

Determinación de Amiloide sérico tipo “A” en cuatro grupos de Caballos Criollos Colombianos en diferentes alturas

Trabajo de grado para optar por el título de Médico veterinario

Martín Velásquez Toro

**Asesora
Silvia Posada Arias
Magister**

**Corporación Universitaria Lasallista.
Ciencias Administrativas y Agropecuarias
Medicina Veterinaria
Caldas-Antioquía
2019**

Tabla de contenido

Lista de tablas	3
Lista de ilustraciones	4
Lista de apéndices	5
Resumen	6
Summary	7
Introducción	8
Marco teórico	10
Materiales y Métodos.	17
Agrupación de caballos por alturas:	17
Agrupación de caballos por sexo:	18
Método de Obtención de la muestra:	18
Determinación del AAS	18
Determinación de las proteínas plasmáticas totales	20
Variables evaluadas:	20
Análisis estadístico:	20
Método de almacenamiento de datos:	21
Comité de ética:	22
Resultados	23
Discusión	28
Conclusiones	32
Referencias	33
Apendices	40

Lista de tablas

Tabla 1. Registro de datos para cada equino estudiado.....	218
Tabla 2. Altura en metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m).....	21
Tabla 3. Diferencia entre sexos.....	21
Tabla 4. Diferencia entre grupos etarios.....	22
Tabla 5. Diferencia entra AAS vs Ppt.....	23

Lista de ilustraciones

Ilustración 1. Materiales usados para obtención de la muestra.	¡Error! Marcador no definido.	6
Ilustración 2. Análisis cuantitativo y cualitativo de AAS.....	¡Error! Marcador no definido.	7

Lista de apéndices

Apéndice A. Artículo de publicación**¡Error! Marcador no definido.**33

Resumen

El amiloide sérico A (AAS) es la principal proteína de la fase aguda de la inflamación en caballos. Se determinaron y compararon los valores de amiloide sérico tipo A para cuatro grupos de equinos en diferentes edades en sangre venosa en 147 equinos de tres alturas diferentes de Antioquia y se determinó en el equipo StableLab EQ1® - Handheld Reader, además se realizaron comparaciones entre sexos y diferentes grupos etarios y se esperaba encontrar los valores de referencia. Los grupos en los cuales se dividieron los pacientes fueron: Neonatos, potros, adultos en competencia y adultos mayores. El valor de referencia de AAS para la altura a 2100 m.s.n.m fue 13.125 $\mu\text{g/dL}$ (0-32 $\mu\text{g/dL}$), para los 1800 m.s.n.m fue 19.429 $\mu\text{g/dL}$ (0-80 $\mu\text{g/dL}$) y para los 1500 m.s.n.m fue 16.769 $\mu\text{g/dL}$ (0-28 $\mu\text{g/dL}$); El valor de referencia de AAS para los machos CCC fue 17,941 $\mu\text{g/dL}$ (0 – 32 $\mu\text{g/dL}$) y hembras CCC 14,906 $\mu\text{g/dL}$ (0 – 80 $\mu\text{g/dL}$) respectivamente; El valor de referencia de AAS para los neonatos fue 18.100 $\mu\text{g/dL}$ (0-30 $\mu\text{g/dL}$), para potros fue de 21.100 $\mu\text{g/dL}$ (0-80 $\mu\text{g/dL}$), para adultos fue 13.316 $\mu\text{g/dL}$ (0-23 $\mu\text{g/dL}$) y adultos mayores fue de 13.700 $\mu\text{g/dL}$ (0-32 $\mu\text{g/dL}$); El valor de referencia para AAS fue de 19.564 $\mu\text{g/dL}$ (0-80 $\mu\text{g/dL}$) y el valor de referencia para Ppt fue 19.510 g/L (57-78 g/L). Se encontró diferencia estadística significativa al comparar los diferentes grupos etarios. Se determinaron los valores de referencia para el AAS en diferentes alturas sobre el nivel del mar, se debe considerar la edad al realizar la medición de AAS.

Palabras clave: Amiloide, inflamación, potro, altura.

Summary

The serum amyloid A (AAS) is the main protein of the acute phase of inflammation in horses. The values of serum amyloid type A were determined and compared for four equine groups at different ages in venous blood in 147 equines of three different heights of Antioquia and was determined in the StableLab EQ1® - Handheld Reader team, in addition, comparisons were made between sexes and different age groups and expected to find the reference values. The groups in which the patients were divided were: Neonates, foals, competing adults and older adults. The AAS reference value for the height at 2100 m.a.s.l was 13.125 µg / dL (0-32 µg / dL), for the 1800 m.a.s.l it was 19.429 µg / dL (0-80 µg / dL) and for the 1500 m.a.s.l it was 16.769 µg / dL (0-28 µg / dL); The AAS reference value for CCC males was 17,941 µg / dL (0 - 32 µg / dL) and CCC females 14,906 µg / dL (0 - 80 µg / dL) respectively; The reference value of AAS for neonates was 18,100 µg / dL (0-30 µg / dL), for foals it was 21,100 µg / dL (0-80 µg / dL), for adults it was 13,316 µg / dL (0- 23 µg / dL) and older adults was 13,700 µg / dL (0-32 µg / dL); The reference value for AAS was 19,564 µg / dL (0-80 µg / dL) and the reference value for Ppt was 19,510 g / L (57-78 g / L). A statistically significant difference was found when comparing the different age groups. The reference values for the AAS were determined at different heights above sea level, age should be considered when performing the AAS measurement.

Keywords: Amyloid, inflammation, colt, height.

Introducción

Diagnosticar y monitorear una respuesta inflamatoria supone un desafío clínico porque los signos clínicos clásicos de la inflamación; rubor, dolor, calor, tumefacción y pérdida de la función, no siempre están presentes. En general las proteínas de fase aguda (PFA) se definen como proteínas que aumentan o disminuyen sus concentraciones en plasma en al menos un 25% después de un estímulo inflamatorio. (Jacobsen S y Andersen PH, 2007, 46).

La búsqueda en sangre de parámetros indicativos de la presencia de inflamación ha sido intensa por varias décadas, tanto en medicina humana como en veterinaria. El Amiloide sérico A se considera la proteína de fase aguda de elección en equinos, con una vida media menor a 24 horas, observándose aumentos en casos de infecciones, bacterianas o víricas ya sean experimentales o naturales, en adultos y neonatos. . (Sanchez-Teran AF, et al. 2016, 112). Se debe tener en cuenta que las concentraciones máximas de ASA posterior a un daño inflamatorio se reflejan a las 48 horas (Jacobsen S y Andersen PH, 2007, 34).

Su importancia clínica en equinos radica en que induce la degradación de la matriz extracelular y es un fuerte quimioatrayente de células inmunitarias, sin embargo una exposición prolongada de SSA puede jugar un papel importante en enfermedades degenerativas cómo lo es la artritis reumatoide. (Passamonti F, et al. 2015, 90). Es necesario recalcar que el fibrinógeno es considerado una PFA menor en equinos y por

lo tanto es preferible utilizar otras PFA como ASA si se quiere evaluar de mejor manera el curso y la magnitud de un proceso infeccioso e inflamatorio (Jacobsen S, JP Jensen, et al. 2005, 215).

El objetivo de este estudio fue determinar los valores de AAS en caballos criollos colombianos que habitan diferentes alturas sobre el nivel del mar y con diferentes edades.

Marco teórico

La respuesta de fase aguda se ve estimulada por la liberación de citocinas, entre las que destacan: la Interleucina-1 (IL-1), la Interleucina-6 (IL-6) y el Factor de Necrosis Tumoral (TFN- α). Estas citocinas son liberadas por monocitos y macrófagos en el lugar donde se sitúa el foco inflamatorio o infeccioso, y debido a sus acciones paracrinas este aumento inicial va a provocar un incremento sistémico; durante el desarrollo de esta respuesta inmunológica se produce una variación en las concentraciones de ciertas proteínas presentes en el plasma denominadas Proteínas de Fase Aguda, entre las que se encuentran la haptoglobina, proteína C reactiva (PCR), ceruloplasmina, alfa1-glicoproteína ácida, el fibrinógeno y el amiloide A sérico. Estas son producidas durante una respuesta compleja, no específica y altamente organizada llamada respuesta de fase aguda (RFA) que tiene como fin minimizar el daño a los tejidos; acelerar el proceso de reparación y restituir la homeostasis después de una infección, trauma o estrés. (Westerman TL, Foster CM, Tornquist SJ, Poulsen KP, 2014, 25; Hari-Dass R, Shah C, Meyer DJ, Raynes JG, 2015, 56).

La proteína C reactiva fue la primera PFA descrita (a principio de los años 30) reconocida por su aplicación en diagnóstico médico humano. Se ha descrito su valor en el diagnóstico y pronóstico de un sin número de diferentes enfermedades.

La respuesta de fase aguda es la reacción inflamatoria inmediata del huésped que contrarresta desafíos como lesión de los tejidos, infección y trauma. Su función es aislar,

neutralizar y prevenir la entrada de patógenos minimizando el daño del tejido y promoviendo los procesos de reparación permitiendo mecanismos de homeostasis para la restauración de la función fisiológica. La respuesta de fase aguda involucra la inducción de los mediadores de la cascada inflamatoria la cual es caracterizada por efectos vasculares locales, sistémicos y multiorgánicos. A diferencia de la respuesta de fase crónica que es la reacción inflamatoria de duración prolongada (semanas o meses), en la que se puede observar simultáneamente los signos de inflamación activa, destrucción tisular y mecanismos reparativos. (Sanchez-Teran AF, et al. 2016, 84).

Es bien sabido que el efecto del estrés sobre las concentraciones de PFA es controversial ya que es muy difícil diferenciar los efectos del estrés de los efectos de los traumas producidos en distintas condiciones estudiadas (Petersen HH, Nielsen JP y Heegaard P. 2004, 33). Según Jacobsen S y Andersen PH (2007), condiciones no inflamatorias, estado nutricional, ejercicio, manejo u otras fuentes menores de estrés no deberían afectar las concentraciones de las proteínas de fase aguda (PFA), sin embargo se ha demostrado que la administración de ACTH o prednisolona (hormonas pertenecientes al eje HPA) es seguida por un aumento en las concentraciones de proteína C reactiva, un tipo de PFA (Petersen HH, et al. 2004, 33).

El inicio de la cascada inflamatoria se produce principalmente a través de los monocitos activados en la sangre y macrófagos en el sitio donde se encuentra el estímulo. Tras la activación de los macrófagos se liberan una serie de mediadores

inflamatorios primarios, entre ellos, la interleucina (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF), considerados unos de los más importantes. Estos causan la liberación por las células del estroma local de una serie de citocinas secundarias (IL-6, IL-8 y la proteína quimioattractante del monocito (MCP-1 o CCL2), dando como consecuencia la atracción de leucocitos al sitio de la inflamación (Cassatella MA, 1995, 16). Además de las citocinas, existen otros mediadores inflamatorios como los glucocorticoides y los factores de crecimiento. Los glucocorticoides pueden estimular la expresión de algunas PFA directamente, así mismo regulan la producción de dichas citocinas. En mamíferos, la respuesta de la fase aguda es una reacción sistémica a la inflamación y/o infección, e injuria del tejido que protege al huésped minimizando el daño de este y promoviendo su salud (Gabay C y Kushner I. 1999, 48; Sandri S, et al. 2016, 12).

El AAS es el principal componente de las placas amiloideas secundarias depositadas en los órganos principales como consecuencia de la enfermedad inflamatoria crónica (Husby G, Marhaug G, Downton B, Sletten K, Sipe J D, 1994, 119). La familia de la AAS contiene un número de diferentes apolipoproteínas expresadas, las cuales son sintetizadas principalmente por el hígado, pueden ser divididas en dos clases de acuerdo a su capacidad de respuesta a estímulos inflamatorios y según su función biológica. Los niveles en plasma del AAS se aumentan hasta 1.000 veces durante la inflamación y pueden exceder 1 mg/mL-1 (Hoffman JS y Benditt, EP. 1982), implicando un beneficio para la respuesta del huésped. Durante la inflamación, el AAS está asociado

predominantemente con la tercera fracción de lipoproteína de alta densidad HDL3 (Eriksen N y Benditt EP, 1980, 77), reemplazando a la apolipoproteína 1 (apoA-1) considerada la más predominante. El amiloide A sérico constitutivo (AAS-C) ha sido descrito en humanos y ratones, a diferencia del amiloide A sérico de fase aguda (AAS-A), que se encuentra mínimamente inducido durante la respuesta de la fase aguda, y ambas son asociadas con la fase normal y aguda del HDL (Whitehead AS, et al. 1996, 267; Beer MC, et al. 1995, 36).

Los perfiles de lipoproteínas son notablemente alterados durante el proceso inflamatorio. El HDL y los niveles de apolipoproteínas disminuyen considerablemente durante la reacción de fase aguda y son más bajos que lo normal en un estado inflamatorio crónico (Gollaher CJ y Bausserman LL. 1996, 194).

AAS-A y AAS-C son proteínas asociadas con el HDL, inician principalmente con la unión de HDL-apolipoproteína durante la respuesta de fase aguda (Olsson N, Siegbahn A y Nilsson G, 1999, 143). Recientemente en un estudio se demostró que los epítomos de residuos 31-39, 64-78 y 95-104 están expuestos cuando el AAS se asocia con el HDL (Sellar GC, et al. 1994, 19; Preciado-Patt L, et al. 1994, 35). El ácido ribonucleico mensajero (RNAm) del AAS puede ser inducido por estímulos inflamatorios y puede llegar a ser uno de los más abundantes en el hígado (Beer MC, et al. 1995, 34), lugar donde también se realiza su catálisis (Faulkes D J y Woo P, 1997, 75), tiene una vida media menor a 24 horas y se elimina del plasma con mayor rapidez que otras

apolipoproteínas HDL. En el transcurso de una respuesta de fase aguda o inflamación crónica, la capacidad del hígado para degradar AAS disminuye, en un 14% y 31%, respectivamente, contribuyendo así a la elevación circulante de los niveles de AAS observados bajo estas condiciones (Gollaher CJ y Bausserman LL, 1990, 245). La síntesis del AAS es inducida in vivo durante la respuesta inflamatoria a causa de lesiones, infecciones y trauma en todas las especies de vertebrados. Estos cambios pueden ser generados experimentalmente utilizando agentes bacterianos como lipopolisacárido (LPS), caseína, AgNO₃ y cirugía; y como consecuencia inducen la cascada de citocinas proinflamatorias. Las principales citocinas que participan en la inducción de la AAS son IL-1, TNF-alfa e IL-6. Otras citocinas que pueden estar involucradas directa o indirectamente en la inducción de la AAS son la IL-2, el interferón-gamma (IFN- γ), el factor neurotrópico ciliar, la IL-11, el factor inhibidor de la leucemia, la oncostatina M y la cardiotrofina-1, entre otras (Aggarwal B.B y Natarajan K, 1996, 93; Foynt Bruun C, Sletten K y Marhaug G, 1998, 111).

Las funciones principales reportadas de la AAS son dos; la primera induce a la degradación de enzimas de la matriz extracelular como la colagenasa, estromielisina, metaloproteinasas de matriz 2 y 3, las cuales son importantes en el proceso de reparación después del daño en los tejidos. Sin embargo la expresión prolongada de AAS y producción a largo término de esas enzimas puede jugar un papel muy importante en las enfermedades degenerativas como la artritis reumatoide (Mitchell T I, Coon CI y

Brinckerhoff C E, 1990, 87). La segunda función es evidente en estudios in vitro donde se ha observado que el AAS actúa como quimioatrayente de las células inmunes como monocitos, PMNs, mastocitos y linfocitos T. Si el AAS tiene esa propiedad in vivo, localmente podría generar la activación del reclutamiento de este tipo de células en los sitios de la inflamación y aumento de la inflamación local (Badolato R, et al. 1994, 203; Olsson N, et al. 1999, 254). El AAS se une a los neutrófilos y, al igual que otras apolipoproteínas como ApoA-I, inhiben la respuesta oxidativa, sugiriendo que esto podría ayudar a prevenir el daño tisular oxidativo durante la inflamación (Blackburn W DJ, et al. 1991, 32). Se propuso desde hace dos décadas que el AAS estaba implicado en la supresión de las respuestas inmunes in vitro contra algunos antígenos afectando las interacciones entre las células T, macrófagos y la función de los linfocitos T ayudadores.

El AAS humano se ha encontrado como un potente inhibidor de linfocitos, de células HeLa y otras funciones de una línea de células MRC5. Una actividad regulatoria entre las citocinas y el AAS fueron propuestos con base en la observación de que AAS es inducido por la IL-1 y TNF, y estas dos últimas a su vez inducen la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2) en el hipotálamo, y la producción de PGE2 se correlaciona con la magnitud de la fiebre (Shainkin-Kestenbaum y R Berlyne G, et al. 1991). La agregación plaquetaria también es inhibida por AAS y de manera leve incrementa los niveles de la prostaglandina I2 que es también un agente antiagregante. Del mismo modo, tanto las plaquetas como los mediadores generados bajo esta activación están

involucrados en procesos inflamatorios y trombóticos. Estos hallazgos sugieren que la AAS puede actuar como regulador negativo de eventos proinflamatorios durante la respuesta de fase aguda (Zimlichman S, et al. 1995, 180).

En el último tiempo el interés se ha enfocado en el potencial que tienen las proteínas de fase aguda como un indicador de la presencia, el grado y el curso de la inflamación, esto se debe a que estas proteínas son liberadas en grandes cantidades al torrente sanguíneo en respuesta a la infección, inflamación o como respuesta a un daño tisular. (Santos, F. C, et al. 2014, 15).

Materiales y Métodos.

Para el estudio se tomaron 147 equinos de raza Caballo Criollo Colombiano, tamaño de muestra acogido por conveniencia.

Hembras o machos, debían tener registro ante FEDEQUINAS para validar su raza (En el caso de los potros se verificó su reporte de monta). Los caballos estaban clínicamente sanos, lo cual se corroboró mediante un examen clínico general. Los equinos seleccionados no debían haber presentado ninguna patología tres meses anteriores a la obtención de la muestra. Además, las condiciones de alimentación fueron similares en todos los individuos del estudio.

Agrupación de los caballos por edad:

A Neonatos: Caballos de 1 día de nacido hasta los 15 días de edad (30 individuos).

B Potros: Caballos entre 6 meses y 2 años (30 individuos).

C Adultos en competencia: Caballos entre 2 años y 8 años (57 individuos).

D Adultos mayores: Caballos mayores de 8 años (30 individuos).

Agrupación de caballos por alturas:

- Rionegro Antioquia: altura 2100 msnm, presión atmosférica 585 mmHg aproximadamente (48 individuos).

- Caldas Antioquía: altura 1800 msnm, presión atmosférica 600 mmHg aproximadamente (78 individuos).

- Copacabana Antioquía: altura 1500 msnm, presión atmosférica 637 mmHg aproximadamente (21 individuos).

Agrupación de caballos por sexo:

- Hembras (96 individuos).
- Machos (51 individuos).

Las muestras fueron tomadas por médicos veterinarios expertos en el área de medicina interna de equina y laboratorio clínico, los pacientes que se excitaron durante el procedimiento fueron descartados porque se podían alterar los resultados de las muestras.

El método del muestreo fue aplicable a todos los grupos. La hora de la toma de la muestra no fue tomada en cuenta debido a que no influye en los resultados.

Método de Obtención de la muestra:

Se realizó una desinfección previa a la toma de la muestra, en el área del surco yugular con Prepodine®, alcohol y Microdyne®. Se obtuvieron 10 ml de sangre con una aguja calibre 21

Determinación del AAS

Se procesaron las muestras según las indicaciones del laboratorio para obtener el resultado del AAS. Las muestras fueron procesadas inmediatamente con el analizador de campo. De cada jeringa se depositó una gota de sangre en la tirilla del equipo:

StableLab EQ1® - Handheld Reader (Irlanda)

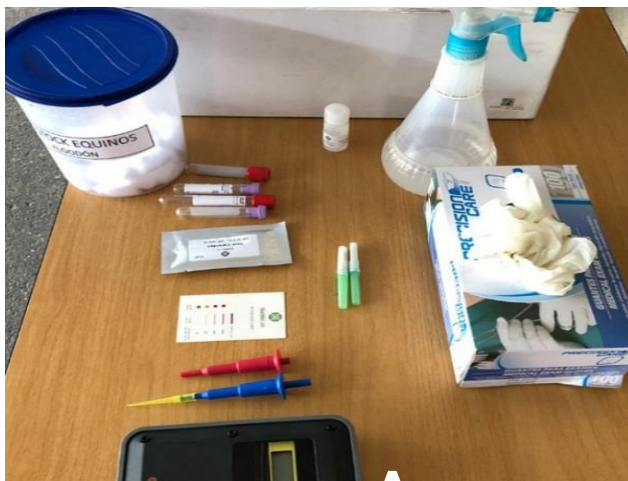


Ilustración 1. Materiales usados para la obtención de la muestra sanguínea.



Ilustración 2. Análisis de datos A: cuantitativo, B: cualitativos, del amiloide sérico A (AAS).

Determinación de las proteínas plasmáticas totales

Se determinaron por medio de refractómetro portátil (00-10%°Brix-BRIXCO) después de realizar centrifugación de la muestra por 5 minutos a 5000 revoluciones por minuto (Centrifuga BX-Velocidad variable - UNICO).

Variables evaluadas:

- Sexo.
- Edad (Neonatos, potros, adultos en competencia, adultos mayores).
- Altura en la que habita sobre el nivel del mar (msnm)
- Proteínas plasmáticas.

Análisis estadístico:

Los datos de cada caballo se grabaron y se registraron luego en una hoja de cálculo del software Microsoft Excel®. Para todos los datos se realizaron estadísticas descriptivas y gráficos. El valor del amiloide sérico y el valor de las proteínas plasmáticas totales fueron sometidos a pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y de homogeneidad de varianza (Cochran). Para determinar si había diferencias entre los grupos se realizaron regresiones lineales invariadas, tomando como variable respuesta el valor de amiloide sérico y como variables independientes sexo, altura sobre el nivel de mar, grupo etario y

proteínas plasmáticas totales. Usando graficas se verificaron los supuestos para cada regresión tales como normalidad de los errores y homocedasticidad. Todos los análisis y graficas fueron realizados con R versión 3.3.2 y RStudio 1.0.136.

Método de almacenamiento de datos:

Tabla 1. Registro de datos para cada equino estudiado.

Clasificación						Amiloide Sérico tipo A (AAS)	Ppt - g/L
Muestra #	Nombre	Altura	Sexo	Grupos etarios	Estado de salud	Valor obtenido	Valor

CUADRO DE CONVENCIONES			
Altura	Grupo etario	Sexo	AAS cualitativo
1 - 2100 msnm	1 - Neonatos	0 - Hembra	0 - Verde
2 - 1800 msnm	2 - Potros	1 - Macho	1 - Rojo
3 - 1500 msnm	3 - Adultos en competencia		
	4 - Adultos mayores		

Comité de ética:

La realización de este estudio fue avalada por el comité institucional de ética para la investigación con animales número 18 del 20 de Octubre de 2016 de la Corporación Universitaria Lasallista.

Resultados

Después de realizar estadística descriptiva se encontró normalidad en los datos.

El valor de referencia de AAS para la altura a 2100 m.s.n.m fue 13.125 $\mu\text{g/dL}$ (0-32 $\mu\text{g/dL}$), para los 1800 m.s.n.m fue 19.429 $\mu\text{g/dL}$ (0-80 $\mu\text{g/dL}$) y para los 1500 m.s.n.m fue 16.769 $\mu\text{g/dL}$ (0-28 $\mu\text{g/dL}$). No se encontró diferencia significativa al comparar los valores de AAS entre las alturas, sin embargo, los equinos que habitan sobre los 1500 m.s.n.m tienen 6,304 veces más AAS y los caballos que habitan sobre los 1800 m.s.n.m tienen 3,644 veces más AAS que los que habitan a 2100 m.s.n.m (Tabla 2).

El valor de referencia de AAS para los machos CCC fue 17,941 $\mu\text{g/dL}$ (0 – 32 $\mu\text{g/dL}$) y hembras CCC 14,906 $\mu\text{g/dL}$ (0 – 80 $\mu\text{g/dL}$) respectivamente. No se encontró diferencia significativa al comparar los valores de AAS entre los sexos, aunque, los machos presentan 3.035 veces más AAS que las hembras (Tabla 3).

El valor de referencia de AAS para los neonatos fue 18.100 $\mu\text{g/dL}$ (0-30 $\mu\text{g/dL}$), para potros fue de 21.100 $\mu\text{g/dL}$ (0-80 $\mu\text{g/dL}$), para adultos fue 13.316 $\mu\text{g/dL}$ (0-23 $\mu\text{g/dL}$) y adultos mayores fue de 13.700 $\mu\text{g/dL}$ (0-32 $\mu\text{g/dL}$). Si se encontró una diferencia significativa de los adultos referente a los demás grupos etarios, encontrándose el valor de AAS 0.384 veces por debajo que los adultos mayores, 4.784 veces menor que los neonatos y 7.784 veces menor que los potros (Tabla 4).

El valor de referencia para AAS fue de 19.564 $\mu\text{g/dL}$ (0-80 $\mu\text{g/dL}$) y el valor de referencia para Ppt fue 67.367 g/L (57-78 g/L). Al realizar comparaciones entre la concentración de proteínas plasmáticas y AAS no se encontró significancia estadística ($p > 0.05$). (Tabla 5).

Tabla 2. Altura sobre el nivel del mar.

Variable	Promedio	Valor P
2100 m.s.n.m (Control)	13.125 $\mu\text{g/dL}$.000
1800 m.s.n.m	16.769 $\mu\text{g/dL}$.081
1500 m.s.n.m	19.429 $\mu\text{g/dL}$.149

Grafico 1. Altura sobre el nivel del mar.

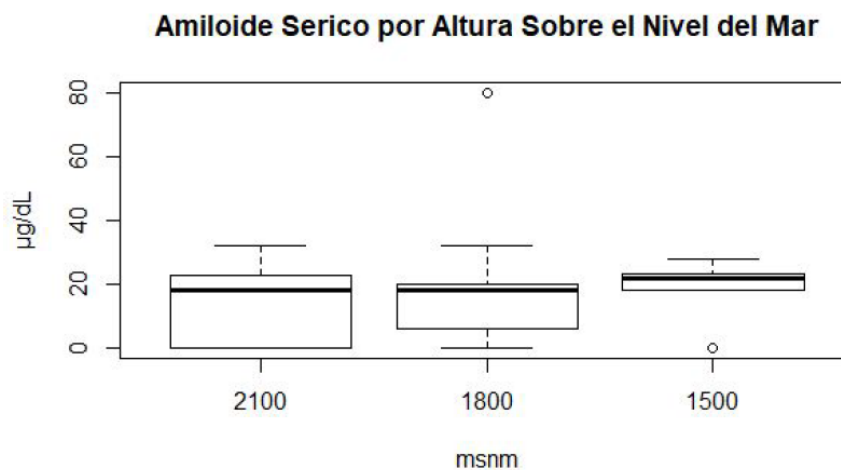


Tabla 3. Diferencias entre sexos.

Variable	Promedio	Valor P
Hembra (Control)	14.906 $\mu\text{g/dL}$.000
Macho	17.941 $\mu\text{g/dL}$.205

Gráfico 2. Diferencias entre sexos.

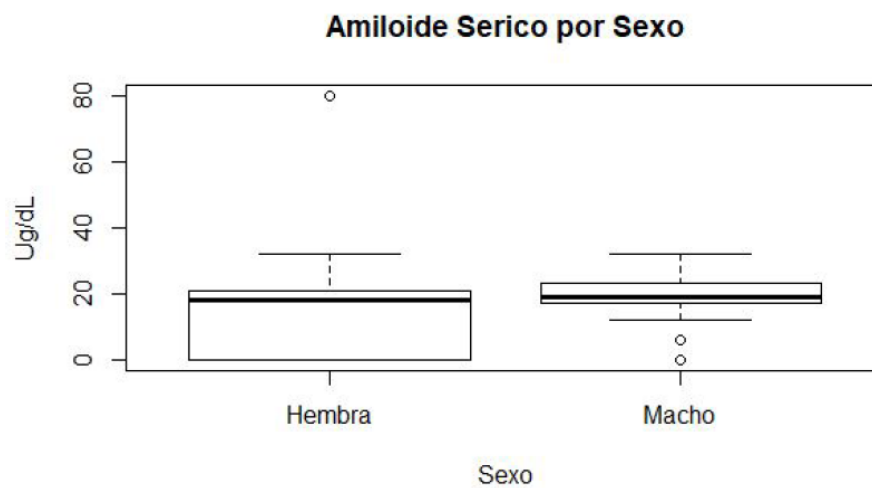


Tabla 4. Diferencias entre grupos etarios.

Variable	Promedio	Valor P
Adulto mayor (Control)	13.700 $\mu\text{g/dL}$.000
Adulto en competencia	13.316 $\mu\text{g/dL}$.900
Potro	21.100 $\mu\text{g/dL}$.036
Neonato	18.100 $\mu\text{g/dL}$.211

Gráfico 3. Diferencias entre grupos etarios.

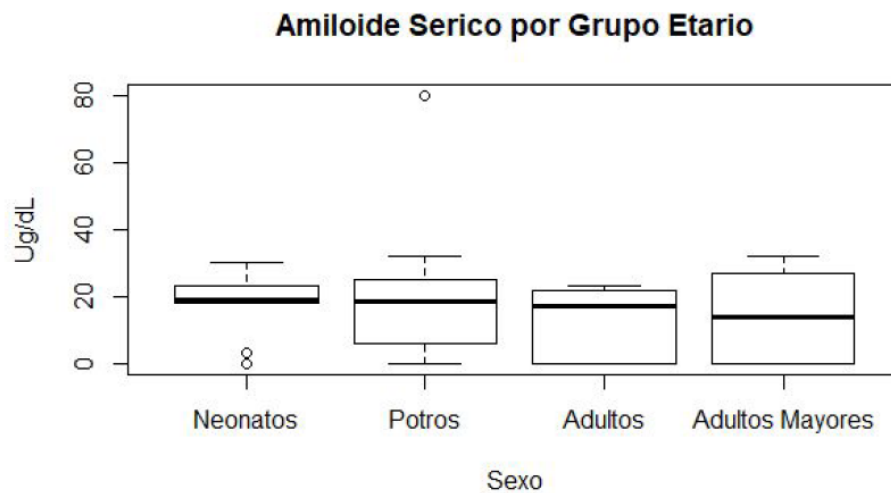


Tabla 5. Diferencia entre Amiloide sérico A vs proteínas plasmáticas.

Variable	Promedio	Valor P
SSA (Control)	19.564 µg/dL	.137
Ppt	67.367 g/L	.782

Discusión

Los resultados obtenidos como valor de referencia en Caballos Criollo Colombianos sanos, para el AAS son similares a los reportados en las razas caballos Pura sangre inglés, 0.5-120 $\mu\text{g/dL}$ (Jacobsen S y Andersen PH, 2007), Chileno de rodeo, 0-100 $\mu\text{g/dL}$ (Ansoleaga Pérez, Nicolás. 2011), Cuarto de milla, 0-128 $\mu\text{g/dL}$ (Buñay H, Naranjo M. 2018) y similares a lo reportado en humanos que habitan a una altura de 4800 m.s.n.m, los cuales tenían un rango entre 50 a 175 $\mu\text{g/dL}$ (Conchari, Barron, Otolara y Vargas, 2003).

Respecto a diferencias encontradas en los valores de AAS en caballos de diferentes alturas no se encontró mucha información en individuos de la especie; aunque no hubo diferencia estadística significativa, sí se encontró que había disminución en el valor de AAS a medida que el caballo habitaba una altura mayor; a diferencia de lo reportado en humanos atletas, en donde a mayor altura los pacientes presentaban mayor concentración de AAS después de ser sometidos a cambios de altura sin peraclimatización y de esta manera incrementado la resistencia cardiaca y aumentando el estrés por isquemia y reperfusión y subsecuentemente las PFA (Loos BG. 2015, 76; Gangwar A, et al. 2019, 27). En el estudio aquí realizado los caballos no fueron sometidos a cambios repentinos de altura, además que la diferencia entre especies debe ser considerada.

Así como lo reportado en otros estudios no se encontró diferencia estadística significativa en los valores de AAS entre machos y hembras, esto probablemente debido al tipo de respuesta que ocurre durante la fase aguda de la inflamación, en donde no tendría por qué haber diferencia intersexo y de esta manera se ve determinado en este estudio. En casos donde la hembra que se encuentra en gestación puede presentar un aumento fisiológico en los valores de AAS (Gerros, 2010; Santos FC et al. 2014, 17). A dichos cambios en los valores se debe prestar atención al momento de realizar un diagnóstico asertivo, al igual que al momento de realizar nuevos estudios.

Respecto a los grupos etarios, se encontró diferencia estadística significativa entre ellos. Los neonatos tienen 40% menos AAS que los adultos, aunque esto puede variar en relación al grado de madurez hepática, en este estudio los neonatos presentaron un AAS dentro del rango normal, pero con valores 4.4 veces más concentración a los adultos mayores. Estas variaciones deben ser consideradas en neonatos con procesos inflamatorios agudos (Joshi KJ, Wand HC, Merchant AT, Rimm EB, 2004, 13). André F, et al. 2010, determinaron que “hubo una correlación lineal positiva entre edad y PCR, de manera que cuanto mayores los individuos, más altos los valores de PCR”, esto debido al metabolismo; de otra manera en el estudio aquí presentado no se encontró esta relación con el AAS.

Entre las proteínas plasmáticas totales y el AAS no hubo ningún tipo de correlación, esto probablemente a que los caballos en este estudio se encontraban sanos; en otros estudios al comparar la albumina con el AAS, se encontró correlación estadística significativa; lo que se explica debido a que la albumina es una proteína negativa de la fase aguda de la inflamación, es decir disminuye durante este proceso; mientras que el AAS es una proteína positiva del mismo proceso (Persson GR, Pettersson T, Ohlsson O, Renvert S, 2005, 24).

Los valores patológicos de AAS frecuentemente se detectan en asociación con concentraciones normales de PCR. El AAS aumenta en forma más temprana y aguda que la PCR. Finalmente en forma contraria a la PCR, el AAS presenta la misma tendencia en las infecciones virales y bacterianas. Si bien la información disponible sobre el AAS en neonatos actualmente es limitada, es posible postular un papel de la importancia primaria del AAS en el tratamiento de las infecciones neonatales, concluyen los especialistas (Noack B, et al. 2001, 7).

EL AAS hace parte de las PFA, en donde la más significativa es el fibrinógeno, en condiciones de salud el AAS no es representativo y por ello probablemente no exista correlación con las demás Ppt. Es necesario recalcar que el fibrinógeno es considerado una PFA menor en equinos y por lo tanto es preferible utilizar otras PFA como ASA si se quiere evaluar de mejor manera el curso y la magnitud de un proceso infeccioso e

inflamatorio. Se deberán realizar comparaciones de las proteínas en CCC enfermos para determinar la correlación entre estas dos proteínas (Jacobsen S y Andersen PH, 2007, 10).

Conclusiones

El AAS en los CCC sanos se comporta de manera similar a lo reportado en otras razas de caballos. Existen variaciones importantes en los valores de AAS entre las diferentes alturas, aunque no estadísticas, se debe considerar esta condición clínicamente. No hay variaciones significativas del AAS entre sexos. En caballos sanos no existen correlaciones entre las proteínas plasmáticas totales y el AAS.

La edad debe ser considerada cuando se desee utilizar el AAS en CCC como indicador de inflamación aguda. Otros estudios del comportamiento del AAS en CCC deben realizarse.

Debido a la poca información que existe sobre el amiloide sérico A en Colombia y la escasa bibliografía en español, sería muy útil tener más investigaciones sobre el valor del AAS en diferentes patologías presentes en el país. Valores de referencia y rangos que se acoplen a la realidad de las condiciones geográficas, físicas, epidemiológicas y meteorológicas del país, para saber si estas influyen en el valor del biomarcador.

Referencias

- Aggarwal B.B, Natarajan K. (1996). Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *EurCytokineNetw.* 7, 93-124.
- André F, Conceição Aparecida da Silva, Aglécio L. Sousa, Sílvia B. Mazon, Sarah Monte Alegre, Eros A. Almeida y Maria E. Guariento. (2010). Determinación de la concentración plasmática de proteína C reactiva en pacientes con diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas. Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Estatal de Campinas UNICAMP. São Paulo. Brasil. *Rev Esp Cardiol.* 63(9), 1096-9
- Ansoleaga Pérez, Nicolás. (2011). Efecto del rodeo chileno sobre las concentraciones de amiloide sérico a (asa) y otros constituyentes sanguíneos indicadores de bienestar en equinos. Universidad Austral de Chile. *J Lipid Res.* 36, 526-34.
- Badolato R, Wang J M, Murphy W J, Lloyd A R, Michiel DF, Bausserman, L L, et al. (1994). Serumamyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissueinfiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J ExpMed.*180, 203-9.
- Beer MC, Yaun T, Kindy MS, Asztalos BF, Roheim PS, de Beer, FC. (1995). Characterization of constitutive human serumamyloid A protein (AAS4) as anapolipoprotein. *J Lipid Res.* 36, 526-34.

- Blackburn W DJ, Dohlman JG, Venkatachalapathi YV, Pillion D J, Koopman W J, Segrest JP, et al. (1991) Apolipoprotein A-I decreases neutrophil degranulation and superoxide production. *J Lipid Res.* 32, 1911-8.
- Buñay H, Naranjo M. (2018). Evaluación de los niveles de amiloide sérico A frente al fibrinógeno como biomarcadores de inflamación en equinos. Universidad central del ecuador. *EurCytokineNetw.* 7, 93-124.
- Cassatella MA. (1995). The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *ImmunolToday.* 16, 21-6.
- Daniel AJ, Leise BS, Burgess BA, Morley PS, Cloninger M, Hassel DM. (2016). Concentrations of serum amyloid A and plasma fibrinogen in horses undergoing emergency abdominal surgery. *J VetEmergCritCare* (San Antonio). 26(3), 344-51.
- Eriksen N, Benditt EP. (1980). Isolation and characterization of the amyloid-related apoprotein (AAS) from human high density lipoprotein. *ProcNatlAcadSci USA.* 77, 6860-64.
- Faulkes D J, Woo P. (1997). Do alleles at the serum amyloid A locus influence susceptibility to reactive amyloidosis in systemic onset juvenile chronic arthritis? *AmyloidInt. J ExpClinInvest.* 4, 75-9.
- Foy Bruun C, Sletten K, Marhaug G. (1998). Mouse serum amyloid A (AAS) proteins isolated by two-dimensional electrophoresis: characterization of isotypes and the

- effect of separate and combined administrations of cytokines, dexamethasone and lipopolysaccharide (LPS) on serum levels and isotype distribution. *ClinExpImmunol.* 111, 231-6.
- Gabay C, Kushner I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 340, 448-54.
- Gangwar A, Pooja &, Sharma M, Singh K, Patyal A, Bhaumik G, Bhargava K and Niroj Kumar Sethy. (2019). Intermittent normobaric hypoxia facilitates high altitude acclimatization by curtailing hypoxia-induced inflammation and dyslipidemia. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 7, 93-124.
- Gerros, T. c. (2010). Fibrinogen its use in equine medicine. Obtenido de http://0038b5c.netsolhost.com/pdf/Study_Fibrinogen_and_its_use_in_Equine_Medicine.pdf *VetScan VSpro.*
- Gollaher CJ, Bausserman LL. (1990). Hepatic catabolism of serum amyloid A during an acute phase response and chronic inflammation. *Proc Soc Exp Biol Med.* 194, 245-50.
- Hari-Dass R, Shah C, Meyer DJ, Raynes JG. (2015). Serum amyloid A protein binds to outer membrane protein A of gram-negative bacteria. *J Biol Chem.* 280, 18562-7.

- Hoffman JS, Benditt, EP. (1982). Changes in high density lipoprotein content following endotoxin administration in the horse: formation of serum amyloid protein-rich subfractions. *J BiolChem.* 257, 10510-7.
- Husby G, Marhaug G, Dowton B, Sletten K, Sipe J D. (1994). Serumamyloid A (AAS): biochemistry, genetics and the pathogenesis of AA amyloidosis. *Amyloid: Int J ExpClinInvest.* 1, 119-37.
- Jacobsen S, JC Jensen, S Frei, AL Jensen, MB Thoenner. (2005). Use of serum amyloid A and other acute phase reactants to monitor the inflammatory response after castration in horses: a field study. *Equine vet J.* 37, 552-556.
- Jacobsen S, PH Andersen. (2007). The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Veterinary Education.* 19, 38-46.
- Joshi KJ, Wand HC, Merchant AT, Rimm EB. (2004). Periodontal disease and biomarkers related to cardiovascular disease. *J Dent Res.* 83, 151-5.
- Loos BG. (2015). Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol.* 76, 2106-15.
- Mitchell T I, Coon CI, Brinckerhoff C E. (1991). Serumamyloid A (AAS3) produced by rabbits in vitro fibroblast treated with phorbol ester or interleukin 1 induces synthesis of collagenase and is neutralized with specific anti serum. *J ClinInvest.* 87, 1177-85.

- Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ, De Nardin E. (2001). Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol.* 72, 1221-7.
- Olsson N, Siegbahn A, Nilsson G. (1999). Serum amyloid A induces chemotaxis of human mast cells by activating a pertussis toxin-sensitive signal transduction pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 254, 143-6.
- Passamonti F, Vardi DM, Stefanetti V, Marenzoni ML, Prato S, C vese P, Coletti M, Pepe M, Casagrande Proietti P, Olea-Popelka F. (2015). *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: an assessment of the early diagnostic value of serum amyloid A and plasma fibrinogen concentrations in equine clinical practice. *Vet J.* 203(2), 211-8.
- Persson GR, Pettersson T, Ohlsson O, Renvert S. (2005). High sensitivity serum C-reactive protein levels in subjects with or without myocardial infarction or periodontitis. *J Clin Periodontol.* 32, 219-24.
- Petersen HH, JP Nielsen, PMH Heegaard. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinic chemistry. *Vet Res.* 35, 163-187.
- Preciado-Patt L, Levartowsky D, Prass M, Hershkoviz R, Lider O, Fridkin M. (1994). Inhibition of cell adhesion molecules and proteases of the extracellular matrix by peptides corresponding to serum amyloid A. *Eur J Biochem.* 223, 35-42.

- Sanchez-Teran AF, Bracamonte JL, Hendrick S, Riddell L, Musil K, Hoff B, Rubio-Martínez LM. (2016). Effect of repeated through-and-through joint lavage on serum amyloid A in synovial fluid from healthy horses. *Vet J.* 210, 30-3.
- Sandri S, Hatanaka E, Franco AG, Pedrosa AM, Monteiro HP, Campa A. (2016). Serum amyloid A induces CCL20 secretion in mononuclear cells through MAPK (p38 and ERK1/2) signaling pathways. *Immunol Lett.* 121, 22-6.
- Santos FC, Feijó LS, Kasinger S, Junior FF, Curcio BR, & Nogueira CE. (2014). Hematologic values of thoroughbred foals from birth to six months of age. *Ciência Animal Brasileira.* 15(3), 307-312.
- Sellar GC, Jordan SA, Bickmore WA, van Fantes JA, Heyningen V, Whitehead AS. (1994). The human serum amyloid A protein (AAS) superfamily gene cluster: mapping to chromosome 11p15.1 by physical and genetic linkage analysis. *Genomics.* 19, 221-7.
- Shainkin-Kestenbaum, R, Berlyne G, Zimlichman S, Sorin H R, Nyska M & Danon A. (1991). Acute phase protein, serum amyloid A, inhibits IL-1- and TNF-induced fever and hypothalamic PGE₂ in mice. *Scand J Immunol.* 34, 179-83.
- Westerman TL, Foster CM, Tornquist SJ, Poulsen KP. (2016). Evaluation of serum amyloid A and haptoglobin concentrations as prognostic indicators for horses with colic. *J Am Vet Med Assoc.* 248(8), 935-40.

Whitehead AS, DeBeer MC, Steel DM, Rits M, Lelias JM, Lane WS, DeBeer FC. (1990).

Identification of novel members of the serumamyloid A protein (AAS) superfamily as constitutive apolipo-proteins of high density lipoprotein. *J BiolChem.* 267, 3862-7.

Zimlichman S, Danon A, Nathan I, Mozes G, ShainkinKestenbaum, Koopman W J R.

(1992). Serumamyloid A, an acute phase protein, inhibits platelet activation. *J LabClinMed.* 116, 180-6.

Apéndice

Apéndice A: Artículo de publicación.

Determinación de Amiloide sérico tipo “A” en cuatro grupos de Caballos Criollos Colombianos en diferentes alturas

M. Velásquez eMV¹, BA. Fonseca MV MSc¹, DA. Dávila MV MSc², MA. Patricia DVM MSc PhD², DE. Gómez³, C. Jaramillo DVM MS^{2,4}

¹Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Corporación Universitaria Lasallista. ²Grupo de Investigación Inca-CES, Universidad CES. ³College of Veterinary Medicine, University of Florida. ⁴Ontario Veterinary College, University of Guelph. Autor para correspondencia: jaramilc@uoguelph.ca

Resumen

El amiloide sérico A (AAS) es la principal proteína de la fase aguda de la inflamación en caballos. Se determinaron y compararon los valores de amiloide sérico tipo A para cuatro grupos de equinos en diferentes edades en sangre venosa en 147 equinos de tres alturas diferentes de Antioquia y se determinó en el equipo StableLab EQ1® - Handheld Reader, además se realizaron comparaciones entre sexos y diferentes grupos etarios y se esperaba encontrar los valores de referencia. Los

grupos en los cuales se dividieron los pacientes fueron: Neonatos, potros, adultos en competencia y adultos mayores. El valor de referencia de AAS para la altura a 2100 m.s.n.m fue 13.125 µg/dL (0-32 µg/dL), para los 1800 m.s.n.m fue 19.429 µg/dL (0-80 µg/dL) y para los 1500 m.s.n.m fue 16.769 µg/dL (0-28 µg/dL); El valor de referencia de AAS para los machos CCC fue 17,941 µg/dL (0 – 32 µg/dL) y hembras CCC 14,906 µg/dL (0 – 80 µg/dL) respectivamente; El valor de referencia de AAS para los neonatos fue 18.100 µg/dL (0-30 µg/dL), para potros fue de 21.100 µg/dL (0-80 µg/dL), para adultos fue 13.316 µg/dL (0-23 µg/dL) y adultos mayores fue de 13.700 µg/dL (0-32 µg/dL); El valor de referencia para AAS fue de 19.564 µg/dL (0-80 µg/dL) y el valor de referencia para Ppt fue 19.510 g/L (57-78 g/L). Se encontró diferencia estadística significativa al comparar los diferentes grupos etarios. Se determinaron los valores de referencia para el AAS en diferentes alturas sobre el nivel del mar, se debe considerar la edad al realizar la medición de AAS.

Palabras clave: Amiloide, inflamación, potro, altura.