

## TRABAJOS ORIGINALES

### VARIACIÓN DIURNA DE LOS ÁCIDOS BILIARES TOTALES SANGUÍNEOS EN EL EQUINO: EFECTO DEL AYUNO

W. Rudolph, M.V., M.S., PhD.; J. Planella, M.V.; A. Bernal, M.V.  
J. Correa<sup>1</sup>, M.V. y J. Salazar, M.V.\*

#### DIURNAL VARIATION OF TOTAL BILE ACIDS IN HORSE BLOOD. EFFECT OF FASTING

*Thirteen hybrid horses were used. Normal health condition was determined by physical exam and blood examination (Leucocyte/ul, VGA %, PP. g/dl, AST, CK, and GGT serum enzymes). Total bile acids were determined in the serum by a colorimetric method (Merckotest 14352). At the second day horses were deprived of food and only water was allowed to have. Serum blood bile acid concentration was statistically different among analyzed horses ( $p < 0.05$ ). During pre fasting day blood bile acid concentration increase ( $p < 0.05$ ) but not during fasting day where concentration was the same at different hours ( $p > 0.05$ ). During the post fasting day blood bile acid concentration increased, showing that feeding affect blood bile acid concentration.*

**Palabras claves:** Ácidos biliares, equino, hígado, ayuno.

**Key words:** Bile Acid, Horse, Liver, Fasting.

## INTRODUCCIÓN

Los ácidos biliares (ABs) primarios son componentes normales de la bilis, sintetizándose en el hígado a partir del colesterol y excretados en el intestino delgado, donde por acción bacteriana son transformados en sus formas secundarias (Balistreri y Shaw, 1987). A su paso por el intestino son reabsorbidos en un 95 a 98% en algunas especies (Tennant y Hornbuckle, 1980), siendo transportados por la circulación portal de regreso al hígado. Esto constituye la circulación enterohepática por medio de la cual el organismo conserva en gran medida estos ácidos biliares (Parraga y Kaneko, 1985). El proceso de extracción hepática de los ABs desde la circulación portal es extremadamente eficiente, dado que el 95% son extraídos en una primera pasada (McGilvery, 1983; Balistreri y Shaw, 1987), por lo que la concentración de ABs en sangre sistémica es baja.

En el equino la concentración plasmática de ABs es normalmente más baja que en otras especies (Hoffmann y col., 1987; Mendel y col., 1988), debido a que

aproximadamente el 90% del total de estos ácidos se encuentran confinados a la circulación enterohepática (Gronwall, 1977). La ausencia de vesícula biliar en esta especie y los numerosos ciclos enterohepáticos de los ABs descritos en ponies (Anwer y col., 1975), indicarían que no son almacenados sino que estarían continuamente ciclando, por lo que su concentración sérica no sería afectada por la alimentación (Hoffmann y col., 1987). West (1989) a su vez, no observa variaciones con la edad y el sexo.

De acuerdo a diversos autores, la determinación de los ABs en sangre sería un indicador sensible de enfermedades hepatobiliar como necrosis, lipidosis, neoplasia, colestasis, cirrosis (Hoffmann y col., 1987; Mendel y col., 1988; West, 1989; Kaneko y col., 1992), por lo que su utilización junto a otras pruebas permitiría un diagnóstico diferencial acabado (Rudolph, 1990).

No existiendo un común acuerdo sobre cuáles serían las condiciones más indicadas para realizar el muestreo sanguíneo para la determinación de los ABs en el paciente, ya que aparentemente la inhabilidad del hígado en la depuración de los ABs desde la circulación portal sería menos aparente durante el ayuno, autores como Cornelius (1987) recomiendan

\*Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Santo Tomás, Stgo. Chile.

<sup>1</sup>Clínica Veterinaria Club Hípico de Stgo., Chile.

la medición después de la ingesta de alimento. En el presente trabajo, se determinan los ácidos biliares totales en sangre antes, durante y después de un ayuno mayor a 24 h en equinos mestizos a objeto de conocer el comportamiento de estos compuestos bajo estas condiciones.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se trabajó con 13 caballos mestizos de raza liviana (peso aproximado 400 kg), de ambos sexos (10 machos castrados y 3 hembras), entre 3 y 22 años (mediana 7 años), sometidos a igual manejo y que se encontraban clínica y hematológicamente sanos. Todos ellos se encontraban estabulados en la Escuela de Equitación de Carabineros de Chile.

Previo a la experiencia, con el fin de controlar el estado de salud, se les extrajo sangre con y sin anticoagulante (EDTA), determinándose el número de leucocitos por ul (cámara de Neubauer), el volumen globular aglomerado (VGA %; microhematocrito), la proteína plasmática (PP g/dl; refractometría) y las enzimas aspartato amino transferasa (AST, EC 2.6.1.1.), creatin quinasa (CK; EC 2.7.3.2.) y  $\gamma$ glutamyl transferasa (GGT; EC 2.3.2.2.). Todas las enzimas fueron determinadas a 30°C en un equipo semi-automático (Microlab Merck), con reactivos comerciales (Boehringer) y expresadas en ul.

La concentración sérica de ABs totales (Umol/l) fue determinada con reactivos comerciales (Merckotest 14352) que se basa en la transformación de los ácidos 3  $\alpha$  hidroxibiliar en sus respectivos derivados 3 cetónicos mediante la acción de la dehidrogenasa 3  $\alpha$  hidroxiesteroide en presencia de NAD, el cual se reduce a NADH que reacciona con el azul de nitrotetrazolio bajo la acción catalítica de una diaforasa. En la aplicación de la técnica se siguió la norma del fabricante, modificando sólo la cantidad de suero agregado que se aumentó en un 50%. El color desarrollado se leyó a 530 nm (Metertek 830), utilizando como estándar un patrón de ABs (Merck 14353).

Los caballos utilizados eran alimentados en forma rutinaria aproximadamente a las 9 y 17 h con 6 a 7 kg de concentrado (16% proteína), 7 kg de heno y agua ad-libitum, lo que se mantuvo el primer y tercer día de experiencia. En el segundo día no se dio el alimento y sólo se mantuvo el agua ad-libitum. Si bien los resultados se entregan por día, el ayuno representaría más de 24 h si consideramos desde la última comida (día 1) y la primera del día 3.

Las muestras de sangre fueron obtenidas a las 8, 12, 16 y 20 h de cada día, determinándose en ellas el VGA, la PP y los ABs.

Los resultados se expresan en promedios y desviación estándar (DE), mediana, máximo y mínimo. La comparación de las concentraciones de ABs entre y en cada día se realizó con sus logaritmos decimales utilizando un análisis de varianza para 2 criterios.

## RESULTADOS

Los valores del VGA se mantuvieron dentro del rango normal durante la experiencia, mostrando un aumento progresivo que fue significativo ( $P < 0,05$ ) a las 20 h del día control (preayuno con alimentación normal). Durante el post ayuno mostró un aumento igualmente significativo desde las 12 h en adelante (Cuadro 1). La proteína plasmática (Cuadro 2) sólo mostró un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) a las 12 h del día post ayuno, manteniéndose dentro de los rangos normales. Durante el ayuno ambos componentes sanguíneos no mostraron variaciones.

Los ácidos biliares totales (umol/L) mostraron el día preayuno (alimentación normal) un aumento progresivo, siendo este aumento significativo ( $P < 0,05$ ) a las 16 y 20 h (Cuadro 3). En este día el promedio y la mediana fueron iguales. Durante el ayuno, la concentración de ABs no presentó variación, separándose el promedio de la mediana a medida que avanzaba el día. En el día post ayuno, la concentración fue mayor que los días precedentes, descendiendo a las 20 h ( $P < 0,05$ ) (Cuadro

### CUADRO 1

VOLUMEN GLOBULAR AGLOMERADO (%) ANTES DURANTE Y DESPUÉS DE UN AYUNO EN TRECE EQUINOS

	Preayuno				Ayuno				Post ayuno			
	8 h	12 h	16 h	20 h	8 h	12 h	16 h	20 h	8 h	12 h	16 h	20 h
X	32,9a	3,33a	35,8a	36,2b	32,2a	31,2a	31,8a	31,8a	31,4a	36,8b	35,7b	36,3b
DE	8,7	10,9	15,3	13,5	12,6	8,6	8,3	8,3	10,4	15,3	14,2	11,6

X = promedio

DE = Desviación estándar

Letras distintas en filas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Valores corresponden al promedio de 13 equinos.

**CUADRO 2**

CONCENTRACIÓN PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL (g/dl) EN EQUINOS, ANTES, DURANTE Y DESPUÉS DE UN AYUNO

	Control				Ayuno				Postayuno			
	8 h	12 h	16 h	20 h	8 h	12 h	16 h	20 h	8 h	12 h	16 h	20 h
X	6,9a	7,1a	7,2a	7,2a	6,8a	6,9a	7,1a	7,2a	7,1a	7,9b	7,3a	7,3a
DE	1,6	1,4	1,3	1,7	1,4	1,4	1,6	1,4	1,4	1,9	1,7	1,8

X = Promedio

DE = Desviación estándar.

Letras distintas en filas indican diferencias significativas (p<0,05).

Valores corresponden al promedio de 13 equinos.

3). En este día el promedio fue superior a la mediana que mostró niveles inferiores de ABs.

**DISCUSIÓN**

La baja concentración de ácidos biliares totales observada a las 8 h del día control (preayuno; valor mínimo 0,5 a valor máximo 9,32  $\mu\text{mol/L}$ ) es coincidente con lo descrito por otros autores (Anwer y col., 1976; West 1989). Sin embargo, estos valores aumentaron progresivamente a medida que el día avanzaba, lo que difiere de lo informado por West (1989), quien utilizando el método enzimático no observó variaciones diurnas. Esta diferencia podría ser el resultado del manejo alimentario diferente que tuvieron esos caballos, ya que se mantuvieron con una alimentación ad-libitum como informa el autor.

Considerando que durante el día de ayuno este aumento de la concentración de ABs a las 16 y 20 h

fue menor en relación al día control (preayuno), y que los resultados obtenidos por West (1989) con una alimentación “ad libitum” no mostraron variaciones diurnas, es posible teorizar que las variaciones observadas durante el día son el resultado del estímulo de la alimentación, dada la ausencia de vesícula biliar en esta especie. Así, tenemos que si se asume que la fracción de captación hepática de ABs desde la circulación portal es constante, la mayor determinante de los niveles fisiológicos de ABs en el estado de alimentación y ayuno sería la absorción intestinal (Parraga y Kaneko, 1985; Pearson y col., 1992). Ello está directamente relacionado con lo planteado por Olsson (1988), quien postula que un mayor requerimiento de ABs para la absorción intestinal de grasas, produciría un incremento en la cantidad de ciclos enterohepáticos, lo que se reflejaría en un aumento de las concentraciones de ABs en sangre.

**CUADRO 3**

CONCENTRACIÓN SÉRICA DE ÁCIDOS BILIARES SANGUÍNEOS ( $\mu\text{mol/l}$ ), ANTES, DURANTE Y DESPUÉS DE UN AYUNO

Día	Control				Ayuno				Post ayuno			
	8	12	16	20	8	12	16	20	8	12	16	20
Promedio	4,12a	5,57a	7,05b	7,63b	5,02a	5,86a	5,95a	6,39a	7,91ab	9,36a	8,08ab	5,91b
Mediana	4,14	5,62	6,97	8,18	5,39b	6,19	95,41	4,94	6,42	8,02	6,53	4,12
DE	2,31	3,52	3,60	3,19	2,95	4,70	4,64	4,89	3,75	3,78	4,16	2,88
Mínimo	0,5	1,41	1,545	1,74	0	0	0	0	3,54	4,21	3,62	3,43
Máximo	9,32	13,98	15,18	12,81	10,14	16,89	13,4	17,47	14,42	15,14	17,51	12,23

DE = Desviación estándar

ABS = Ácidos biliares

Letras distintas en las filas indican diferencias significativas (p<0,05).

Valores corresponden al promedio de 13 equinos.

Las concentraciones séricas de ABs a las 8 y 12 h del día post ayuno alcanzaron valores significativamente mayores que los del primer día (control) ( $P < 0,05$ ), lo que indicaría que el ayuno produciría una modificación de su metabolismo a nivel hepático. Cabe destacar que en este día la alimentación fue iniciada a las 9 h, aproximadamente, por lo que la muestra de sangre obtenida a las 8 h, correspondería al período de privación alimentaria. En caballos ponies se han descrito concentraciones de  $12,9 \pm 1,2$   $\mu\text{mol/L}$  de ABs, los que después de 3 días de ayuno aumentarían a  $22,2 \pm 3,6$   $\mu\text{mol/L}$ , posiblemente producto de una disminución en la depuración hepática de ABs (Mendel y col., 1988), situación que también se ha observado en el hombre (Kaplowitz y Kok, 1973). Sin embargo, ello difiere con Hoffmann y col. (1987) quienes no observaron cambios en la concentración de ABs después de un ayuno de 14 h.

A partir de las 12 h del día post ayuno, la concentración de ABs disminuyó significativamente alcanzando valores semejantes a un día de alimentación normal. Ello indicaría que el hígado recupera rápidamente su capacidad de depuración de ABs, lo que es comparable a la hiperbilirrubinemia que se observa en el equino después de un período de ayuno (Engelking, 1993). En ambas situaciones se produce una reversión rápida al ser alimentado el caballo.

Las variaciones diurnas de la concentración de ABs, la diferencia observada entre un día de alimentación normal, de ayuno y de post ayuno y el manejo alimentario, tendrían una implicancia práctica y deberían ser consideradas en la determinación diagnóstica de estos compuestos, para una correcta interpretación de los resultados.

El análisis individual de los ABs que conforman el total, parece recomendable realizar a futuro a objeto de determinar el mecanismo que determina las variaciones observadas.

## RESUMEN

Con el fin de conocer las variaciones que experimentan los ácidos biliares totales sanguíneos durante el día y determinar el efecto de la alimentación sobre ellos, se determinaron estos compuestos en 13 caballos mestizos clínicamente y hematológicamente sanos durante un día de alimentación normal, de ayuno y posterior al ayuno. Los ácidos biliares fueron determinados por un método comercial enzimático ( $3 \alpha$  hidroxisteroideica) en el suero de sangre obtenida a las 8, 12, 16 y 29 h, mostrando un aumento significativo durante el día de alimentación normal (alimento se administró a las 9 y 17 h), no variando durante el ayuno, para luego aumentar en las primeras horas del post ayuno y descendiendo después.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Escuela de Equitación de Carabineros de Chile y su Servicio de Veterinaria por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo.

## REFERENCIAS

- ANWER, M.S., R.R. GRONWALL, L.R. ENGELKING, R.D. KLENTZ. 1975. Bile acids kinetics and bile secretion in the pony. *Am. J. Physiol.* 229: 592-597.
- BALISTRERI, W.F., L.M. SHAW. 1987. Liver function. In: *Fundamentals of Clinical Biochemistry*. N.W. Tietz. 3<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders Co. 729-761.
- CORNELIUS, C.E. 1987. A review of new approaches to assessing hepatic function in animals. *Vet. Res. Com.* 11: 423-441.
- ENGELKING, L.R. 1993. Equine fasting hyperbilirubinemia. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 37: 115-125.
- GRONWALL, R. 1977. Plasma bile acids. *Proc. First Inter. Symposium in Equine Hemat.* Am. Assoc. Eq. Practitioners, pp. 255-257.
- HOFFMANN, W.E., G. BAKER, S. RIESER, J.L. DORNER. 1987. Alterations in selected serum biochemical constituents in equids after induced hepatic disease. *Am. J. Vet. Res.* 48(9): 1.343-1.347.
- KANEKO, J.J., W.G. RUDOLPH, D.W. WILSON, G.P. CARLSON. 1992. Bile acid fractionations by high-performance liquid chromatography in equine liver disease. *Vet. Res. Com.* 16: 161-172.
- KAPLOWITZ, N., E. KOK. 1973. Post prandial serum bile acid for the detection of hepatobiliary disease. *J. Am. Med. Ass.* 225: 292-293.
- MCGILVER, R.W. 1983. Turnover of fats and lipoproteins: The cholesterol connection. In: *Biochemistry. A Functional Approach*. 3<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders Co. 555-571.
- MENDEL, V.E., M.R. WITT, W.S. GITCHELL, D.N. GRIBBLE, Q.R. ROGERS, H.J. SEGALL, H.D. KNIGHT. 1988. Pirrolizidine alkaloid-induced liver disease in horses: An early diagnosis. *Am. J. Vet. Res.* 49(4): 572-578.
- OLSSON, T. 1988. Serum bile acids in cattle: Diurnal variation and variation due to stage of lactation. *J. Vet. Med. A.* 35: 467-472.
- PARRAGA, M.E., J.J. KANEKO. 1985. Total serum bile acids and the bile acid profile as tests of liver function. *Vet. Res. Com.* 9: 79-88.
- PEARSON, E.G., M.A. CRAIG, K. ROWE. 1992. Variability of serum bile acid concentrations over time in dairy cattle, and effect of feed deprivation on the variability. *Am. J. Vet. Res.* 53: 1.780-1.783.

- RUDOLPH, W.G. 1990. Los ácidos biliares y su aplicación al diagnóstico de las afecciones hepáticas en los animales domésticos. Arch. Med. Vet. 22(1): 7-15.
- TENNANT, B.C., W.E. HORNBUCKLE. 1980. Gastrointestinal function. In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals. J.J. Kaneko. 3ª ed., Academic Press Inc., New York, USA. 417-461.
- WEST, H.J. 1989. Evaluation of total plasma bile acid concentrations for the diagnosis of hepatobiliary disease in horses. Res. Vet. Science 46: 264-270.