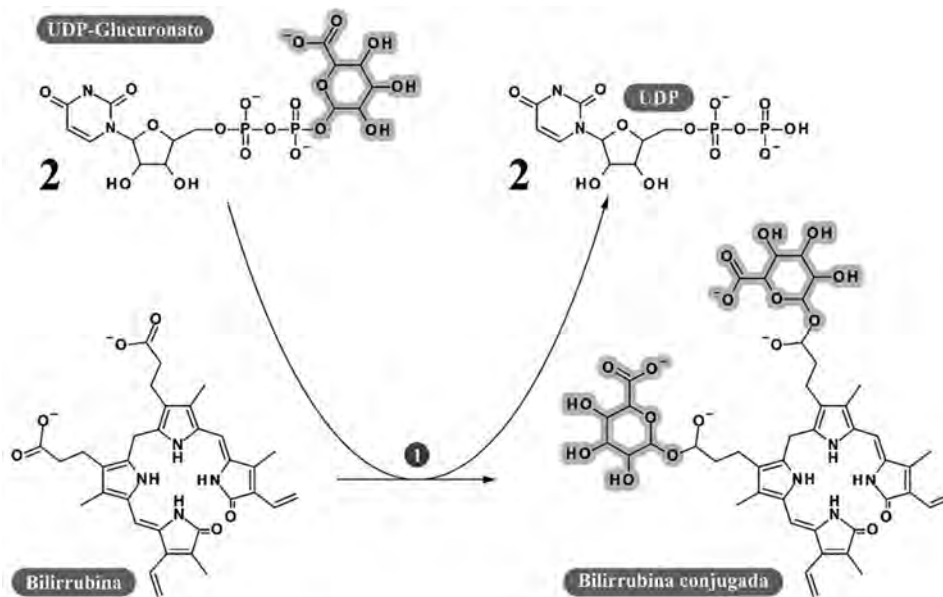


Figura 3.7. Conjugación hepática de la bilirrubina con UDP-glucuronato

Las moléculas del glucuronato que son transferidas para los grupos propionil de la bilirrubina están resaltadas en fondo gris. La enzima participante es: [1] glucuronato transferasa.



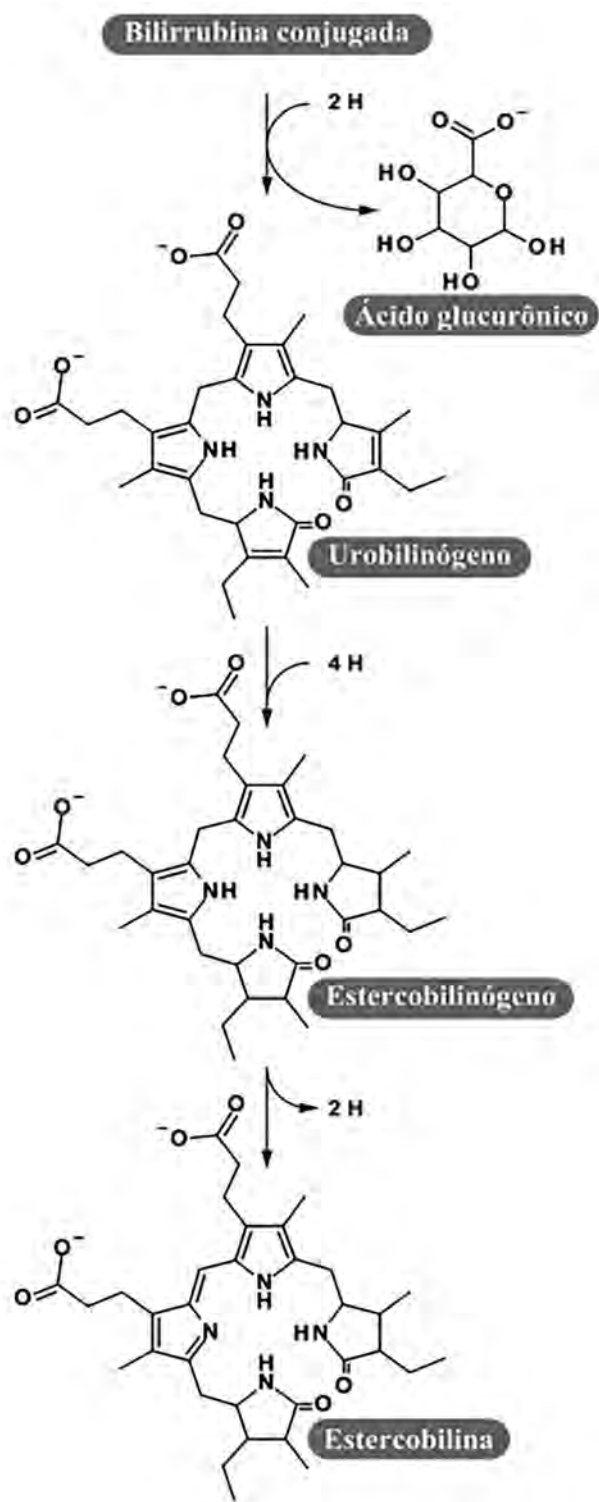


Figura 3.8. Modificaciones intestinales de la bilirrubina

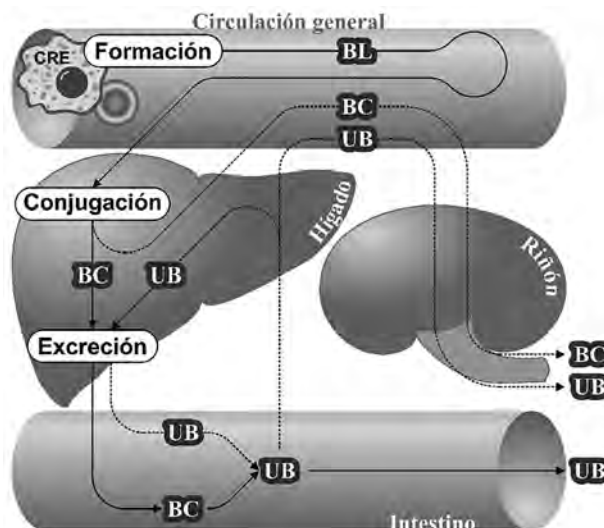


Figura 3.9. Circulación enterohepática fisiológica de pigmentos biliares

Las etapas de formación, de conjugación y de reducción intestinal de la bilirrubina conjugada, corresponden a las reacciones mostradas en las Figuras 3.6, 3.7 y 3.8, respectivamente. El espesor de las líneas tiene relación con la concentración de los metabolitos. La representación con línea punteada significa que la concentración es proporcionalmente muy baja. CRE, célula retículo-endotelial; BL, bilirrubina libre; BC, bilirrubina conjugada; UB, urobilinógeno.

Tabla 3.2 Valores de referencia de bilirrubina sanguínea (mg/dL) en algunas especies

Especie	Bilirrubina conjugada	Bilirrubina total
Bovinos	0,04-0,44	0,01-1,0
Equinos	0-0,4	1,0-2,0
Felinos	0-0,1	0,15-0,5
Porcinos	0-0,3	0-0,6
Caprinos	0-0,3	0-0,1
Ovinos	0-0,27	0,1-0,5
Caninos	0-0,14	0,1-0,6
Primates	0,03-0,05	0,4-0,5
Humano	0,2	< 1,0

En casi todas las especies puede ocurrir ictericia fisiológica en los neonatos, por la destrucción de eritrocitos. También se puede observar ictericia fisiológica en el ayuno y en la gestación. En ratas de la raza Wistar ha sido identificada una ictericia de origen hereditaria debido a un gen autosómico recesivo llamado *w*. Los animales afectados (*ww*) tienen defecto genético en la síntesis de la enzima glucuronato transferasa, que conjuga la bilirrubina libre, apareciendo altos niveles de bilirrubina en la sangre, como si fuera una hemólisis.

Pigmentos biliares en la orina

Normalmente se encuentran niveles muy bajos de bilirrubina conjugada en la orina de caballos, ovejas, cerdos y gatos. En el perro el umbral renal para bilirrubina conjugada es bajo. Así, en disturbios hepáticos en esta especie, el nivel sanguíneo de bilirrubina conjugada podría no aumentar mucho, pero el nivel en la orina puede estar bastante elevado (bilirrubinuria). En la hemólisis, sin embargo, los niveles de bilirrubina libre son elevados en la sangre, pues la bilirrubina libre no puede pasar la barrera renal. Si los aumentos de bilirrubina total en el perro están compuestos de 50% de bilirrubina conjugada, es indicativo de lesión hepatocelular.

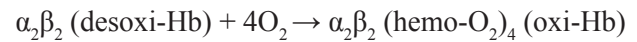
En la obstrucción hepática (cálculos, tumores, parásitos), la bilirrubinuria es de mayor dimensión, siendo el tenor de bilirrubina en la orina directamente proporcional al grado de obstrucción. La bilirrubinuria también puede ocurrir, además de hepatopatías y obstrucciones extra-hepáticas, en situaciones febriles y, en bovinos, en reticulitis traumática y lipidosis hepática.

El nivel de urobilinógeno en la orina está aumentado en la ictericia hemolítica (anemias) y en disturbios hepáticos, así como en casos de insuficiencia cardíaca, por estasis hepática. El nivel de urobilinógeno está disminuido en la ictericia obstructiva, anemia hipocrómica (deficiencia de hierro), insuficiencia renal y depresión de la flora intestinal por uso de antibióticos.

Bioquímica de la respiración

El oxígeno en la sangre es transportado por dos vías: (a) como O_2 en solución, o (b) en combinación química con hemoglobina (Hb) en los eritrocitos. El transporte en la Hb es mucho más eficiente porque mientras la solubilidad de O_2 en la sangre es de 0,3 mL/dL, la Hb

carga 1,34 mL de O_2 /g de Hb. Como la concentración promedio de Hb en la sangre es de 15 g/dL, son transportados 20,1 mL/dL de sangre, o sea, 67 veces más que en solución. La Hb tiene cuatro subunidades proteicas, 2α y 2β cada una con un grupo hemo que puede cargar una molécula de O_2 en la unión con el ion Fe^{2+} (**Figura 3.10**):



Esta reacción es posible bajo la presión de O_2 en los alvéolos pulmonares (100 mmHg). En los alvéolos también hay CO_2 (40 mmHg), N_2 (571,8 mmHg) y H_2O (47 mmHg). La porción hemo de la Hb es idéntica en todos los vertebrados. La protoporfirina IX puede combinarse con Fe o con Mg, pero también con Zn, Ni, Cu, Co y Ag. Cuando se une con Fe se llama ferroprotoporfirina (Fe^{2+}) o hemo- y feriprotoporfirina (Fe^{3+}) o hemin. La Hb unida a CO se llama carboxi-Hb, siendo fotosensible, pues en la presencia de luz libera el CO. La meta-Hb es la Hb con grupo hemin, o sea, con el hierro oxidado (Fe^{3+}), lo cual puede ocurrir por agentes oxidantes, como peróxidos, ferricianuro, nitritos y quinonas. La meta-Hb, presente en pocas cantidades bajo condiciones normales de la sangre, no puede unir O_2 ni CO. Puede ser reducida por ditionito de sodio ($Na_2S_2O_4$). Cuando la Hb se combina con el ion cianuro (CN^-) forma la ciano-Hb. Este ion también puede unirse a la meta-Hb y formar cianomet-Hb.

La cadena α de la Hb tiene 141 residuos de aminoácidos y la cadena β 146. Las dos cadenas tienen 80 aminoácidos homólogos. El peso molecular total de la Hb es de 65 kD. Sin embargo, la Hb puede presentar heterogeneidad:

(a) Hb fetal-adulta (HbF-HbA): las cadenas α son iguales, pero la HbF tiene dos cadenas γ homólogas con la cadena α de la HbA (difieren en 37 residuos). En el feto, del total de Hb, 15% son HbF y 85% son HbA. La HbF garantiza la entrega de O_2 de la circulación materna para la fetal porque tiene mayor afinidad por el O_2 .

(b) Hb heterogéneas: en 10% de la Hb total del adulto existe HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$). La cadena δ difiere de la β en diez residuos de aminoácidos. No se conoce su función.

(c) Heterogeneidad genética: es anormal, existiendo más de trescientos tipos, casi siempre funcionales.

La Hb se une con el O_2 en cooperatividad positiva, esto es, a medida que la oxigenación aumenta, la



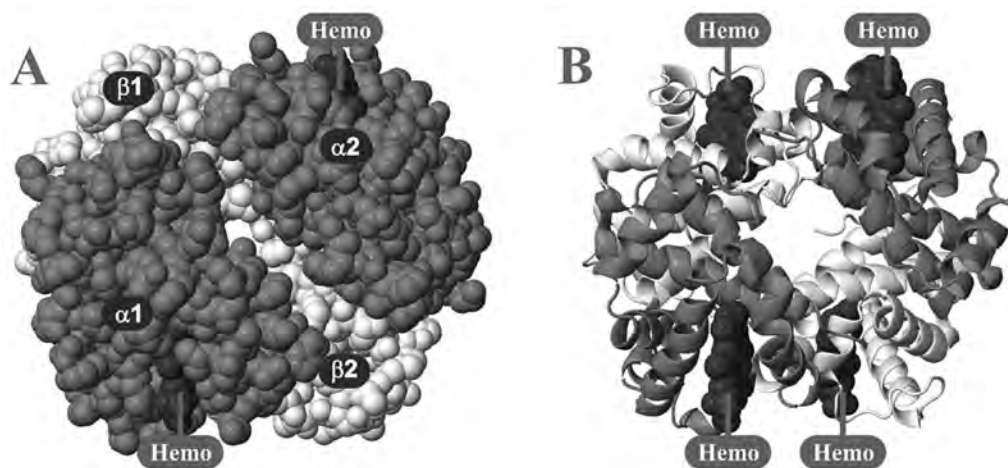


Figura 3.10. Estructura de la hemoglobina

En A, la molécula tiene sus átomos representados como esferas correspondientes a sus respectivos radios de Van der Waals (*spacefill*). En B, la molécula está representada en su estructura secundaria (*cartoon*).

combinación del grupo hemo de las otras cadenas de la Hb con moléculas adicionales de O₂ se vuelve más fácil (aumenta la afinidad por el O₂). Ese evento no ocurre en la mioglobina, pues solo tiene una cadena. La cooperatividad positiva se explica porque en la forma desoxidada (disociada) la Hb forma puentes electrostáticos entre las subunidades, los cuales se van rompiendo a medida que el O₂ se une a los grupos hemo, lo que facilita la unión con el O₂. Comparando las curvas de saturación de O₂ en la Hb y en la mioglobina, se observa que, mientras la curva de la mioglobina tiene una forma hiperbólica, la curva de la Hb tiene una forma sigmoidal. Esto indica que la presencia de O₂ en un grupo hemo tiene efecto en la constante de disociación del O₂ en los otros tres grupos de la misma molécula, siendo mayor en la cuarta disociación. La facilidad con que se une el O₂ en la cuarta subunidad es 150-300 veces mayor que la unión a la primera subunidad.

En la sangre arterial el porcentaje de saturación de la Hb es de 96%, mientras que en la sangre venosa es de 64%. Esto ocurre porque en la sangre arterial, la P₅₀ (presión de O₂ necesaria para saturar 50% de la Hb) es de 26 mmHg, y la presión de O₂ es de 100 mmHg. La mioglobina tiene una menor P₅₀, pues esta proteína se satura con 40-50 mmHg (Figura 3.11).

Efecto del CO₂ sobre la afinidad Hb-O₂

El CO₂ existe en la sangre: (a) como bicarbonato en el plasma y el eritrocito; (b) unido a proteínas plasmáticas

por los grupos amina formando grupos carbamina (R-NH₂ + CO₂ → R-NH-COO⁻ + H⁺); y (c) unido a Hb, formando carbamino-Hb. La Hb desoxidada une CO₂ con mayor afinidad que la HbO₂. La mayor proporción del CO₂ está como bicarbonato en el plasma. Su concentración en la sangre arterial es de 25,5 meq/L y en la sangre venosa es de 26,4 meq/L.

Se puede calcular la relación de bicarbonato/ácido carbónico en el plasma a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch, sabiendo que el pK del ácido carbónico es de 6,1 y el pH sanguíneo es de 7,4:

$$pH = pK + \log \frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]}$$

$$7,4 = 6,1 + \log \frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]}$$

$$\log \frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]} = 1,3$$

$$\frac{[HCO_3^-]}{[CO_2]} = 20$$

El CO₂ (y por tanto el pH) tiene efecto sobre la curva de disociación de O₂ en la Hb, desplazándola a la derecha (Figura 3.12).

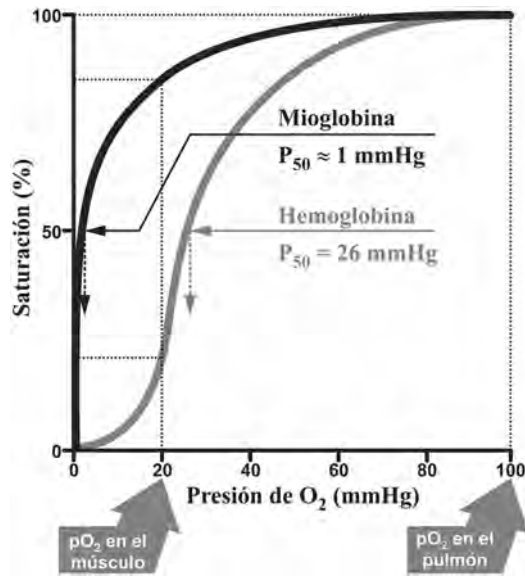


Figura 3.11. Curvas de saturación de la hemoglobina y la mioglobina con O₂.

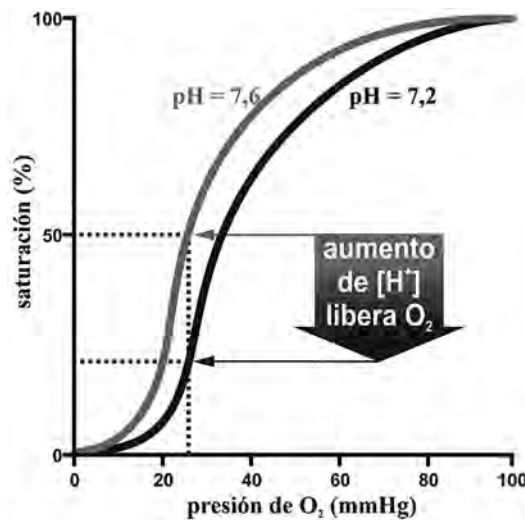


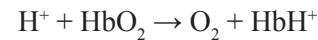
Figura 3.12. Efecto del pH sobre la curva de saturación de la hemoglobina con O₂.

Mientras más a la derecha (menor pH) la curva de disociación de la Hb necesita de mayor presión de O₂ para oxigenar la Hb, o sea, el CO₂ disminuye la afinidad del O₂ por la Hb, de forma que también el O₂ se libera más fácilmente de la Hb. Este es conocido como ‘efecto Bohr’ (Bohr fue el descubridor de hidrógeno). Con Hb pura el efecto Bohr es atribuible al pH (concentración de H), el cual, a su vez, depende

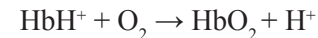
de cambios en la concentración de CO₂: el aumento en la concentración de CO₂ eleva la concentración de H⁺, por tanto disminuye el pH:



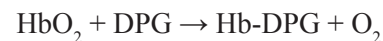
Así, en los tejidos periféricos, donde la concentración de CO₂ es mayor y por consiguiente la concentración de H⁺ también es mayor, la afinidad O₂-Hb disminuye y el gas es liberado más fácilmente (facilita la oxigenación de los tejidos):



En el pulmón, donde la concentración de CO₂ es menor y el pH mayor, aumenta la afinidad O₂-Hb, lo que permite la saturación de la Hb con O₂ a una baja presión de CO₂:



El 2,3-difosfoglicerato (DPG) es un metabolito producido en la ruta de la glicólisis, que se encuentra dentro de los eritrocitos a una concentración de 4-5 mM, bajo condiciones normales. Sin embargo, cuando la presión de O₂ disminuye en la atmósfera (alturas por encima de 2.000 m s. n. m.), el DPG aumenta. Este metabolito afecta la afinidad del O₂ por la Hb uniéndose a la Hb en un complejo 1:1, y disminuye la afinidad de la Hb con el O₂ debido a que promueve la disociación:



Esto favorece la oxigenación de los tejidos en mayor altitud.

3.5 Trastornos relacionados con compuestos nitrogenados

Porfirias

El término ‘porfiria’ proviene del griego *porfirus*, que significa ‘púrpura’, debido a que la orina de los pacientes afectados tiene esa coloración. Varios personajes de la realeza británica (la reina Mary y el rey George III) y artistas (Van Gogh) sufrieron formas de porfiria. Se cree, además, que la leyenda del conde Drácula, en Rumania, está atribuida a una rara porfiria eritropoyética que él sufría, cuyos síntomas incluyen fotosensibilidad extrema, hipertricosis en el rostro y las extremidades y coloración roja de los dientes.

La formación de porfirinas está relacionada con la biosíntesis del grupo hemo. Desarreglos en el metabolismo de las porfirinas causan porfirias, trastornos en los que la biosíntesis del grupo hemo está alterada, lo cual resulta en la acumulación de precursores tóxicos. La mayoría de las porfirias son hereditarias y se caracterizan por el aumento en la concentración sanguínea de protoporfirina y en la excreción de uroporfirinas y coproporfirinas. Las porfirias se clasifican en dos grupos: porfirias eritropoyéticas y porfirias hepáticas. Estas últimas son más frecuentes en humanos que en animales.

Etiología de las porfirias

Las porfirias pueden deberse a dos causas: (1) marcado incremento de la actividad de la ALA sintetasa, o (2) menor actividad de la uroporfirinógeno sintetasa. El resultado es aumento en la concentración de porfobilinógeno en la sangre, que puede ser detectado en la orina. El aumento de los pigmentos porfirínicos en la sangre causa dermatitis debido a su reacción con la luz solar. En humanos la enfermedad es rara y ha sido subdiagnosticada, situación que es más acentuada en animales.

Porfiria eritropoyética congénita

Es una enfermedad rara descrita en bovinos, porcinos y felinos. En humanos es conocida como enfermedad de Gunther. El defecto es hereditario, siendo autosómico recesivo en bovinos, y autosómico dominante en felinos, porcinos y humanos. En bovinos el trastorno fue descrito en las razas Shorthorn, Holstein y Ayrshire. Debido a que el factor es recesivo simple, los animales heterocigotos son normales.

Las señales clínicas en bovinos se caracterizan por la coloración marrón enrojecida de dientes, huesos y orina, exhibiendo marcada fluorescencia rosada cuando se irradian con luz ultravioleta. La exposición prolongada a la luz solar causa lesiones típicas de fotosensibilización, que se caracteriza por eritema agudo, edema y necrosis superficial en las regiones no pigmentadas de la piel. Las lesiones ocurren por la deposición de las porfirinas en los tejidos expuestos a radiación solar, ocurriendo formación de radicales libres en la célula, con ruptura de mitocondrias y lisosomas, degranulación de mastocitos cutáneos, degradación de la membrana fosfolipídica y de

polipéptidos proteicos y ácidos nucleicos, generando inflamación en la piel. También ocurre anemia normocrómica con macrocitos y microcitos y punteado basófilo marcante, con eventual esplenomegalia y fragilidad ósea. El animal se vuelve progresivamente apático y muere. En general, los porcinos no presentan fotosensibilización, pero el trastorno puede ser reconocido por la coloración de los dientes. En los felinos el disturbio es observado en época de la erupción de los dientes primarios, cuando se presentan con pigmentación acastañada y fluorescencia rosada bajo luz ultravioleta. Después de la erupción de los dientes permanentes, esa pigmentación se vuelve menos visible. En gatos no se observan señales sistémicas. En otros animales se puede apreciar orina de color rosado, dientes marrón-rosados y anemia severa, además de las lesiones de fotosensibilización.

Las bases metabólicas de este trastorno se caracterizan por la deficiencia de la enzima uroporfirinógeno III cosintetasa. En la ausencia de esta enzima se forman los isómeros uroporfirinógeno I y coproporfirinógeno I, los cuales no son convertidos a protoporfirinógeno ni sintetizan la porción hemo de la hemoglobina. Esto se debe a la falta de la enzima coproporfirinógeno I oxidasa y a la alta especificidad de la coproporfirinógeno III oxidasa. El uroporfirinógeno y el coproporfirinógeno oxidados corresponden a la uroporfirina y coproporfirina acumuladas. Estas porfirinas se depositan en los tejidos y, cuando son expuestas a luz ultravioleta, la piel reacciona liberando calor y causando lesiones a los tejidos. Los eritrocitos con cantidad aumentada de porfirinas son más susceptibles a la destrucción, teniendo una vida media menor que los eritrocitos normales. Esa disminución de la vida media está relacionada a un proceso hemolítico que no está bien esclarecido.

El diagnóstico se realiza por las señales clínicas y las alteraciones en los exámenes de laboratorio. La orina de los bovinos acometidos puede contener 500 a 1.000 $\mu\text{g/dL}$ de uroporfirinas y 356 a 1.530 $\mu\text{g/dL}$ de coproporfirina. La orina de bovinos normales contiene de 0,80 a 1,60 de uroporfirinas y de 2,05 a 6,15 $\mu\text{g/dL}$ de coproporfirinas. En la necropsia los huesos aparecen con coloración marrón o enrojecida. Los pigmentos porfirínicos se depositan en los huesos y dientes debido a poseer afinidad por los componentes minerales de esos tejidos. Además, las porfirinas se pueden depositar en otros órganos como pulmones, bazo y riñones.

La porfiria eritropoyética congénita en los bovinos se debe diferenciar de la protoporfiria eritropoyética (ver abajo), babesiosis, intoxicación por *Lantana* spp. y fotosensibilización causada por *Brachiaria* spp. En la babesiosis los animales presentan fiebre y demás señales de esta patología. Los casos de intoxicación por *Lantana* spp. ocurren en brotes y la planta es observada en la propiedad. Los casos de fotosensibilización por ingestión de *Brachiaria* spp. presentan apenas lesiones de piel y la presencia de la planta en los pastos. La fotosensibilización por *Brachiaria* spp es un problema provocado por la acumulación de clorofila en la piel asociada a la incidencia de rayos solares que se desarrolla cuando existen en conjunto lesiones hepáticas, generalmente causadas por el hongo *Pithomyces chartarum*, presente en esos pastos.

El tratamiento de las porfirias consiste en evitar la exposición al sol. De cualquier forma, los animales de producción que posean este disturbio deben ser eliminados de la reproducción. En humanos el tratamiento incluye hemotransfusiones y trasplantes alógenos de médula ósea. El tratamiento tópico con antisépticos y pomadas puede ser asociado.

Protoporfiria eritropoyética

Este desorden en el metabolismo de las porfirinas ocurre en bovinos (principalmente de la raza Limousine) y en humanos. Posee una herencia autosómica dominante en humanos y recesiva en bovinos, pudiendo estar ligada al sexo (ocurre apenas en hembras). El paciente portador de este disturbio presenta fotosensibilidad sin anemia, pigmentación dentaria u ósea ni porfirinuria. Hay un aumento de la protoporfirina fecal y en el eritrocito, debido a un defecto en la enzima ferroquelatasa (responsable por la incorporación de hierro a la protoporfirina IX).

El diagnóstico de esta porfiria es difícil porque la protoporfirina es insoluble y no es excretada en la orina. Solo es detectada cuando está en altas concentraciones en el plasma y los eritrocitos. Para auxiliar en el diagnóstico pueden ser realizadas mediciones de protoporfirina libre, biopsia de piel, análisis de porfirinas en la orina y las heces, hemograma completo, indicadores bioquímicos de función hepática, ecografía de hígado y vías biliares, radiografías y la eliminación de otras patologías que cursen con fotosensibilización. El tratamiento consiste en evitar

la exposición a la luz solar y usar betacarotenos en cantidades suficientes para que la piel adquiera una coloración amarilla volviéndola más resistente a la radiación solar. En conjunto pueden utilizarse protectores solares y pomadas de óxido de zinc.

Porfirias hepáticas

El nombre de este trastorno es debido a que es el hígado el local predominante del defecto metabólico. Deficiencias de enzimas específicas han sido identificadas para todas las formas de porfirias hepáticas. Son más frecuentes en humanos que en animales. La porfiria hepática ha sido dividida en: (a) aguda intermitente (tipo sueco), con manifestaciones neurológicas (temblores) y desarreglos psíquicos en humanos; (b) mixta, que puede ser con manifestaciones cutáneas, con manifestaciones de la porfiria tipo sueco, o con la combinación de señales clínicas; (c) sintomática, que puede ser idiosincrásica, asociada con alcoholismo, enfermedades sistémicas o intoxicación con plomo; o adquirida, cuando es inducida con hexaclorobenzeno o causada por hepatomas.

Porfiria hepática por intoxicación con plomo

El plomo es un metal tóxico que existe en abundancia y es muy utilizado en la industria. La intoxicación con plomo (plumbismo, saturnismo) puede afectar todos los animales domésticos, siendo un problema clínico significativo principalmente en perros. El plomo está presente en pinturas viejas, en proyectiles, pesos de pesca, soldaduras y otros materiales. Con relación al metabolismo del hemo, dos enzimas son especialmente sensibles a intoxicación con plomo, la ALA-deshidrogenasa, más fuertemente inhibida, causando una acumulación de ALA, y la ferroquelatasa, que cuando es inhibida eleva el nivel de protoporfirina IX libre y queda comprometida la síntesis del grupo hemo. Las alteraciones causan una anemia sideroblástica. La enzima coproporfirinógeno oxidasa también puede estar inhibida, llevando al aumento de coproporfirina. En aves acuáticas el saturnismo es considerado, hoy, una de las enfermedades más importantes, debido a la alta tasa de mortalidad y a la dificultad de prevención y control.

Las principales señales clínicas están relacionadas con el sistema nervioso y gastrointestinal: pérdida de peso, diarrea y vómito. Los síntomas nerviosos se



manifiestan por parálisis de las extremidades inferiores, ataxia, en algunos casos convulsión, y los animales presentan debilidad general. Los síntomas neurológicos pueden variar de estados de convulsión epileptiformes a alteraciones comportamentales sutiles. Tanto el cerebro como los nervios periféricos pueden estar afectados. También se observa anemia hipocrómica. En aves es observada atrofia de los músculos pectorales, volviéndose presas fáciles por la dificultad en levantar el vuelo. Puede ser observada también insuficiencia renal, debilidad neuromuscular, ataques de apoplejia y coma. La confirmación del diagnóstico de plumbismo es por medición de los niveles de plomo en la sangre. Concentraciones de plomo de 0,35 ppm o mayores son indicativas de intoxicación y concentraciones de 0,60 ppm o más son consideradas diagnósticas. La medición de ALA urinaria y protoporfirina sanguínea también pueden ser indicativas. En el hemograma se observa anemia y eritrocitos nucleados en circulación, además de disminución de la hemoglobina. La presencia de eritrocitos nucleados en circulación y de basófilos punteados, en ausencia de anemia es característico de la exposición crónica a plomo. Sin embargo, puede también desarrollarse anemia microcítica hipocrómica. La radiografía es útil en los casos de ingestión de cuerpos extraños y materiales radiodensos. Pueden ser observadas líneas de plomo en las radiografías óseas, que son franjas escleróticas de 2 a 4 cm de espesura en la metafisis de huesos largos de perros inmaduros.

El tratamiento consiste en la remoción del origen de la intoxicación y la utilización de fármacos quelantes de plomo, como EDTA cálcico y D-penicilamina. El EDTA al entrar en contacto con el plomo sustituye su ion calcio por el plomo, ocurriendo la formación de un complejo no tóxico que puede ser fácilmente eliminado. En casos de ingestión de cuerpos extraños conteniendo plomo, la remoción quirúrgica es indicada.

Ictericias

El nivel de bilirrubina es un índice del funcionamiento hepático. El aumento de bilirrubina en la sangre causa ictericia, coloración amarillenta de la piel y las mucosas debido a la deposición de pigmentos biliares. Existen tres tipos básicos de ictericias: hemolítica, hepática y obstructiva. La **Tabla 3.3** presenta un resumen sobre los niveles de bilirrubina en los diferentes tipos de ictericia.

Tabla 3.3 Alteraciones relativas en los niveles de bilirrubina en plasma y urobilinógeno en orina en los diferentes tipos de ictericia

Tipo de ictericia	Bilirrubina en plasma		Urobilinógeno en orina
	Libre	Conjugada	
Hemolítica	↑↑↑	↑	↑
Hepática	↑	↑	↑↑
Obstructiva	=	↑↑	-

Ictericia hemolítica (prehepática)

Ocurre por destrucción masiva intravascular de eritrocitos (anemia hemolítica), por ejemplo, en la anaplasmosis y en la babesiosis de los bovinos, o en la malaria de los humanos. En esos casos, la bilirrubina libre en exceso, ante la liberación masiva de hemoglobina, se acumula en la sangre, pues el hígado no puede procesarla con la misma velocidad con que se produce. La bilirrubina conjugada es excretada en el intestino y transformada en urobilinógeno, el cual, siendo reabsorbido por el propio intestino, tiene altos niveles en la sangre y, por tanto, también en la orina. Así, la ictericia hemolítica se caracteriza por tener altos niveles sanguíneos de bilirrubina libre, así como altos niveles de urobilinógeno en la sangre, en las heces y en la orina. Como la bilirrubina libre no puede ser excretada en la orina, se encuentra poca bilirrubina en la orina de los animales con este tipo de ictericia (**Figura 3.13**). En la crisis hemolítica puede ocurrir hemosiderosis (sobrecarga de pigmentos biliares en el hígado) y llevar a lesión hepática secundaria. En ese caso disminuye la excreción de urobilinógeno vía biliar, debido a la lesión hepatocelular, aumentando el nivel de urobilinógeno en la orina.

Varias causas pueden llevar a hemólisis: congénitas (porfirias, deficiencia de enzimas glicolíticas), virales (anemia infecciosa equina), bacterianas (leptospirosis, hemobartonelosis, eperitrozoonosis), rickettsias (anaplasmosis), protozoarios (babesiosis, citauxzoonosis, tripanosomiasis), inducidas por sustancias químicas (cebolla, propileno-glicol, aspirina, zinc, cobre), inmunomediadas (inmunocomplejos, isoeritrolisis neonatal). Como consecuencia de la hemólisis intravascular, hay un exceso de hemoglobina libre que se liga a la haptoglobina y es retirada por el sistema

fagocítico mononuclear. Cuando la hemoglobina supera los niveles de haptoglobina la primera se excreta por la orina (hemoglobinuria). La hemoglobina en exceso podrá inducir una nefrosis tubular tóxica. Como el mecanismo de secreción de bilirrubina es dependiente de energía, el consumo energético estará aumentado en los casos de hemólisis. Como la región centrolobular es la última porción del lóbulo hepático en recibir sangre, una reducción acentuada de oxígeno derivado de anemia y del consumo aumentado de energía puede inducir una lesión irreversible.

Ictericia hepática

Ocurre por lesión hepática (por ejemplo, en hepatitis, leptospirosis, intoxicación con tetracloruro de carbono). La bilirrubina libre, producida normalmente por el catabolismo de la hemoglobina, se acumula en la sangre debido a que el hígado lesionado no la procesa con rapidez. Por otro lado, los hepatocitos inflamados causan obstrucción de los canalículos biliares, impidiendo que la bilirrubina que está siendo conjugada consiga salir por la bilis, obligándola a extravasarse en la circulación y generando, por tanto, aumento anormal de la bilirrubina conjugada en la sangre. La poca bilirrubina conjugada que consigue salir por la bilis es procesada a urobilinógeno en el intestino, el cual es inmediatamente reabsorbido. Sin embargo, este urobilinógeno no puede ser excretado por la bilis debido a la lesión hepática, y debe, por tanto, excretarse por la orina. Así, en la ictericia hepática se encuentra aumento de los niveles sanguíneos de bilirrubina total (conjugada y libre), así como aumento de los niveles de urobilinógeno y de bilirrubina en la orina (**Figura 3.14**).

La ictericia es la anomalía específica más frecuente en perros y gatos con enfermedad hepática (20% de los perros y 30%-40% de los gatos). En los casos de enfermedad hepática difusa grave ocurre una combinación de factores para que haya hiperbilirrubinemia, tales como producción aumentada, depuración reducida, problemas en la conjugación por el hígado y colestasis. La hemólisis en el hepatopata es causada por la disminución de la vida media de los eritrocitos (en el perro la vida media cae de 60-80 días a 20-40 días). En este tipo de ictericia las mucosas aparecen normales o levemente pálidas. En la mayoría de los casos de enfermedades hepáticas con ictericia hay aumento de bilirrubina no conjugada, aunque menos que en los casos de hemólisis, y de bilirrubina

conjugada, teniendo también mayor eliminación de urobilinógeno por la orina debido a la lesión hepática.

Ictericia obstructiva (poshepática)

Ocurre por obstrucción de los ductos biliares, por ejemplo en los procesos inflamatorios causados en los canalículos biliares por la *Fasciola hepatica* en rumiantes. También en casos de tumores, cálculos biliares y pancreatitis extensiva. En esos casos la bilirrubina conjugada producida normalmente no consigue salir por la bilis y se acumula en la sangre. De esa forma, no se produce urobilinógeno (las heces son pálidas) y se encuentra aumento de bilirrubina conjugada tanto en la sangre como en la orina. Este tipo de ictericia es el que produce los más altos niveles de bilirrubina conjugada en el plasma y en la orina (**Figura 3.15**).

Se observa una distensión de ductos biliares próximos a la obstrucción seguida de distensión progresiva en sentido retrógrado a los ductos intrahepáticos. Con la cronicidad de la obstrucción ocurre extensa fibrosis hepática (fibrosis biliar) y puede ocurrir también ruptura de los canalículos y extravasamiento de bilis causando áreas focales de necrosis hepatocelular. En el perro la obstrucción del ducto común no siempre lleva a ictericia, pues existen normalmente ductos supranumerarios. En los gatos pueden encontrarse problemas hepáticos y pancreáticos simultáneos cuando hay obstrucción en la salida para el intestino, ya que los ductos colédoco y pancreático se unen antes de desembocar en el intestino. Esas dos anomalías asociadas con alteraciones intestinales forman el cuadro denominado triaditis.

Intoxicaciones que comprometen la función del grupo hemo

Intoxicación por monóxido de carbono

El monóxido de carbono (CO) resulta de la combustión incompleta (o sea, cuando no hay suficiente oxígeno para la combustión) de los compuestos orgánicos, especialmente de los combustibles hidrocarbonados, como por ejemplo en los motores de combustión interna. El CO es menos pesado que el aire y tiende por tanto a ir hacia arriba. Se considera que los niveles de CO en el aire limpio son de 0,02 ppm. En las calles de las grandes ciudades el nivel llega a 13 ppm y en las calles más polucionadas puede alcanzar los 40 ppm.



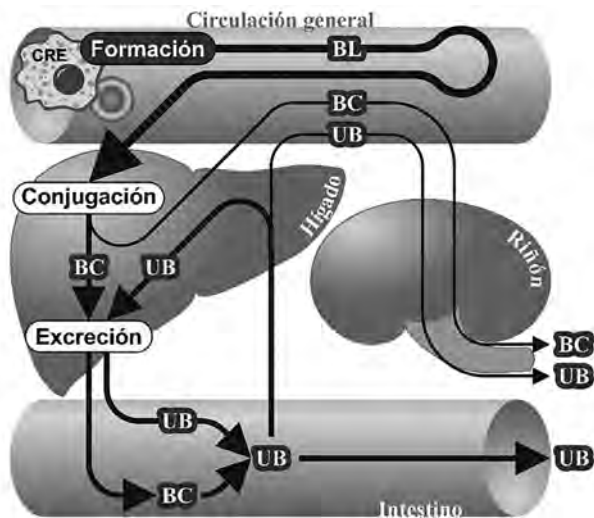


Figura 3.13. Circulación enterohepática de pigmentos biliares en la ictericia prehepática

La causa primaria de este tipo de ictericia es la excesiva formación y liberación de bilirrubina libre en circulación. El espesor de las líneas tiene relación con la concentración de los metabolitos. Comparar con la circulación enterohepática fisiológica de pigmentos biliares (Figura 3.9). CRE, célula retículo-endotelial; BL, bilirrubina libre; BC, bilirrubina conjugada; UB, urobilinógeno.

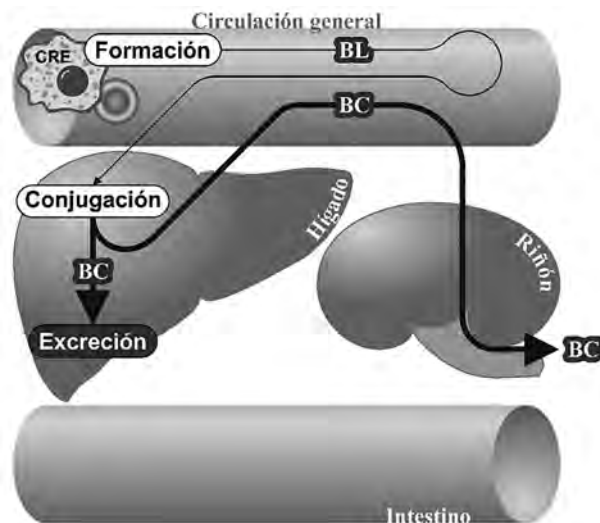


Figura 3.15. Circulación enterohepática de pigmentos biliares en la ictericia obstructiva

La causa primaria de este tipo de ictericia, también llamada obstructiva, es la dificultad en la excreción de la bilirrubina conjugada. El espesor de las líneas tiene relación con la concentración de los metabolitos. Comparar con la circulación entero-hepática fisiológica de pigmentos biliares (Figura 3.9). CRE, célula retículo-endotelial; BL, bilirrubina libre; BC, bilirrubina conjugada.

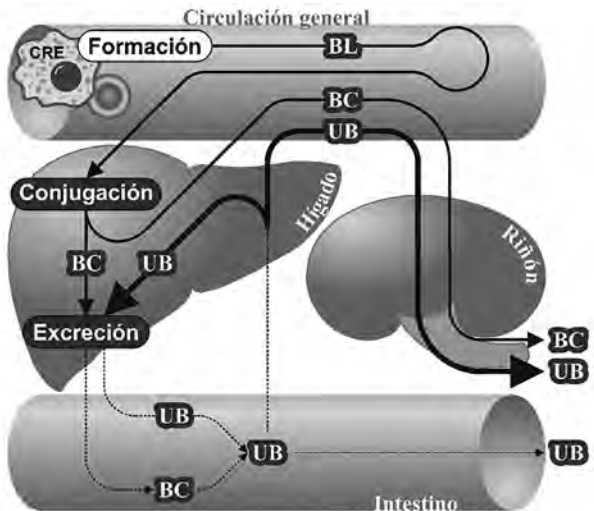


Figura 3.14. Circulación enterohepática de pigmentos biliares en la ictericia hepática

La causa primaria de este tipo de ictericia es la insuficiente formación de bilirrubina conjugada y su posterior excreción. También, el urobilinógeno que es reabsorbido del intestino y llega al hígado es progresivamente acumulado en los hepatocitos, extravasando para la circulación. El espesor de las líneas tiene relación con la concentración de los metabolitos. Comparar con la circulación entero-hepática fisiológica de pigmentos biliares (Figura 3.9). CRE, célula retículo-endotelial; BL, bilirrubina libre; BC, bilirrubina conjugada; UB, urobilinógeno.

El metabolismo animal produce pocas cantidades de CO a partir del catabolismo de la fracción hemo (1 mol de CO/mol de hemo). La producción endógena de CO lleva a la formación de carboxihemoglobina (COHb), la cual puede estar en la sangre en concentraciones de 0,5%-3%. Cuando el nivel de COHb alcanza 12% se inhiben los sistemas oxidasa de degradación del hemo que llevan a la formación de CO. Con niveles de hasta 3% de COHb en la sangre no se observan efectos clínicos. Con 6%-8% de COHb hay cierto mareo, y con 20% hay incoordinación motora. Con 20%-40% ocurre letargo, disnea, coma, y la muerte ocurre con niveles de 60%-70% de COHb en la sangre. El CO compete con el oxígeno por la unión a las proteínas con grupos hemo: hemoglobina, mioglobina, citocromo, catalasa, peroxidasa. La afinidad del CO es doscientas veces mayor que la del O₂ por la Hb, entre treinta y cincuenta veces mayor por la Mb, y es menor en los citocromos. El resultado es que el O₂ es impedido de ser transportado para los tejidos, causando hipoxia tisular. Por otra parte, la curva de disociación de la Hb se desplaza a la izquierda cuando la COHb llega a 10% en la sangre, o sea, la liberación de O₂ de la Hb a

los tejidos se ve disminuida, lo que puede ser resultado de que el O_2 ligado se une más fuertemente a la Hb cuando existen otros sitios de la Hb con CO. La P_{50} (presión de O_2 asociada con 50% de saturación de la Hb) cae en la sangre de 26,5 a 21 mmHg. El resultado es que el CO causa disminución de la entrega de O_2 a los tejidos. Además, los sitios de Fe^{2+} aun libres de la Hb adquieren más difícil reacción con el O_2 cuando la Hb tiene otros sitios unidos a CO.

La hipoxia tisular causada por el CO puede causar necrosis en las fibras cardiacas (afectando el ECG) y en las células del cerebro (afectando el comportamiento neurológico). La acidosis metabólica causada por el CO es compensada con hiperventilación, causando alcalosis respiratoria. La sangre se vuelve de color rojo brillante debido al aumento de O_2 que no puede entrar en las células (diferenciar de intoxicación por cianuro). Entre las diferentes especies, las aves y en particular los canarios son las más susceptibles a la intoxicación con CO. El perro es más sensible que el humano al CO. El animal afectado debe ser tratado inmediatamente con oxigenoterapia de preferencia con mezcla de CO_2 , para desplazar el CO (mezcla recomendable de 94% de O_2 y 4% de CO_2).

Intoxicación por nitritos

El ion nitrato (NO_3^-) es un componente del metabolismo de las plantas. El N atmosférico fijado por las bacterias en forma de amoníaco (NH_3) es convertido en nitrato y captado por las plantas, las cuales lo utilizan para la síntesis de proteínas. Los desechos nitrogenados animales (urea y amoníaco) son convertidos en nitrito (NO_2^-) que puede ser absorbido y utilizado por las plantas. Tanto los nitratos como los nitritos son solubles en agua de forma que, en el suelo, son lixiviados, pudiendo aparecer en reservorios de agua. Como fuentes importantes de contaminación de nitratos y nitritos están la materia orgánica en descomposición, fertilizantes nitrogenados (especialmente nitratos de sodio, de amonio y de calcio), desechos animales y residuos de ensilaje. En las plantas los nitratos se pueden acumular bajo algunas condiciones: (a) suelos con altos niveles de nitratos o amoníaco; (b) suelos húmedos y ácidos o con deficiencia de Mo, S o P; (c) suelos muy aireados; (d) condiciones

de seca o de frío (menor que 12 °C); (e) tratamiento con herbicidas. El nitrato se acumula más en el tallo de las plantas y menos en las hojas.

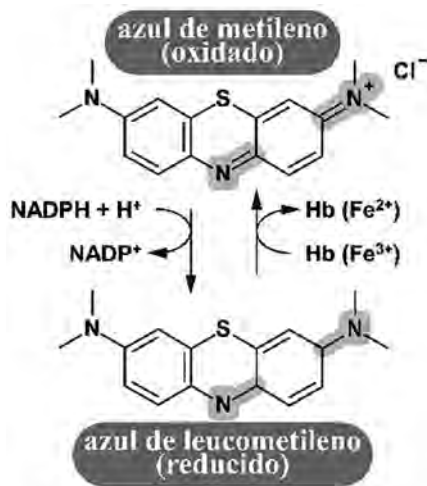
La intoxicación aguda por nitratos ocurre cuando las plantas contienen más de 1% de nitrato o cuando el agua contiene 1.500 ppm. La tolerancia a los nitratos en rumiantes aumenta con dietas de buena calidad o con bastantes carbohidratos solubles disponibles porque se acelera el proceso normal de reducción de los nitratos hasta amoníaco:



Los animales monogástricos son, en general, más tolerantes al nitrato, ya que no poseen mecanismos para reducirlo de forma rápida a nitrito, primer compuesto producido en la reducción y mucho más tóxico, como es el caso de los rumiantes. Sin embargo, son más susceptibles a los nitritos que a los nitratos comparados con los rumiantes (diez a tres). El ion nitrato como tal no es tóxico, pero puede ser reducido en el tracto gastrointestinal de los animales rumiantes y herbívoros a ion nitrito, el cual es altamente tóxico y de fácil absorción. El ion nitrito oxida el hierro Fe^{2+} de la Hb a Fe^{3+} formando metahemoglobina (MetHb), la cual no puede aceptar el O_2 , resultando en anoxia tisular. En la intoxicación aguda por nitratos las señales clínicas aparecen de una a cuatro horas después de la ingestión, siendo evidentes cuando los niveles de MetHb alcanzan 30%-40% del total de Hb, y la muerte ocurre con niveles de 80%-90% de MetHb. La proporción normal de MetHb con relación a la Hb varía de 0,6% a 1,4% (menor en el cerdo, intermedio en las vacas y mayor en el caballo). Entre las señales más comunes están salivación, vómito, diarrea, dolor abdominal y poliuria. La anoxia lleva a disnea, ataxia y poca resistencia al ejercicio, temblores, debilidad, convulsiones, mucosas cianóticas y pulso débil y rápido. La sangre aparece oscura (color chocolate) debido a la poca oxigenación. La formación de MetHb por la acción de los nitritos se puede considerar como una acción secundaria. La acción primaria de los nitritos es sobre el SNC y los vasos sanguíneos (pulso rápido y baja presión arterial). Los rumiantes son menos sensibles a ese efecto primario que los caballos, pero más susceptibles al efecto de la MetHb.



El tratamiento está dirigido para retornar el hierro de la Hb a su estado reducido. Se utiliza azul de metileno, el cual actúa en la sangre como agente reductor después de convertirse en azul de leucometileno:



Empero, hay que tener precaución con dosis excesivas de azul de metileno, pues puede revertir el proceso y aumentar la metahemoglobinemia. Se sugiere una dosis de 4 mg/kg de peso, administrada intravenosamente de una solución de azul de metileno 2%-4%. La administración de aceite mineral con sonda vía ruminal alivia la acción cáustica de los nitritos formados y facilita su eliminación. El uso de catárticos salinos y antibióticos, así como agua helada (12-20 L), ayudan a disminuir la acción reductora de las bacterias (por tanto la producción de nitritos) y mejoran la eliminación de nitrato. En caballos el efecto primario de los nitritos sobre el SNC y el sistema vascular se puede tratar con adrenalina. El nitrato también puede actuar como compuesto antitiroideo, pues interfiere con la captación de yodo por la tiroides. En vacas se puede presentar intoxicación crónica por nitratos, lo que resulta en disminución de la producción de leche y señales similares a la deficiencia de vitamina A.

Intoxicación por cianuro

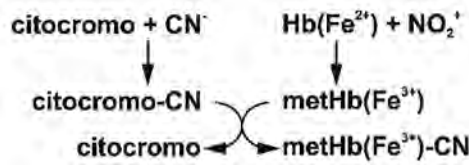
Los cianuros, designación genérica de las sales del ácido cianhídrico (HCN), son tóxicos de acción rápida. Pueden ser encontrados en algunas plantas, en productos de limpieza de metales, en venenos para roedores y en fertilizantes nitrogenados (e. g. cianamida de calcio). Muchas plantas acumulan glicósidos cianogénicos que pueden hidrolizarse y liberar HCN, entre otros,

sorgo, pasto sudán, maíz, trébol blanco, hojas de durazno. Normalmente la hidrólisis es inhibida en la planta porque existe separación compartimental entre la enzima (glicosidasa) y los glicósidos. Sin embargo, la hidrólisis puede ocurrir por congelamiento, marchitamiento o por falta de desarrollo. También puede ocurrir cuando las plantas son maceradas en el intestino. Los sorgos modernos han sido seleccionados genéticamente para tener bajo potencial cianogénico. La mayoría de la actividad cianogénica de las plantas está en las hojas y en las semillas. Las plantas de la familia Cruciferae, principalmente del género *Brassica* spp. (mostaza, brócolis, repollo, etc.), así como la soya y la linaza pueden contener tiocianuros, sustancias que inhiben la producción de hormonas tiroideas, resultando en hipotiroidismo y, eventualmente, bocio.

Los animales toleran pocas cantidades de cianuros. El ion cianuro (CN^-) reacciona con el Fe^{3+} de la citocromo oxidasa formando un complejo estable. La cadena de transporte de electrones es bloqueada y la respiración celular se detiene, causando anoxia citotóxica (O_2 no puede ser utilizado). Como resultado, la Hb no puede liberar más O_2 para que entre al sistema de transporte electrónico de las células, pues el tejido está con alta presión de O_2 . La sangre aparece con color rojo brillante por estar altamente oxigenada. El CN^- actúa más rápidamente en tejidos donde la citocromo oxidasa está más concentrada (SNC y corazón). Ocurre una rápida depresión de la actividad cerebral, aunque el centro respiratorio demora en ser afectado. La intoxicación es rápida y las señales clínicas aparecen en pocos minutos después de la ingestión. Inicialmente hay hiperexcitabilidad y temblores musculares, polipnea seguida de disnea, salivación, lagrimeo, evacuación de heces y orina y, finalmente, convulsiones debidas a la anoxia y muerte. Alrededor de cuarenta enzimas pueden ser inhibidas por el CN^- , pero la citocromo oxidasa es la más sensible (50% de inhibición reversible con 0,01 mM de CN^-) y es la que tiene mayor repercusión metabólica. Generalmente las intoxicaciones por cianuro en veterinaria son agudas. Niveles de cianuro de más de 200 ppm en plantas pueden causar intoxicación. Sin embargo, la toxicidad depende de: (a) tamaño del animal, (b) velocidad de la ingestión, (c) alimento que fue ingerido con el cianogénico y (d) capacidad de detoxificación.

El tratamiento debe conducir a la quiebra de la unión entre el CN^- y el Fe^{3+} de la citocromo oxidasa, lo

que puede ser hecho con nitrito de sodio para provocar la formación de metahemoglobina (MetHb), la cual compete con la citocromo oxidasa por el ion CN^- para formar cianometahb. La MetHb tiene mayor afinidad por el CN^- que la citocromo oxidasa:



En ese tratamiento se debe adicionar tiosulfato, el cual reacciona con el CN^- (con la enzima rodanasa) para formar tiocianuro, que es excretado por la orina. La dosis recomendada es una mezcla de 1 mL de nitrito de Na 20% + 3 mL de tiosulfato de Na 20%, aplicando intravenosamente 4 mL de la mezcla por cada 45 kg de peso.

Intoxicación por urea (amonio)

La urea es originaria del catabolismo de aminoácidos, ácidos nucleicos y amonio de origen endógeno o exógeno (proveniente de la dieta). Mientras más rica en proteína sea la dieta, mayor será la cantidad de urea plasmática. En casos de carencia de proteína el organismo reacciona reduciendo las pérdidas orgánicas de nitrógeno. La principal vía de excreción de nitrógeno es por la orina, mediante la eliminación de urea. Los rumiantes, además de la excreción urinaria, reciclan la urea por medio de la saliva que llega al rumen para ofrecer fuente nitrogenada a los microorganismos ruminales. Los riñones tienen gran capacidad de excretar urea, siendo filtrada de la sangre por el glomérulo renal, reabsorbida y excretada en los varios segmentos de los túbulos renales, que resulta en una gran concentración de urea por volumen de orina con relación a su concentración en la sangre. La cantidad de urea en la orina puede ser centenas de veces superior a la de la urea plasmática.

Los rumiantes, en el transcurso de la evolución, se alimentaron con dietas relativamente pobres en proteína, comparado con los monogástricos. Esto hizo que desarrollaran mecanismos compensatorios para economizar el nitrógeno eliminado por la orina, mediante una intensa reabsorción de urea en los ductos colectores, lo que resulta en una tasa de excreción urinaria de urea muy baja cuando reciben dietas

bajas en proteína. Por otro lado, semejante a lo que ocurre con los monogástricos, en el caso en que los rumiantes sean alimentados con crecientes cantidades de proteína en la dieta, mayor será la excreción de urea en la orina. Comparando períodos de carencia y de abundancia de nitrógeno en la dieta, la concentración de urea urinaria puede aumentar cerca de 25 veces comparada con un incremento de apenas 9,7 veces en el plasma, lo que indica la sensibilidad y el potencial diagnóstico del análisis de urea en la orina, el plasma o la leche. Empero, en rumiantes con carencia de proteína mantenidos en ayuno o con anorexia ocurre un mayor catabolismo de aminoácidos, aumentando la cantidad de urea sérica y urinaria, que dificulta la interpretación.

Etiología

La intoxicación con urea es muy común en rebaños de bovinos, en los cuales este compuesto es usado como fuente de nitrógeno no proteico (NNP) en suplementación alimentaria. Dicha intoxicación se presenta principalmente de forma aguda, siendo causada cuando los animales reciben grandes cantidades de urea o sales de amonio sin permitir una adaptación adecuada para aprovechar esas fuentes de nitrógeno o cuando son sobrepasados los límites para su utilización. El problema se ve favorecido cuando no se suministran suficientes fuentes de glúcidos de fácil digestión. Es frecuente que se presente como accidente por inadecuada mezcla de los alimentos o cuando se usan fertilizantes que queden de fácil acceso a los animales. Una vaca puede morir en poco tiempo al consumir de 100 a 200 g de urea cuando no está adaptada.

En los rumiantes el nitrógeno de la urea es liberado en el rumen en forma de amonio, pudiendo ser usado por la microflora ruminal para la síntesis de proteína, la cual puede estar disponible para el animal por los procesos normales de digestión y absorción. Sin embargo, si es consumida una cantidad de urea más allá de la que los organismos del rumen pueden metabolizar, el amonio es absorbido a partir del rumen entrando en la circulación sanguínea. Ese amonio es convertido en urea en el hígado (ciclo de la urea) para después ser excretado por el riñón, ruta que puede ser rápidamente sobrecargada y ocurrir exceso de amonio y de urea en la sangre, caracterizando una intoxicación. El amonio en exceso alcaliniza el plasma y causa bloqueo del ciclo de Krebs por agotar la cantidad de α -cetoglutarato (metabolito intermediario del ciclo)



al formar ácido glutámico, en el intento de eliminar el amonio de la circulación.

Signos clínicos de la intoxicación por urea

En la intoxicación por urea ocurre acumulación de NH_3 y de CO_2 en el rumen como productos de la hidrólisis de la urea por parte de las bacterias ruminales. El exceso de NH_3 alcaliniza el medio ruminal y ambos gases son absorbidos a través de la mucosa, causando una intoxicación sistémica. Los animales presentan señales clínicas que se manifiestan entre treinta y sesenta minutos después del consumo de la urea y se caracterizan por temblores musculares, salivación, respiración acelerada, atonía ruminal (timpanismo), apatía, ataxia y sudoración. En casos complicados también hay disnea marcada, postración y extensión de las extremidades, la frecuencia cardíaca está aumentada (100-160 lat/min), hay regurgitación y muerte entre 45-120 min después de la ingestión. Otros signos pueden incluir contracción de las orejas y de los músculos faciales, rechinar de dientes, dolor abdominal, micción frecuente, andar tambaleante, espasmos violentos y gemidos. Con frecuencia los animales son encontrados muertos próximos a la fuente de urea.

Diagnóstico de la intoxicación por urea

Los mejores indicadores diagnósticos son la historia de acceso a la urea y las señales clínicas de los animales afectados. Pruebas de laboratorio en muestras de sangre no son muy útiles, y pocas alteraciones *post mortem* son observadas. El manejo alimentario reciente es muy importante. Los bovinos pueden acostumbrarse a metabolizar la urea, pero si no hay un período de algunos días de adaptación o si consumen más de lo recomendado, la intoxicación puede ocurrir. En el laboratorio los niveles de amoniaco sanguíneo pueden ser medidos, aunque son útiles apenas en animales vivos. Las proteínas plasmáticas se degradan rápidamente en el animal muerto y producen amoniaco, de forma que medir este metabolito en el animal muerto carece de valor. El amoniaco (NH_3) se excreta en pequeñas cantidades en la orina, en la forma de amonio (NH_4^+), siendo secretado, en gran parte, en el túbulo contorsionado proximal y parcialmente reabsorbido en la asa de Henle. Valores normales de amonio urinario en bovinos varían de 50 a 800 μM . Los niveles de amoniaco en el fluido ruminal también pueden ser medidos, pero las muestras deben obtenerse recién ocurrida la muerte y ser congeladas hasta su medición.

Los animales se descomponen rápidamente después de la muerte por intoxicación con urea y no se encuentran señales específicas de envenenamiento. A la necropsia puede ser visto timpanismo, congestión generalizada de la carcasa, exceso de fluido en el saco pericárdico, edema pulmonar y exceso de espuma en las vías aéreas superiores, así como hemorragias en el corazón. Hay un fuerte olor a amoniaco cuando se abre el rumen. Medir el pH del contenido ruminal fresco puede ser útil en campo. Un pH alcalino (pH mayor que 7,5) sugiere intoxicación con urea.

En la intoxicación por amonio, proveniente de alta ingestión de urea dietética, se descubrió recientemente que cuando un bovino orina con más frecuencia, es más resistente a esta intoxicación, pues más iones amonio son eliminados en este fluido (Ortolani *et al.*, 2002). Estos autores detectaron en bovinos intoxicados, en el episodio convulsivo, una gran elevación de los niveles urinarios de amonio, variando de 3.000 a 25.000 μM . Como el amoniaco se puede volatilizar en la muestra, y la urea presente en esta se puede convertir en amoniaco, se recomienda que la orina sea congelada o se adicionen algunas gotas de un ácido fuerte (clorhídrico o sulfúrico) en la muestra hasta la determinación laboratorial. El amonio puede ser determinado en la orina por medio de kit diagnóstico o por electrodo ion específico.

Tratamiento de la intoxicación por urea

Una sonda ruminal puede ser pasada para aliviar el timpanismo y colocar volúmenes grandes de agua helada (45 L para un adulto), seguidos por varios litros de ácido acético 6% (vinagre). Esto diluye el contenido ruminal, reduce la temperatura del rumen y aumenta la acidez, lo que ayuda a disminuir la producción de amoniaco. El tratamiento debe ser repetido en veinticuatro horas. Rumenotomía y remoción del contenido ruminal con aplicación de líquido ruminal de una vaca sana puede ser útil en algunos animales. Pueden ser aplicados por vía endovenosa 300 mL de ácido acético 1%, 500 mL de glucosa 20% y sales de Ca y Mg. La prevención de la intoxicación por urea cuando se usa nitrógeno no proteico (NNP) en la alimentación debe incluir:

- Inicio gradual de la suplementación con urea aumentando poco a poco hasta alcanzar 0,1 g/kg peso vivo (35-40 g para una vaca de 400 kg).

- Asegurar que los animales consuman regularmente (todos los días) la suplementación, después de haberla iniciado.
- Si hay interrupción de la suplementación con urea por dos días, recomenzar con el menor nivel de consumo.
- Prevenir el exceso de consumo de mezclas o bloques de suplementación mediante el uso de sal para regular el consumo.
- Tomar las precauciones debidas cuando se usa urea como fertilizante.
- Proteger los suplementos de la lluvia para prevenir la disolución de la urea y mezclar perfectamente los alimentos.
- Tener siempre reservas de vinagre a disposición.

Suplementando con urea

Es práctico aprovechar la ventaja que tienen los rumiantes de utilizar la urea como fuente de nitrógeno para formar proteína en el rumen. Sin embargo, algunos cuidados deben ser tomados en cuenta para que no ocurra la intoxicación. La urea es muy soluble y se disuelve rápidamente en charcos, que pueden formar bloques después de llover; los animales pueden lamer esos bloques y consumir urea en exceso. La cantidad recomendada de urea varía de acuerdo al alimento ofrecido y el tiempo de adaptación a la urea. La tolerancia disminuye con ayuno y con dieta baja en proteína y alta en fibra. Cerca de 35 g de urea/día se considera suficiente para una vaca de 400 kg (aproximadamente 0,1 g/kg peso vivo). Se recomienda que la urea no suministre más de 3 % del concentrado, o más de 1 % del consumo total, y que no más de un tercio del total de consumo de nitrógeno sea de NNP. En ganado bovino 0,3-0,5 g/kg (120-200 g para una vaca de 400 kg) es considerado tóxico, y 1,0-1,5 g/kg (400-600 g para una vaca de 400 kg) puede ser fatal.

3.6 Proteínas séricas: cuantificación e interpretación de sus alteraciones

La determinación de proteínas totales, albúmina y globulinas en suero o en plasma sanguíneos se incluye de forma rutinaria dentro de un perfil básico para análisis de proteínas. Esos análisis son simples de hacer y ofrecen una información clínica muy valiosa que puede ayudar en el diagnóstico de varios trastornos. Las principales alteraciones posibles

de ser encontradas en las proteínas sanguíneas comprenden hiperproteinemias, hipoproteinemias por disminución de albúmina, e hipoproteinemias por disminución de globulinas. Adicionalmente, se estudia la electroforesis de proteínas a fin de obtener información complementaria sobre las alteraciones de las diferentes fracciones proteicas.

Proteínas totales

Para la determinación de las proteínas totales pueden ser utilizados dos tipos de análisis: físico (refractometría) o químico (colorimetría).

Refractometría

Está basada en el principio de que, a altas concentraciones de sólidos disueltos (mayor que 3 g/dL), el índice de refracción de una solución aumenta lineal y proporcionalmente a la concentración del soluto. Como la mayoría de los sólidos disueltos en el plasma son proteínas se asume que el índice de refracción del plasma estimará su concentración proteica. La refractometría es usada con frecuencia debido a su rapidez, economía (no requiere reactivos) y facilidad de realización, habiendo buena correlación entre este método y los métodos colorimétricos. Sin embargo, es necesario seguir algunas recomendaciones:

- Utilizar suero claro, con mínima turbidez posible, pues por ser un método que depende de la transmisión de la luz hay interferencia con hemólisis o lipemia.
- Calibrar con agua destilada frecuentemente.
- Hacer la lectura en un lugar iluminado.
- Considerar que, en concentraciones de proteína menores de 20 g/L o por encima de 100 g/L, aumenta la imprecisión del método.

Este método asume que otros solutos están en concentraciones normales. Si hay altas concentraciones de otros solutos (urea, glucosa, colesterol, sodio o sustancias como dextrano que pueden ser perfundidas en grandes cantidades cuando hay hipoproteinemia) aumentarán de forma ficticia los valores de proteínas obtenidos en el refractómetro. Así, fue comprobado que niveles de urea en el plasma por encima de 112 mg/dL pueden incrementar los valores de proteínas plasmáticas en 0,6 g/L.



Colorimetría

Las proteínas totales pueden ser determinadas por colorimetría utilizando los sistemas que usan reactivos sobre un soporte sólido en forma de placas o tiras reactivas (química seca) o mediante reactivos en forma líquida (química húmeda). El método de Biuret es el más utilizado actualmente para la determinación de proteínas totales en suero. La reacción se basa en la formación en medio alcalino de un compuesto coloreado (azul), debido a la unión de las proteínas a sales de cobre (reactivo de Biuret).

La albúmina puede ser determinada por colorimetría utilizando sistemas de química seca o húmeda. Normalmente, para determinar la albúmina por colorimetría se usa la técnica del verde de bromocresol. En pH ácido el verde de bromocresol se fija de forma selectiva sobre la albúmina y produce un color azul. El método es bastante confiable dentro de los intervalos normales para animales; sin embargo, su exactitud parece disminuir en casos de muestras hipoalbuminémicas. Adicionalmente, pueden ocurrir los siguientes problemas:

- Falsa disminución de albúmina con altos niveles de bilirrubina o presencia de fármacos, como aspirina y anticonvulsivantes, que compiten con la albúmina por el bromocresol.
- Variabilidad entre especies, con falsa disminución en perros y gatos y falsos aumentos en vacas y caballos, causados por la diferente afinidad de la albúmina al bromocresol, según la especie. Para evitar ese problema se recomienda usar calibradores propios de la especie.

Con relación a las globulinas, los métodos colorimétricos existentes para su determinación son poco precisos y exactos, de forma que sus valores son obtenidos en la práctica por sustracción del valor de las proteínas totales menos la albúmina.

Valores de referencia y variaciones fisiológicas

Aunque siempre es recomendado que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia de acuerdo a la metodología utilizada, pueden ser considerados los valores para las diferentes especies contemplados en la **Tabla 3.4**, los cuales están influenciados por las siguientes variaciones fisiológicas;. En general, los valores de proteína total en el plasma tienen en torno de 5% más que los del suero, por causa del fibrinógeno.

- Edad: los animales neonatos presentan niveles bajos de proteínas plasmáticas debido a que poseen pequeñas cantidades de inmunoglobulinas de albúmina. En la medida en que el animal ingiere calostro, aumentan los niveles de globulinas progresivamente hasta la madurez. Así, en animales de menos de 6 meses, los valores se sitúan en el menor intervalo de la referencia. De cualquier forma, con excepción de los primeros días de vida, las diferencias nunca son de tal magnitud que puedan ser confundidas con problemas clínicos.
- Gestación y lactación: durante la gestación, la concentración de proteínas plasmáticas disminuye debido a una baja en la cantidad de albúmina, a pesar del pequeño aumento de las globulinas. Empero, al término de la gestación ocurre un marcado aumento de las gamaglobulinas, que lleva a incremento del total de proteínas. En la lactación vuelve a ocurrir la disminución de proteínas causada por la mengua de albúmina, principalmente en la lactancia temprana.
- Hormonas: la testosterona, los estrógenos y la hormona del crecimiento pueden causar incremento en la concentración de proteínas por sus efectos anabólicos. El cortisol y la tiroxina causan lo contrario por sus efectos catabólicos.

Hiperproteinemias

Los aumentos de proteínas totales en la clínica veterinaria pueden ser producidos por incrementos de albúmina y/o de globulinas. Esos aumentos son causados por dos motivos principales: deshidratación e inflamación.

Deshidratación

Viene acompañada de aumento de albúmina y globulinas. Los niveles de proteínas están aumentados por hemoconcentración al disminuir el volumen plasmático. Esa deshidratación debe ser confirmada mediante examen físico del animal y producir otras alteraciones analíticas, como aumento del hematocrito. En esos casos los niveles de albúmina están elevados de forma relativa, pues el aumento verdadero de albúmina no ha sido descrito. Ese aumento relativo también se produce en las globulinas.

Tabla 3.4 Valores de referencia de proteínas totales, albúmina y globulinas (g/L) en el suero de algunas especies animales

Fracción proteica	Especie			
	Caninos	Felinos	Equinos	Bovinos
Proteína total	54-75	60-79	56-76	67-75
Albúmina	23-31	28-39	26-41	25-38
Globulinas	27-44	26-51	26-40	30-35

Inflamación

Viene acompañada de baja de albúmina y aumento de globulinas. En esos casos, mayores detalles sobre el tipo y la causa de la inflamación son obtenidos por medio de proteinograma, que permite estudiar las diferentes fracciones de globulinas de forma individual. En general, aumento de globulinas por problemas inflamatorios acompañan baja concomitante en la concentración de albúmina y se encuadra en la respuesta de fase aguda.

Hipoproteinemia por disminución de albúmina

Incluye procesos donde están disminuidas las proteínas totales que cursan con baja albúmina, siendo esta la fracción que más se afecta. Las globulinas tienen una respuesta variable, pues pueden estar también disminuidas (casos de hemorragia, mala absorción, insuficiencia cardíaca), normales o aumentadas (caso de una inflamación concomitante). Las causas de disminución de albúmina pueden ser agrupadas en tres procesos: síntesis o absorción, pérdidas y dilución.

Problemas de síntesis o absorción de albúmina

- **Insuficiencia hepática:** la disminución de albúmina en esos casos puede ser de moderada a severa, dependiendo del grado de alteración de la función hepática. No ocurre hipoalbuminemia hasta que la masa funcional hepática disminuya en 70%-80%, implicando cronicidad del proceso causador. Las pruebas de funcionalidad hepática estarán alteradas en esos casos.
- **Falla de absorción intestinal:** incluye problemas de (a) mala digestión por insuficiencia pancreática, en que la baja de albúmina es moderada y apenas en casos sin tratamiento por tiempo prolongado;

los animales afectados presentan pérdida de peso severa, diarrea de intestino delgado y esteatorrea; y (b) mala absorción (enteropatía con pérdida de proteínas). En general, hay sospecha de esas alteraciones cuando ocurren bajas moderadas a severas de albúmina, con o sin diarrea, y se descartan otras causas de baja de albúmina. En el diagnóstico de enteropatía con pérdida de proteínas se recomienda realizar examen endoscópico y análisis de biopsia intestinal.

- **Mala nutrición proteica:** puede ocurrir baja en la albúmina en situaciones bastante prolongadas y graves, pues existe un mecanismo de compensación que consiste en el paso de albúmina del espacio extravascular (tejidos) al intravascular. Así, generalmente se observa una considerable pérdida de proteínas tisulares con cambios menores de las proteínas plasmáticas.

Pérdidas excesivas de albúmina

- **Síndrome nefrótico:** producido por alteraciones de los glomérulos renales (amiloidosis renal o glomerulonefritis). En ese caso la principal proteína perdida es la albúmina porque su molécula es de menor tamaño, aunque en casos de daño glomerular grave también se pierden globulinas. La hipoalbuminemia puede ser severa, acompañada de proteinuria.
- **Hemorragias y lesiones exudativas por quemaduras o traumatismos:** en estos casos disminuyen la albúmina y las globulinas por igual, y la hipoproteinemia ocurre por dos mecanismos: (1) pérdida de proteínas por las hemorragias o lesiones, y (2) paso de fluido extravascular al sistema vascular para restaurar el volumen plasmático, lo que genera una reducción en la concentración



de proteínas plasmáticas. Este último mecanismo es bastante rápido, siendo evidenciado dos a tres horas después de ocurrir el problema. La baja en la concentración proteica es compensada con albúmina de la linfa y aumento de la síntesis de albúmina en el hígado. La máxima disminución ocurre a veinticuatro horas de la hemorragia y los niveles pueden demorar una semana para volver a lo normal. Dentro de los procesos hemorrágicos se pueden incluir el parasitismo intestinal y úlceras de estómago o de intestino.

Dilución de proteínas séricas

Ocurre en la insuficiencia cardiaca congestiva o en hipertensión portal. En esas patologías hay retención de agua, que produce aumento de la presión hidrostática y disminución relativa de las proteínas totales con hipoalbuminemia moderada. Además de la dilución por el agua retenida, en esos procesos hay otros mecanismos que contribuyen a la baja de proteínas, tales como pérdidas en el fluido ascítico, disminución de la ingesta de alimento, síntesis reducida de proteínas hepáticas y síndrome de mala absorción. En la **Figura 3.16** aparece una guía para ayudar a identificar la causa en los casos de hipoproteinemia con hipoalbuminemia.

Hipoproteinemia por disminución de globulinas

Esta disminución es producida fundamentalmente por problemas de inmunodeficiencia debido a la ingestión inadecuada de calostro y disminución de gamaglobulinas en neonatos. Esos animales son susceptibles a infecciones y problemas parasitarios.

Electroforesis de proteínas

La electroforesis es realizada para obtener información adicional sobre las diferentes fracciones proteicas. Es una técnica que permite la separación de los diversos tipos de proteínas en un soporte (acetato de celulosa o gel de agarosa) bajo la influencia de un campo eléctrico. Así, a pH alcalino, la mayoría de las proteínas están cargadas negativamente, y al aplicar un campo eléctrico migran al polo positivo con diferente velocidad dependiendo de sus propiedades físicas, obteniendo su separación en fracciones. Para revelar las proteínas separadas en la electroforesis el soporte es tratado con colorantes específicos (negro de amido,

azul de coomassie o de bromofenol), apareciendo las fracciones proteicas como bandas con intensidad de color variable que pueden ser cuantificadas por un densitómetro. Los resultados se muestran en un proteinograma o imagen de las fracciones proteicas (**Figura 3.17**). La anchura y altura de cada fracción indica la cantidad relativa de cada fracción proteica. Combinando esa información con la concentración de proteínas totales (determinada por refractometría o colorimetría) es posible calcular los valores absolutos de cada fracción proteica.



Figura 3.16. Fluxograma para identificación de las causas de disminución de proteínas totales y albúmina (en ausencia de problemas en la dieta o mala nutrición)

TLI, Tripsina inmunoreactiva. S, sí; N, no.

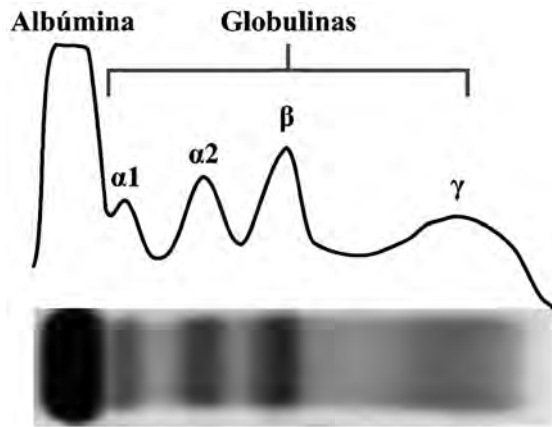


Figura 3.17. Proteinograma electroforético con las diferentes fracciones

El gráfico corresponde al trazado densitométrico del gel que se muestra abajo.

En general, son diferenciadas, como mínimo, cinco fracciones proteicas en la electroforesis:

- **Albúmina:** teniendo mayor electronegatividad, la albúmina migra a mayor velocidad y aparece más próxima del polo positivo. Esta fracción está representada por un pico agudo, integrado por apenas una proteína.
- **Alfa-globulinas:** de forma global, las fracciones α (1 y 2) están integradas por dos componentes, las proteínas de fase aguda y las lipoproteínas. Las proteínas de fase aguda muestran variación en su concentración cuando ocurre cualquier proceso inflamatorio y, por tanto, constituyen importantes marcadores tempranos de la inflamación. Se diferencian en dos tipos: (1) proteínas de fase aguda negativas, que disminuyen su concentración ante la inflamación (albúmina y transferrina); (2) proteínas de fase aguda positivas, que aumentan su concentración con la inflamación (haptoglobina, proteína C reactiva, amiloide sérica A, α -glicoproteína y ceruloplasmina). La magnitud de la respuesta de cada proteína varía de acuerdo a la especie; así, en ruminantes la haptoglobina es la proteína que más aumenta, mientras que en el perro es la proteína C reactiva.
- **Beta-globulinas:** en esta fracción, aunque hay otras proteínas, como la transferrina, se destacan

proteínas con función inmunológica, como las inmunoglobulinas IgM e IgA. También en esta fracción aparece la proteína C reactiva, una de las proteínas de fase aguda que más aumenta en el perro por la inflamación. En las β -globulinas se incluyen también compuestos que pueden producir interferencias o artefactos, como fibrinógeno y hemoglobina (importantes en muestras con hemólisis).

- **Gama-globulinas:** esta fracción está integrada apenas por las inmunoglobulinas, siendo dividida por algunos autores en dos fracciones: (1) gama 1, integrada por IgM e IgE; (2) gama 2, integrada por la IgG. Las inmunoglobulinas están distribuidas entre las fracciones β y γ . De esa forma, las IgA y parte de las IgM están en la fracción β , mientras que en la fracción γ están el resto de las IgM y parte de las IgG, las cuales, cuantitativamente y en condiciones normales, representan 85 % de las inmunoglobulinas.

Valores de referencia del proteinograma

El suero contiene un gran número de proteínas diferentes, y la electroforesis permite separar esas proteínas en grandes fracciones que, a su vez, están integradas por un gran número de proteínas distintas. En función de las condiciones de la electroforesis (soporte, voltaje y pH del *buffer*) y del poder resolutivo de la técnica utilizada en el laboratorio, podrá visualizarse un número mayor o menor de picos con diferente calidad. Así, el número y el nombre de los picos varían en los diferentes laboratorios, incluso en la misma especie animal. También contribuye para esa variabilidad la falta de una normativa clara que permita separar las diferentes fracciones, ya que la única claramente definida es la situación de la albúmina (más próxima del polo positivo) y el punto de separación entre las fracciones α y β (punto medio del proteinograma); el resto de fracciones son separadas con base en el apareamiento de valles o zonas en forma de U en el trazado electroforético. Esta situación hace que se recomiende para cada laboratorio que tenga sus propios valores y trazados electroforéticos normales establecidos y validados para cada especie animal, y que el clínico considere esta variabilidad a la hora de enviar muestras para diferentes laboratorios.

Interpretación clínica del proteinograma

Para realizar la interpretación del proteinograma conviene seguir los siguientes pasos:

1. Considerar siempre la anamnesis, el cuadro clínico del animal y otros parámetros analíticos del perfil básico. Dentro del cuadro clínico es importante indicar el grado de hidratación del animal.
2. Considerar la calidad de la muestra, ya que la hemólisis y la lipemia pueden influir en la interpretación del proteinograma.
3. Interpretar las proteínas totales y los niveles de albúmina y globulinas.
4. Interpretar el proteinograma de acuerdo a los siguientes puntos:
 - Características de la albúmina: el pico de albúmina permite apreciar la calidad del proteinograma, porque siempre migra al mismo lugar y debe tener una base estrecha. Pueden encontrarse los aumentos o bajas de albúmina ya explicados.
 - Características de la fracción alfa: (1) Aumentos de α -1 y de α -2 globulinas, que ocurren en varios procesos patológicos, como problemas inflamatorios agudos, en que aumentan las proteínas de fase aguda integradas en esta fracción, sobre todo la haptoglobina, entre los cuales se presentan problemas infecciosos y parasitarios, traumatismos y tumores. También ocurren en el síndrome nefrótico, en que aumentan las lipoproteínas de esta fracción. Empero, este disturbio generalmente es diagnosticado previamente por la presencia de proteinuria, sin señales de inflamación en el tracto urinario, de forma que el proteinograma en ese caso sería complementario. También puede haber altas concentraciones de α -2 globulinas en perros tratados con corticoides. La causa puede ser la movilización de lipoproteínas, aunque pueda ser más importante el aumento de haptoglobina inducido por los corticoides. (2) Baja de α -2 globulinas, hecho que puede ser debido a hemólisis intravascular, o por formación de complejos hemoglobina-haptoglobina, que son fagocitados por los macrófagos del sistema retículo-endotelial, especialmente en el hígado, causando disminución de haptoglobina. Eso

puede ser confirmado por otros hallazgos, como baja en el valor del hematocrito y diversas señales analíticas y clínicas de anemia hemolítica. La baja de esta fracción puede estar enmascarada por un proceso inflamatorio asociado a hemólisis.

- Características de las fracciones beta y gama: (1) Elevación de las β -globulinas. Con excepción de aumentos debido a la transferrina en casos de déficit de hierro (anemia ferropénica), es raro encontrar aumento aislado de la fracción β . Así, casi siempre la elevación de β -globulinas está relacionada con aumentos de la fracción gama. En ocasiones aparece un pico único de las dos fracciones denominado 'bloqueo beta-gama', producido por aumento de varias inmunoglobulinas. (2) Elevación de las γ -globulinas. Ocurre en gran cantidad de procesos denominados gamapatías, que pueden ser divididas en policlonales y monoclonales, diferenciadas mediante el proteinograma. Para eso, se compara la fracción gama con la base de la fracción albúmina; si resulta similar a la albúmina (estrecha), estará integrada por una sola proteína (monoclonal); si el pico tiene la base ancha comparada con la albúmina, contendrá diferentes proteínas (policlonal). La gamapatía policlonal está relacionada con procesos inflamatorios de tipo crónico, como infecciones-infestaciones crónicas o enfermedades inmunomediadas. La gamapatía monoclonal es producida por proliferaciones clonales de células neoplásicas de la serie de linfocitos B, como en casos de tumores de células plasmáticas (mieloma múltiple o plasmocitoma), y en leucemia linfocítica crónica de células B funcionales o linfoma de células B funcionales.

Proteínas de fase aguda

El estudio de las proteínas de fase aguda (PFA) comenzó con el descubrimiento de la proteína C reactiva (CRP) en 1930. Las PFA participan en la reacción de fase aguda del organismo, que fue definida por primera vez en 1941 por Abernethy y Avery como la respuesta del organismo a lesión, infección o trauma de un tejido o a trastornos inmunológicos o metabólicos. La reacción de fase aguda comprende una serie de eventos destinados a prevenir el daño a los tejidos, eliminar los organismos

infecciosos y mejorar el proceso de recuperación de la homeostasis (equilibrio) en el organismo. Ella inicia con los macrófagos del tejido afectado o con los monocitos y linfocitos sanguíneos que liberan una serie de mediadores químicos, entre los cuales están las citoquinas, que actúan sobre fibroblastos y células endoteliales vecinas a la lesión causando una segunda onda de citoquinas, que disparan la reacción de fase aguda actuando local y sistémicamente. Localmente, las citoquinas median el reclutamiento de neutrófilos y células mononucleares al lugar de inflamación. Sistémicamente, actúan sobre el sistema inmune, la médula ósea, el cerebro y el hígado (**Figura 3.18**). La reacción es complementada con la respuesta febril, aumento de ACTH, leucocitosis y alteración de la expresión hepática de las PFA.

La función de las PFA se refleja en sus actividades atribuidas, tales como retirar restos celulares, hemoglobina y radicales libres, unir componentes bacterianos, activar el complemento, hacer redistribución del colesterol y promover la producción de inmunoglobulinas. Las PFA hepáticas han sido clasificadas en positivas y negativas dependiendo de su aumento o disminución, respectivamente, ante un estímulo inflamatorio. Entre las PFA negativas están la albúmina y la transferrina. Entre las PFA positivas están la haptoglobina (Hp), la proteína C reactiva (CRP), la amiloide sérica A (SAA), la ceruloplasmina (Cp), el fibrinógeno y la glicoproteína α 1-ácida (AGP o ASG).

Una aplicación práctica del análisis de las PFA es como auxiliar en el diagnóstico de enfermedades inflamatorias e infecciosas con bastante sensibilidad, al punto que han sido llamadas ‘termómetros químicos’. También han sido detectados aumentos en casos de trauma quirúrgico, estrés de transporte y en trastornos metabólicos como acidosis y lipidosis hepática. En casos de mastitis en vacas los valores pueden aumentar tanto en sangre como en leche. Las PFA tienen patrones de secreción y de comportamiento diferentes dependiendo de la especie animal (**Tabla 3.5**). Se consideran PFA principales las que, después de un estímulo, aumentan más de cien veces su valor basal y PFA moderadas aquellas que tienen aumentos de dos a tres veces.

Haptoglobina

La haptoglobina (Hp) es una glicoproteína tetramérica que tiene la propiedad de unirse a la hemoglobina. Esta propiedad le permite retirar la hemoglobina de circulación y llevarla al hígado para ser catabolizada a

fin de prevenir lesiones renales y evitar su pérdida por la orina cuando ocurre hemólisis. La Hp es considerada una de las principales PFA, principalmente en ruminantes, ya que en los animales sanos su concentración sérica es muy baja o incluso indetectable, mientras que en varios estados patológicos ocurren aumentos considerables, llegando a ser hasta de cien veces su valor basal. El aumento de la Hp es rápido y permite detectar animales infectados antes de la presentación de señales clínicas, siendo su concentración usada como indicador de severidad de la infección. El hallazgo reciente de que la Hp es secretada por la leche y que aumenta su concentración en casos de mastitis le da gran potencial en el diagnóstico precoz de este problema en ruminantes, aún más con evidencias de que los aumentos serían detectados antes de aumentar el conteo de células somáticas, hasta ahora considerado el indicador más sensible en estos casos (*gold standard*). En porcinos la Hp ayuda en el monitoreo del estado sanitario y del nivel productivo, observándose aumentos en varios tipos de infecciones bacterianas y en situaciones de estrés por transporte o presacrificio. En perros los niveles de Hp muestran correlaciones positivas y aumento en condiciones inflamatorias y por aplicación de corticoides.

Amiloide sérica A

La proteína amiloide sérica A (SAA) es una apolipoproteína asociada a proteínas HDL durante la respuesta de fase aguda. Su nombre se debe a la semejanza con la amiloide A, una proteína fibrosa presente en la amiloidosis sistémica. Junto con la Hp han sido estudiadas como las principales PFA en los ruminantes. La Hp y la SAA sufren aumentos en animales transportados en camión 24 a 48 horas después del inicio, lo que está relacionado con otros indicadores de estrés (neutrofilia y linfopenia). La relación entre estrés y PFA está ligada a la modulación que los glicocorticoides ejercen sobre la producción hepática de estas proteínas. El potencial de las PFA con relación a estudios de bienestar animal y estrés deberá ser más explorado en el futuro. En ruminantes también ha sido encontrado aumento de SAA en casos de mastitis. En porcinos ocurren aumentos de SAA más rápidos que la Hp en casos de infecciones por *Actinobacillus*. En caballos la SAA es la PFA de elección, con grandes aumentos en casos de infecciones bacterianas o virales. Parece ser que en bovinos la SAA indicaría lesiones inflamatorias agudas, mientras que la Hp señalaría patologías más crónicas.





Figura 3.18. Eventos en la reacción de fase aguda del organismo

Tabla 3.5 Principales proteínas de fase aguda (PFA) en varias especies animales

Especie	PFA principales (aumentos > 100 veces)	PFA moderadas (aumentos de 2-3 veces)
Ruminantes	Haptoglobina, amiloide sérica A	Glicoproteína α -1 ácida, α -1 antitripsina, proteína C reactiva
Caninos	Proteína C reactiva, amiloide sérica A	Haptoglobina
Porcinos	Proteína C reactiva, amiloide sérica A	Pig MAP (<i>major acute phase protein</i>), haptoglobina
Caballos	Amiloide sérica A	Proteína C reactiva, fibrinógeno
Humanos	Proteína C reactiva, amiloide sérica A	Glicoproteína α -1 ácida, haptoglobina

Proteína C reactiva

La proteína C reactiva (CRP) fue la primera PFA descrita (en 1930), y fue bautizada así por ser descubierta en el suero de humanos con infección neumocócica, donde había reacción con el polisacárido C del neumococo. Posee más importancia en perros, felinos y porcinos, y menos en caballos y ruminantes. En perros con tumores la concentración de CRP sérica encontrada ha sido mayor en los animales con la enfermedad diseminada que en los que tienen neoplasia localizada o benigna.

Ceruloplasmina

La ceruloplasmina (Cp) ha sido estudiada como una glicoproteína de origen hepático transportadora de

cobre. Sus aumentos con el estímulo inflamatorio son pequeños y se considera por tanto una PFA moderada. Han sido reportados aumentos en porcinos infestados con tenia y en bovinos con metritis y durante la involución uterina.

Glicoproteína α 1-ácida

La glicoproteína α 1-ácida (ASG) hace parte de las proteínas consideradas como seromucoides, caracterizadas por poseer cadenas de oligosacáridos, principalmente ácido siálico, en su estructura. Estas proteínas resisten a la precipitación con ácidos, siendo la fracción que queda soluble después de la adición de ácido perclórico. La ASG es considerada una PFA moderada.

Fibrinógeno

El fibrinógeno, glicoproteína de origen hepático, participa en la reacción de coagulación sanguínea (factor I), siendo el precursor de la fibrina que es convertida por acción de la trombina, en la etapa final del proceso. Por muchos años fue considerada la única proteína de fase aguda conocida, teniendo aumentos significativos en procesos inflamatorios agudos y crónicos, con mayor utilidad en rumiantes y caballos. Su determinación es por el método refractométrico y calentamiento a 56 °C, lo que la hace la PFA más fácil de determinar. El método consiste en la obtención de dos muestras de sangre en capilares de microhematócrito centrifugadas y la determinación de la proteína en el plasma por el método refractométrico en una de ellas (P_1), seguido de calentamiento a 56 °C por tres minutos de la segunda muestra, centrifugación y nueva determinación de la proteína en el plasma (P_2). El valor de fibrinógeno corresponde a la diferencia de $P_1 - P_2$.

Albumina

La albúmina es la principal proteína plasmática, siendo considerada una PFA negativa, o sea que

disminuye su síntesis y concentración en procesos inflamatorios. El aumento de fibrinógeno y otras PFA, y la disminución de albúmina, se deben en parte a un cambio brusco de la producción de proteínas hepáticas con supresión de la síntesis de albúmina y aumento de la síntesis de PFA. Una vez que la concentración de proteína total permanece constante, se cree que otras proteínas como las globulinas y las PFA deben ocupar el espacio resultante de la disminución de albúmina circulante.

Transferrina

La transferrina es una glicoproteína plasmática transportadora de hierro. A pesar de que apenas 0,1 % del hierro total del organismo está ligado a la transferrina, ella constituye el más importante *pool* de este mineral por su altísima tasa de intercambio entre tejidos. La transferrina liga con gran afinidad Fe^{3+} pero no liga Fe^{2+} . Es considerada, junto con la albúmina, una PFA negativa. Un bajo nivel de transferrina, en casos de infecciones, puede llevar a anemia, ya que es necesaria para el transporte de Fe destinado a la síntesis de hemoglobina; por el contrario, una anemia ferropriiva aumenta el nivel de transferrina.



3.7 Bibliografía

- Abernethy, T. J., y Avery O. T. (1941). The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood. *J. Exp. Med.*, 73, 73-182.
- Cole, D. J., Roussel, A. J., y Whitney, M. S. (1997). Interpreting a bovine CBC: Evaluating the leukon and acute-phase proteins. *Vet. Med.*, 92, 470-478.
- Colla, M. F., Valle, S. F., Secchi, P., Duda, N., Scaloni, M., Dürr, J. W., y González, F. H. D. (2011). Plasma haptoglobin values in cows with different somatic cell counting in milk samples. *Acta Scientiae Veterinariae*, 39, 944-949.
- Doolittle, R. F. (1985). Proteins. *Sci. Am.*, 253, 88-99.
- Eckersall, P. D., y Conner J. G. (1988). Bovine and canine acute phase proteins. *Vet. Res. Commun.*, 12, 169-178.
- Eckersall, P. D., Young, F. J., McComb, C., Hogarth, C. J., Safi, S., Weber, A., Fitzpatrick, J. L. (2001). Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *Vet Rec.*, 148, 35-41.
- Eckersall, P. D. (2000). Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue Medicine Veterinaire*, 151, 577-584.
- González, F. H. D., Hernández, F., Madrid, J., Martínez-Subiela, S., Cerón, J. J., y Tecles, F. (2011). Acute phase proteins in experimentally induced pregnancy toxemia in goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23, 57-62.
- González, F. H. D., Martínez-Subiela, S., y Ceron, J. J. (2007). Haptoglobina en rumiantes: generalidades y posibles aplicaciones clínicas. *Anales de Veterinaria (Murcia)*, 23, 5-17.
- González, F. H. D., Tecles, F., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Vasco, L. S., y Cerón, J. J. (2008). Acute phase protein responses in goats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20, 580-584.
- González, F. H. D., Ruipérez, F., Sánchez, J. M., Souza, J. C., Martínez-Subiela, S., y Cerón, J. J. (2010). Haptoglobin and serum amyloid A in subacute ruminal acidosis in goats. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 57, 159-167.
- Gruys, E., Obwolo, M. J., y Tuossaint M.J. (1994). Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet. Bull.*, 64, 1009-1018.
- Holmes, F. L. (1980). Hans Krebs and the discovery of the ornithine cycle. *Fed. Proc.*, 39, 216-225.
- Jentoft, N., Lerner, R. A., Benkovic, S. J., y Schulz, P. G. (1991). At the crossroads of chemistry and immunology: catalytic antibodies. *Science*, 252, 659-667.
- Kaneko, J. J. (1997). Porphyrins and the porphyrias. En J. J. Kaneko, J. W. Harvey y M. L. Bruss (Eds.) *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th ed. (pp. 205-221). San Diego, USA: Academic Press.
- Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Parra, M. D., y Cerón, J. J. (2001). Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. *Anales de Veterinaria (Murcia)*, 17, 99-116.
- Murata, H., Shimada, N., y Yoshioka, M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.*, 168, 24-40.
- Ortolani, E. L., Kitamura, S. S., Maruta, C. A., Antonelli, A., y Soares, P. C. (2002). Diuresis alleviates ammonia poisoning in cattle through ammonium excretion in the urine. En *Anais do XXII Congresso Mundial de Buiatria*.
- Tezcan, I., Xu, W., y Gurgey, A. (1998). Congenital erythropoietic porphyria successfully treated by allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 92(11), 4053-4058.
- Wittwer, F., Reyes, J. M., Opitz, H., Contreras, P. A., y Bohmwald, H. (1993). Determinación de urea en muestras de leche de rebaños bovinos para el diagnóstico de desbalance nutricional. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 25, 165-172.