



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**MAESTRIA EN MEDICINA CANINA Y FELINA**

**TÍTULO:**

**Efecto del Proceso Inflamatorio sobre el Nivel Sanguíneo de Fibrinógeno y Proteína C Reactiva, en Caninos atendidos en la Clínica de Especialidades Caninas y Felinas Clinican de Cuenca-Ecuador**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCION DEL TITULO DE MAGISTER EN MEDICINA CANINA Y FELINA**

**AUTORA: MVZ. María Paz Machado Brito C.C. 0103667648**

**DIRECTORA: Dra. María Hermelinda Álvarez Herrera MSc. C.C. 0100734920**

**CUENCA, ECUADOR**

**2017**



## RESUMEN

La inflamación puede producir efectos nocivos en los tejidos participantes, es por esta razón que las proteínas de fase aguda son empleadas como respaldo de pruebas rutinarias para determinar la gravedad de enfermedades inflamatorias, su respuesta al tratamiento y en ciertos casos un posible pronóstico. **Objetivos:** Determinar los valores sanguíneos de fibrinógeno (Fb) y proteína C reactiva (PCR) en 69 caninos sin distinción de raza, edad o sexo, divididos en dos grupos: 39 caninos aparentemente sanos y 30 caninos con un cuadro inflamatorio de diversa índole, confirmado con leucograma (leucocitosis, neutrofilia y desviación a la izquierda) y evaluación clínica del paciente, para analizar el efecto de dicho cuadro inflamatorio sobre las concentraciones sanguíneas de Fb y PCR y su valor diagnóstico de inflamación. **Resultados:** Fb, PCR, neutrófilos segmentados (NS) y neutrófilos juveniles (NJ) fueron estadísticamente mayores y el recuento leucocitario (WBC) estadísticamente inferior en el grupo con inflamación comparados con el grupo control. El modelo estadístico que relacionó las variables fue altamente significativo ( $p < 0,05$ ) obteniendo un porcentaje global de capacidad diagnóstica de inflamación de 87% y porcentajes individuales de 78,3% para PCR y de 85,5% para Fb; además de una sensibilidad y especificidad de 66,7% y 87,2% para PCR y de 80% y 89,7% para Fb respectivamente. **Conclusión:** Las concentraciones de Fb y PCR, con una alta probabilidad, pueden actuar como marcadores diagnósticos de inflamación y deben ser evaluados de preferencia de manera conjunta.

**Palabras Claves:** CANINOS, INFLAMACIÓN, LEUCOGRAMA, FIBRINÓGENO, PROTEÍNA C REACTIVA, MARCADORES DIAGNÓSTICOS.



## ABSTRACT

Inflammation can produce harmful effects on the participating tissues, which is why acute phase proteins are used to support routine tests to determine the severity of inflammatory diseases; their response to treatment and in some cases a possible prognosis. **Objectives:** To determine the blood values of fibrinogen (Fb) and C-reactive protein (CRP) in 69 canines without distinction of race, age or sex, divided into two groups: 39 apparently healthy canines and 30 canines with an inflammatory process of diverse nature, confirmed with leucogram (leukocytosis, neutrophilia and deviation to the left) and clinical evaluation of the patient, to analyze the effect of this inflammatory process on blood Fb and CRP concentrations and its diagnostic value of inflammation. **Results:** Fb, CRP, segmented neutrophils (SN), and juvenile neutrophils (JN) were statistically higher and the leukocyte count (WBC) was statistically lower in the group with inflammation compared to the control group. The statistical model that related the variables was highly significant ( $p < 0.05$ ) obtaining an overall percentage of diagnostic capacity of inflammation of 87% and individual percentages of 78.3% for CRP and 85.5% for Fb; in addition to a sensitivity and specificity of 66.7% and 87.2% for PCR and 80% and 89.7% for Fb respectively. **Conclusion:** Fb and CRP concentrations, with a high probability, can act as diagnostic markers of inflammation and should preferably be evaluated together.

**Keywords:** CANINE, INFLAMMATION, LEUCOGRAM, FIBRINOGEN, C-REACTIVE PROTEIN, DIAGNOSTIC MARKERS.



## TABLA DE CONTENIDOS

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN .....  | 2  |
| ABSTRACT .....   | 3  |
| TABLA DE CONTENIDOS .....  | 4  |
| LISTA DE FIGURAS .....   | 8  |
| LISTA DE CUADROS .....   | 9  |
| LISTA DE GRÁFICOS .....  | 10 |
| ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA .....  | 11 |
| CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL .....                                    | 14 |
| CLÁUSULA DE DERECHOS DE AUTOR .....  | 15 |
| AGRADECIMIENTOS .....  | 16 |
| DEDICATORIA .....  | 17 |
| CAPITULO I: INTRODUCCIÓN .....   | 18 |
| 1.1. OBJETIVOS .....   | 22 |
| 1.1.1. Objetivo General .....  | 22 |
| 1.1.2. Objetivos Específicos .....   | 22 |
| 1.2. HIPÓTESIS .....   | 23 |
| CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....                                  | 24 |
| 2.1. INFLAMACIÓN .....   | 24 |
| 2.1.1. Historia .....  | 24 |
| 2.1.2. Concepto .....  | 30 |
| 2.1.3. Inmunidad innata: Proceso inflamatorio .....                        | 34 |
| 2.1.4. Inmunidad adquirida o adaptativa .....                              | 47 |
| 2.1.5. Fases de la inflamación .....                                       | 51 |
| 2.1.5.1. Liberación de mediadores .....                                    | 52 |
| 2.1.5.2. Efecto de los mediadores .....                                    | 52 |
| 2.1.5.3. Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio ..... | 53 |
| 2.1.5.4. Regulación de la respuesta inflamatoria .....                     | 54 |



|   |    |
|---|----|
| 2.1.5.5. Reparación. ....   | 55 |
| 2.1.6. Cambios producidos durante el proceso inflamatorio. ....                                   | 56 |
| 2.1.6.1. Cambios vasculares.....  | 56 |
| 2.1.6.1.1. Cambios del flujo y calibre vascular.....  | 56 |
| 2.1.6.1.2. Cambios de la permeabilidad vascular. ....   | 56 |
| 2.1.6.2. Cambios celulares .....  | 57 |
| 2.1.6.2.1. Marginación, rodamiento, adhesión, transmigración y quimiotaxis<br>leucocitarias. .... | 57 |
| 2.1.6.2.2. Activación leucocitaria. ....  | 58 |
| 2.1.6.2.3. Fagocitosis. ....  | 59 |
| 2.1.7. Células que intervienen en la inflamación.....   | 59 |
| 2.1.7.1. Células cebadas-mastocitos. ....   | 59 |
| 2.1.7.2. Neutrófilos. ....  | 60 |
| 2.1.7.3. Monocitos/macrófagos.....  | 60 |
| 2.1.7.4. Eosinófilos. ....  | 61 |
| 2.1.7.5. Células dendríticas. ....  | 61 |
| 2.1.7.6. Linfocitos T y B. ....   | 61 |
| 2.1.7.7. Células plasmáticas o plasmocitos.....   | 61 |
| 2.1.8. Clasificación de la inflamación. ....  | 62 |
| 2.1.8.1. Inflamación crónica. ....  | 62 |
| 2.1.8.2. Inflamación aguda.....   | 63 |
| 2.2. PROTEÍNAS DE FASE AGUDA .....  | 64 |
| 2.2.1. Generalidades. ....  | 64 |
| 2.2.2. Clasificación.....   | 66 |
| 2.2.2.1. Por el tipo de respuesta cuantitativa al estímulo.....                                   | 66 |
| 2.2.2.2. Por la función biológica que desempeñan. ....  | 66 |
| 2.2.3. Proteína C reactiva.....   | 67 |
| 2.2.3.1. Concepto y estructura. ....  | 67 |
| 2.2.3.2. Fisiología.....  | 67 |



|  |           |
|--|-----------|
| 2.2.3.3. La PCR como indicador de inflamación..... | 68        |
| 2.2.4. Fibrinógeno.....                            | 70        |
| 2.2.4.1. Concepto.....                             | 70        |
| 2.2.4.2. Estructura y fisiología.....              | 72        |
| 2.2.4.3. Uso diagnóstico.....                      | 73        |
| <b>CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>    | <b>75</b> |
| 3.1. MATERIALES.....                               | 75        |
| 3.1.1. Lugar de la investigación.....              | 75        |
| 3.1.2. Período de la investigación.....            | 75        |
| 3.1.3. Recursos.....                               | 76        |
| 3.1.3.1. Animales.....                             | 76        |
| 3.1.3.2. Biológicos.....                           | 76        |
| 3.1.3.3. Físicos.....                              | 76        |
| 3.1.3.4. Químicos.....                             | 77        |
| 3.1.4. Universo.....                               | 77        |
| 3.1.5. Muestra.....                                | 77        |
| 3.1.5.1. Criterios de inclusión.....               | 78        |
| 3.1.5.2. Criterios de exclusión.....               | 79        |
| 3.2. MÉTODOS.....                                  | 80        |
| 3.2.1. Tipo de estudio.....                        | 80        |
| 3.2.2. Variables estudiadas.....                   | 80        |
| 3.2.2.1. Variable independiente.....               | 80        |
| 3.2.2.2. Variables dependientes.....               | 80        |
| 3.2.3. Muestreo.....                               | 80        |
| 3.2.4. Técnicas y procedimientos.....              | 82        |
| 3.2.4.1. Valoración clínica.....                   | 82        |
| 3.2.4.2. Leucograma manual.....                    | 82        |
| 3.2.4.2.1. Toma de muestra.....                    | 82        |
| 3.2.4.2.2. Técnica.....                            | 83        |



|   |     |
|---|-----|
| 3.2.4.2.2.1. Recuento total de glóbulos blancos (WBC).....                        | 83  |
| 3.2.4.2.2.2. Recuento diferencial de glóbulos blancos (Fórmula leucocitaria)..... | 84  |
| 3.2.4.3. Medición de fibrinógeno.....   | 86  |
| 3.2.4.3.1. Toma de muestra.....   | 86  |
| 3.2.4.3.2. Método de Von Clauss.....  | 87  |
| 3.2.4.4. Medición de PCR.....   | 90  |
| 3.2.4.4.1. Toma de muestra.....   | 90  |
| 3.2.4.4.2. Método PCR-Turbilátex.....   | 90  |
| 3.2.5. Análisis estadístico.....  | 93  |
| CAPITULO IV: RESULTADOS .....   | 96  |
| 4.1. ESTIMACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO .....                                       | 111 |
| CAPITULO V: DISCUSIÓN .....   | 121 |
| CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....                                 | 126 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 129 |
| ANEXOS .....  | 137 |



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Proceso inflamatorio restaurando la homeostasis según la causa desencadenante.....  | 34 |
| <b>Figura 2:</b> Los tres principales mecanismos mediante los cuales el organismo animal se defiende frente a la invasión microbiana.....  | 35 |
| <b>Figura 3:</b> Una vía inflamatoria genérica incluye, secuencialmente, inductores, sensores, mediadores y efectores.....   | 37 |
| <b>Figura 4:</b> Principales mecanismos a través de los cuales las células de la inmunidad innata reconocen, mediante receptores, a los microorganismos, a sus productos o a los mediadores producidos a lo largo de la reacción inflamatoria..... | 39 |
| <b>Figura 5:</b> Cambios producidos durante la respuesta de fase aguda .....   | 64 |
| <b>Figura 6:</b> Producción de proteínas de fase aguda a partir del foco de la lesión.....   | 65 |
| <b>Figura 7:</b> Clasificación de las proteínas de fase aguda según la respuesta cuantitativa.....   | 66 |
| <b>Figura 8:</b> Cascada de coagulación de proteínas.....  | 71 |
| <b>Figura 9:</b> Molécula de fibrinógeno humana .....  | 72 |



## LISTA DE CUADROS

|   |     |
|---|-----|
| <b>CUADRO # 1:</b> Distribución de la muestra en los grupos control y con inflamación.....                                | 96  |
| <b>CUADRO # 2:</b> Distribución de la muestra según edad.....   | 97  |
| <b>CUADRO # 3:</b> Distribución de la muestra según raza.....   | 98  |
| <b>CUADRO # 4:</b> Distribución de la muestra según sexo.....   | 99  |
| <b>CUADRO # 5:</b> Distribución de la muestra en rangos de WBC.....   | 100 |
| <b>CUADRO # 6:</b> Distribución de la muestra en rangos de NS.....  | 102 |
| <b>CUADRO # 7:</b> Distribución de la muestra en rangos de NJ.....  | 104 |
| <b>CUADRO # 8:</b> Distribución de la muestra vs concentración de Fb.....   | 106 |
| <b>CUADRO # 9:</b> Distribución de la muestra vs concentración de PCR.....  | 108 |
| <b>CUADRO # 10:</b> Estadísticos descriptivos para las variables Fb y PCR según los grupos control y con inflamación..... | 110 |
| <b>CUADRO # 11:</b> Casos observados y pronosticados para PCR.....  | 117 |
| <b>CUADRO # 12:</b> Casos observados y pronosticados para Fb.....   | 118 |
| <b>CUADRO # 13:</b> Casos observados y pronosticados para Fb y PCR en conjunto.....                                       | 119 |



## LISTA DE GRÁFICOS

|   |     |
|---|-----|
| <b>GRÁFICO # 1:</b> Box Plot para WBC.....                                  | 101 |
| <b>GRÁFICO # 2:</b> Box Plot para NS.....                                   | 103 |
| <b>GRÁFICO # 3:</b> Box Plot para NJ.....                                   | 105 |
| <b>GRÁFICO # 4:</b> Dot Plot para Fb.....                                   | 107 |
| <b>GRÁFICO # 5:</b> Dot Plot para PCR.....                                  | 109 |
| <b>GRÁFICO # 6:</b> Casos observados y pronosticados según el modelo 2..... | 113 |
| <b>GRÁFICO # 7:</b> Casos observados y pronosticados según el modelo 3..... | 114 |
| <b>GRÁFICO # 8:</b> Casos observados y pronosticados según el modelo 4..... | 115 |



## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

(Fb) Fibrinógeno.

(PCR) Proteína C reactiva.

(NS) Neutrófilos segmentados.

(NJ) Neutrófilos juveniles.

(WBC) Recuento leucocitario (siglas en inglés de “White Blood Cells”).

(IL) Interleucina.

(TNF- $\alpha$ ) Factor de necrosis tumoral alfa.

(RI) Respuesta inmune.

(II) Inmunidad innata.

(NK) Natural killer.

(IA) Inmunidad adquirida.

(Ag) Antígeno.

(Ac) Anticuerpo.

(RII) Respuesta inmunitaria innata.

(RIA) Respuesta inmunitaria adquirida.

(SRIS) Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

(IFN) Interferón.

(PMAP) Patrones moleculares asociados a patógenos.



(RRP) Receptores de reconocimiento de patrones.

(PMAD) Patrones moleculares asociados a daños.

(SI) Sistema inmune.

(CSF) Factor estimulador de colonias.

(TGF) Factor transformador de crecimiento.

(CMH) Complejo mayor de histocompatibilidad.

(ROI) Radicales intermedios de oxígeno.

(RNI) Radicales intermedios de nitrógeno.

(NO) Óxido nítrico.

(Ig) Inmunoglobulina.

(PG) Prostaglandina.

(LT) Leucotrieno.

(PAF) Factor activador de plaquetas.

(CD) Células dendríticas.

(CPA) Células presentadoras de antígenos.

(RLT) Receptor del linfocito T.

(RLB) Receptor del linfocito B.

(H1) Histamina 1.

(ECF-A) Factor quimiotáctico de eosinófilos para anafilaxia.

(NCF) Factor quimiotáctico de neutrófilos.



(PFA) Proteínas de fase aguda.

(SNC) Sistema nervioso central.

(SNA) Sistema nervioso autónomo.

(MAIC) Moléculas de adhesión intercelular.

(FA) Fosfatasa alcalina.

(kDa) Kilodalton.

(VSG) Velocidad de eritrosedimentación.

(PCRus) Proteína C reactiva ultrasensible.

(FT) Factor tisular.

(ul) Microlitro.

(AINES) Antiinflamatorios no esteroideos.

(EDTA) Ácido etilendiaminotetraacético.

(MA) Amplitud máxima.

(TEG) Tromboelastografía.

(HAC) Hiperadrenocortisismo.



## CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Yo María Paz Machado Brito, autora del trabajo de tesis con el título **“Efecto del Proceso Inflamatorio sobre el Nivel Sanguíneo de Fibrinógeno y Proteína C Reactiva, en Caninos atendidos en la Clínica de Especialidades Caninas y Felinas Clinican de Cuenca-Ecuador”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación, son de mi exclusiva responsabilidad.

Cuenca, 25 de abril de 2017

A handwritten signature in blue ink, reading 'María Paz Machado Brito', written over a horizontal dashed line.

María Paz Machado Brito

C.C. 0103667648



## CLÁUSULA DE DERECHOS DE AUTOR

Yo María Paz Machado Brito, autora del trabajo de tesis con el título **“Efecto del Proceso Inflamatorio sobre el Nivel Sanguíneo de Fibrinógeno y Proteína C Reactiva, en Caninos atendidos en la Clínica de Especialidades Caninas y Felinas Clínicas de Cuenca-Ecuador”**, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art.5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser esto un requisito para la obtención de mi título de **MAGISTER EN MEDICINA CANINA Y FELINA**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciera de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 25 de abril de 2017

-----  
María Paz Machado Brito

C.C. 0103667648



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mis padres, por haber sido guía de vida y ejemplo óptimo en mi formación como ser humano con valores y principios indispensables en la práctica del vivir de acuerdo con las leyes espirituales. A mi esposo, por el apoyo incondicional y la confianza en mi superación personal y profesional. A la Dra. María Álvarez Herrera, por su indispensable guía y gran sabiduría durante todo el proceso de elaboración del trabajo de investigación. Al grupo de trabajo del Laboratorio Clínico JJPAZ, por su eficiente labor en los procesos de medición de las proteínas de estudio. Por último y de manera especial a los doctores Fredi Carpio y Jenny Idrovo, propietarios de la Clínica de Especialidades Caninas y Felinas “Clinican”, por la apertura y el espacio para el desarrollo de la metodología y recolección de datos.

Paz



## DEDICATORIA

Dedicado a mis hijos David y Felipe, quienes con su llegada a este mundo, iluminaron mi camino de lucha hacia un futuro mejor y motivaron en mi ser un deseo ferviente de cumplir grandes metas para así enseñarles que la confianza en uno mismo es el pilar central del éxito y para demostrarles que se puede alcanzar lo inalcanzable.

Paz



## CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

El proceso inflamatorio, a más de ser un mecanismo inherente al organismo y de defensa ante agentes patógenos externos e internos, desencadena una serie de procesos de carácter lesivo que son en muchos de los casos, la causa primaria de la enfermedad como en las patologías de base alérgica o autoinmune (Farreras & Rozman, 2012). La inflamación puede transformarse en un proceso agudo y generalizado que produce gran malestar, fiebre y alteración del nivel de proteínas y leucocitos en sangre y en algunos casos, se considera peligrosa y fuera de control a tal punto, que puede llegar a producir disfunción multiorgánica y la muerte del individuo (García, 2008). Es por esta razón, que en los últimos años se han buscado las herramientas necesarias para mejorar las técnicas de diagnóstico y pronóstico de las enfermedades que cursan con inflamación.

Las proteínas de fase aguda positivas, llamadas así por ser reactivas e incrementar sus niveles plasmáticos principalmente como parte de la defensa innata en un proceso conocido como respuesta de fase aguda (Tecles, Spiranelli, Bonfanti, Cerón & Paltrinieri, 2005), han sido utilizadas ampliamente en medicina humana y son de gran utilidad en ramas como la pediatría, cardiología, oncología y cuidados intensivos para determinar la gravedad de un sinnúmero de patologías inflamatorias, el nivel de daño que estas producen en los tejidos, para reconocer y reducir el impacto de las injurias que se generan como parte del proceso (Muñoz, 1995), para analizar la respuesta que se obtiene con el tratamiento utilizado y para establecer el tiempo en el que se espera que el problema sea resuelto. Bajo la misma necesidad, en medicina veterinaria



también se requiere establecer si una reacción inflamatoria es excesiva o inadecuada, para lo cual se pueden emplear de igual manera, técnicas que ayuden a descifrar el mecanismo inflamatorio y sus complicaciones. Así, la medición de estas proteínas de fase aguda que hasta el momento han sido estudiadas pero muy poco utilizadas en el diagnóstico clínico de este campo de las ciencias médicas, podrían adquirir un papel esencial en dicho proceso.

Siendo el fibrinógeno parte de la cascada de la coagulación (fenómeno indispensable y recíprocamente relacionado con la reacción inflamatoria), se considera como una de dichas proteínas de fase aguda en este caso positiva, pues incrementa sus niveles al participar en la hemostasia, que a su vez, se produce como un mecanismo de defensa ante las lesiones tisulares y sus consecuentes hemorragias, procesos que dan inicio al mecanismo inflamatorio (Quesada, 2013). Es una proteína que ha sido utilizada mucho antes que otras como la haptoglobina, ceruloplasmina o PCR (Martínez, Tecles, Parra & Cerón, 2001; Tecles, *et al.*, 2005) y que junto con el leucograma, han sido las técnicas más empleadas en los laboratorios para el diagnóstico clínico de procesos inflamatorios (Muñoz, 1995).

La PCR, fue descubierta en el año de 1930 por Tillet & Francis, nombrada en el año de 1941 y posteriormente relacionada con las etapas agudas de numerosas situaciones clínicas que van acompañadas con un aumento de su concentración sérica; sin embargo, en la década de los cincuenta y hasta los años setenta, la prueba de esta proteína fue perdiendo validez, pues al ser únicamente cualitativa, sólo podía determinar su presencia o ausencia más no su nivel sérico que podía ser relacionado con la gravedad de la enfermedad. Pero en la década de los ochenta, se logró caracterizarla y cuantificarla en humanos demostrando, a través de varios estudios, el valor



de su medición y su relación con la gravedad del proceso inflamatorio. Dichos estudios realizados en humanos y posteriormente y de manera escasa en animales, sugieren que es la proteína de fase aguda de mayor utilidad en el diagnóstico de enfermedades de índole inflamatorio, infeccioso y neoplásico en el ser humano, perro, conejo y cerdo. En 1991 se logró aislar y caracterizar la PCR del canino y se determinó que presenta varias semejanzas con la PCR humana, de esta manera se pudiese valorar su comportamiento con los avances en el estudio de la proteína de la otra especie y viceversa (Muñoz, 1995).

Numerosos estudios respaldan al fibrinógeno como marcador diagnóstico y pronóstico principalmente en enfermedades cardiovasculares en las que el fenómeno de la coagulación juega un papel fundamental (Arnau, Rueda, Martínez, Osa, Almenar, Morillas, Osa, Quesada, Sanjuán & Palencia, 2002), y a pesar de que los estudios sobre esta proteína se encuentran mucho más avanzados que los de la PCR en humanos y caninos y ha sido utilizada con mayor frecuencia a lo largo de la historia desde su descubrimiento, no se considera reactiva al mismo nivel que la PCR (Muñoz, 1995).

Tomando en consideración que las investigaciones sobre la PCR humana han avanzado mucho más con respecto a las de la PCR canina, no existen suficientes estudios concretos que certifiquen que esta proteína puede ser empleada con total confianza en el diagnóstico clínico en caninos, así como lo ha sido en medicina humana, e incluso en esta última, a pesar de que existen muchos estudios que demuestran su valor diagnóstico, existen muy pocos que respaldan su valor pronóstico y muchos otros que sugieren que no tiene validez en el pronóstico de enfermedades



inflamatorias e infecciosas agudas. Existen pocos estudios en animales que indican el valor de esta proteína como marcador de gravedad (de Mingo, 2011).

La PCR es una de las proteínas de fase aguda más importantes, utilizada como marcador de inflamación en humanos, pero no en medicina veterinaria (Boal & Carreira, 2015). Varios estudios sugieren que es un marcador útil de inflamación en perros, pero el nivel de evidencia es limitado y los estudios sobre el tema están todos afectados por considerables riesgos de sesgo. Por lo tanto, se necesitan más estudios para confirmar las suposiciones de estudios previos y aumentar el nivel de evidencia de PCR como un marcador útil para detectar inflamación en caninos (Christensen, Eriksen & Kjelgaard-Hansen, 2015).

Dentro de las pruebas de laboratorio de diagnóstico de especies menores, el análisis de estas proteínas de fase aguda reactivas junto con el leucograma y signología clínica, podrían ser una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico y pronóstico de procesos inflamatorios, que en muchas ocasiones al volverse sistémicos, ponen en riesgo la vida del animal. La importancia de contar con dichas técnicas diagnósticas en caninos, radica en el hecho de que cada vez un mayor número de personas alrededor del mundo, considera al canino como otro miembro de la familia en lugar de una propiedad, lo que hace que el propietario se preocupe más por mantener el bienestar de su mascota a tal punto que exigirá que se tomen las medidas necesarias y se apliquen los mejores protocolos médicos que procuren su pronta recuperación en caso de enfermedad. Las pruebas de medición de dichas proteínas son altamente confiables, se encuentran al alcance económico de los propietarios de los canes de compañía y se ofrecen en la mayoría de laboratorios de la ciudad de Cuenca.



## **1.1. OBJETIVOS**

### **1.1.1. Objetivo General.**

Determinar el efecto del cuadro inflamatorio sobre los niveles sanguíneos de fibrinógeno y proteína C reactiva y su valor diagnóstico de inflamación en caninos atendidos en la Clínica de Especialidades Caninas y Felinas CLINICAN de Cuenca-Ecuador.

### **1.1.2. Objetivos Específicos.**

1.1.2.1. Analizar los valores de recuento leucocitario, neutrófilos segmentados, neutrófilos juveniles, fibrinógeno y PCR obtenidos tanto en el grupo control como en el grupo con inflamación.

1.1.2.2. Determinar si el nivel sérico de PCR y el nivel plasmático de fibrinógeno incrementan o se mantienen en su nivel de referencia en caninos que presentan un cuadro inflamatorio, mediante su medición a las 12 horas posteriores al ingreso del paciente.

1.1.2.3. Determinar si las concentraciones sanguíneas de fibrinógeno y PCR pueden ser empleadas, de manera conjunta, como marcadores diagnósticos de inflamación.

1.1.2.4. Determinar si la capacidad diagnóstica de inflamación de la PCR es mayor a la del fibrinógeno en caninos y viceversa.



## 1.2. HIPÓTESIS

Los niveles sanguíneos de fibrinógeno y proteína C reactiva incrementan con el cuadro inflamatorio a las 12 horas del ingreso del paciente y tienen un valor diagnóstico de inflamación en caninos atendidos en la Clínica de Especialidades Caninas y Felinas CLINICAN de Cuenca-Ecuador.



## CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. INFLAMACIÓN

#### 2.1.1. Historia.

“La perspectiva histórica indica que el progreso científico no es continuo, y que la ciencia está influida por la personalidad de quienes la hacen avanzar” (García, 2008, p. 92). Es necesario repasar los acontecimientos importantes, a lo largo de la historia, sobre el estudio de la inflamación y las diferentes perspectivas que llevaron a descubrir este fenómeno tal y como lo conocemos hoy en día (García, 2008). Si bien, en la antigua Mesopotamia se describieron, en el código de Hammurabi, técnicas para tratar abscesos oculares y en los antiguos papiros egipcios como el de Edwin Smith, ya se habló del pus como un mal que venía del exterior; el primer conocimiento real sobre este universal proceso, se describe en la antigua Grecia con el nombre de “Flogosis”, siendo esta cultura pionera en la historia del estudio de la inflamación (Bullón, 1983; García, 2008).

Fue Hipócrates de Cos, el médico griego, quien utilizó por primera vez las palabras “flogosis”, “edema”, “erisipela” y el sufijo “itis” para referirse al proceso inflamatorio. El *corpus hippocraticum*, como se conoce su filosofía, describe la “flogosis” acercándose al concepto actual de la inflamación y describiéndola como el inicio del proceso curativo, que poseía dos signos importantes: rubor y calor; de los cuales, el calor se consideró como el principal signo y



de ahí su relación con la palabra flogosis, que en griego significa calor o llama (Bullón, 1983; García, 2008). La palabra flogosis se sustituye en la época romana por “inflammatio” o inflamable, pero su uso todavía persiste hasta la actualidad en ciertas expresiones médicas como “agente flogógeno”, que define a todo aquel agente capaz de producir una reacción inflamatoria (Bullón, 1983). El escritor romano, Aurelio Cornelio Celso, careciendo de instrucción médica previa, determinó que los signos cardinales de la inflamación debían ser: rubor, tumor, calor y dolor, a los que Galeno de Pérgamo, añadió *functio laesa*, considerada como un desajuste del equilibrio de los humores vitales: sangre, flema, bilis y bilis negra (*sanguis, pituita, chole y melaine chole*). Para Galeno, el pus (*pus laudable*) no era perjudicial si se facilitaba su salida mediante punción y advirtió sobre la extravasación sanguínea a los tejidos y sobre cicatrices patológicas formadas por efectos del frío sobre edemas inflamatorios (García, 2008).

A pesar de que el tiempo transcurre de manera extensa hasta la invención del microscopio, la teoría inicial del proceso inflamatorio no sufre ningún cambio debido a la certeza con la que los científicos griegos y romanos definieron el fenómeno en base a su correcta observación (Bullón, 1983). Con la invención del microscopio por el científico holandés Zacharias Janssen en 1595 y más tarde con Antoni van Leeuwenhoek, se inició el estudio celular del proceso inflamatorio ya que éste último construyó en 1719, un microscopio con resolución suficiente para observar hematíes moviéndose en pequeños vasos sanguíneos (García, 2008).

El médico Hermann Boerhaave (1668-1738), pudo observar en el microscopio que en un proceso inflamatorio, los vasos sanguíneos más pequeños parecían demasiado angostos para transportar células, por lo que generaban calor por la fricción producida y eran los causantes del



incremento de la presión por acumulación de sangre en el sitio. Más tarde su discípulo, Hieronymus D. Gaubius, concluyó que la inflamación iniciaba el proceso de coagulación sanguínea (Bullón, 1983; García, 2008). Los científicos alemanes Hoffman (1660-1742) y Stahl (1660-1734), jugaron un papel importante con sus explícitas y certeras hipótesis; el primero explicó la inflamación como una dificultad circulatoria y determinó que las pulsaciones focales se debían al aumento de la diástole arterial y el segundo interpretó la inflamación como una reacción del organismo, habló de hiperemia activa y aclaró que el papel del médico se reducía a estimular el flujo local de los humores (Bullón, 1983).

El inglés Jonh Hunter, en 1796 reveló su obra “Treatise of the blood, inflamation and gun-shot wounds” e hizo varios experimentos de comparación entre sangre de un proceso inflamatorio y sangre libre de inflamación (Aziz, Camacho & Fernández, 2006). En 1824, René Dutrochet descubrió el primer indicio de células inflamatorias al observar grupos de corpúsculos sanguíneos moverse lentamente en el espacio claro entre el torrente circulatorio y la pared del vaso con una marcada diferencia de movimiento; además, propuso teorías de que la pared del vaso contaba con orificios para el paso de células hacia los tejidos (transmigración leucocitaria). Rudolf Wagner, aparece en 1839 con la descripción formal del rodamiento leucocitario que explica el movimiento ralentizado de las células blancas en dicho espacio entre la circulación y la pared del vaso, esta última llena de fibras paralelas. En 1871 Rudolf R.C. Virchow, confirmó esta teoría y añadió que dichos leucocitos podían pegarse momentáneamente a la pared del vaso y volver a entrar en el torrente circulatorio. El observó la transmigración leucocitaria adjudicándole un papel netamente nutritivo y no inflamatorio (García, 2008).



En la década de 1840, Willian Addison y Augustus V. Waller, explicaron oficialmente la transmigración de glóbulos blancos que hasta entonces había pasado desapercibida en los ensayos anteriores, la diapédesis de eritrocitos en la inflamación secundaria a traumatismos y descubrieron que el material piógeno estaba formado por leucocitos físico-químicamente alterados. A todo esto, fue poco lo que Conheim pudo agregar, pero sus descubrimientos tuvieron mayor validez científica por haber sido amparados por la escuela del profesor Virchow (Bullón, 1983; García, 2008). Ilya I. Metchnikoff (1845-1916), discípulo de Louis Pasteur y jefe de laboratorio de Microbiología Morfológica, señaló que “la acumulación de células en la vecindad de la lesión constituye una clase de defensa natural para el organismo” (García, 2008, p. 93) y Julius Cohnheim (1839-1884) en 1877, explicó detalladamente la cascada leucocitaria y la transmigración con las siguientes palabras: “Primero, en una vena con marginación típica de las células blancas, uno ve un borde punteado en la pared externa del vaso. Estas se mueven más allá, hacia el exterior del vaso al que se conectan mediante un fino tallo. Finalmente, este tallo se desvanece y ahora, la célula blanca aparece como un corpúsculo brillante apenas coloreado, contráctil, situado completamente fuera del vaso” (García, 2008, p. 93) (Brown, 1995; García, 2008; Iglesias, Siachoque, Pons, Restrepo, Quintana & Gómez, 2009).

Max J. S. Schultze (1825-1874), observó que los leucocitos no eran células iguales siempre, sino que existían diferentes tipos de ellas. Este concepto se detalló aún más con Ilya Metchnikoff, quien a partir del conocimiento de Virchow, Robin y Davaine, comprobó por ejemplo, que había partículas que penetraban en los leucocitos (fagocitosis). Este y otros detalles más, le permitieron clasificar a los leucocitos en: linfocitos, monocitos-macrófagos y granulocitos; además, definió a los mastocitos y células plasmáticas como células inflamatorias y



diferenció los eosinófilos de los neutrófilos. Por todo su trabajo, Ilya ganó el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1908 compartiéndolo con Paul Ehrlich (1854-1915), gracias a quien se fundó la Escuela Humoral de la Inmunidad debido a sus estudios sobre anticuerpos y sobre el sistema de complemento sérico. Metchnikoff fue considerado, en base a sus trabajos, como el padre de la Inmunología en aquella época en la que el concepto de inmunidad apenas comenzó a difundirse (García, 2008; Iglesias, *et al.*, 2009).

En 1903, Nicolás M. Arthus prueba con una inyección intradérmica de antígenos *in vivo*, conocida como “la reacción de Arthus”. En 1927, Harold A. Abrahamson, observó los cambios inflamatorios de la estructura biofísica de la membrana de los leucocitos y en ese mismo año, Thomas Lewis, determinó que la histamina y otras sustancias incrementan la permeabilidad vascular, facilitando la trans migración leucocitaria e iniciando así, el conocimiento sobre los mediadores químicos de la inflamación. En 1929, Henry H. Dale incluye la función química dentro del proceso inflamatorio, reconociendo a la histamina como la principal sustancia implicada. Luego fueron descubiertas la serotonina y la bradiquinina (Arias, 2005; García, 2008). En 1935, aparece la cámara que permite observar el proceso de adhesión y trans migración de leucocitos *in vivo* creada por Eliot R. Clark. Entre 1937 y 1974, ya se consideró a la inflamación como un proceso necesario para el organismo y de este hecho dependía el comportamiento del médico frente al paciente; además al tratarse de un mecanismo inherente a los tejidos injuriados, resulta ser lo más conveniente desde el punto de vista biológico (García, 2008).

En 1938, Vejlens observó y estudió detenidamente la adhesión y rodamiento leucocitarios en vasos mesentéricos. Entre 1960 y 1964, V. T. Marchesi, H. W. Florey y J. L. Gowan



estudiaron las interacciones, durante la transmigración, entre leucocitos y células endoteliales. Entre 1967 y 1973, A.J. Goldman, A. Atherton y G. V. R. Born, realizaron estudios sobre el comportamiento hidrodinámico del proceso inflamatorio. En 1973, Eric A. Jaffe y colaboradores, fueron pioneros del descubrimiento y estudio de las moléculas de adhesión entre leucocitos y células endoteliales. En 1976, H. B. Stamper y J.J. Woodruff, elaboraron un ensayo *in vitro* de la adhesión leucocitaria bajo la influencia de estrés por cizallamiento circulatorio. En 1982, se otorga el Premio Nobel de Fisiología o Medicina a Sune K. Bergström, Bengt I. Samuelson y John R. Vane, por sus estudios sobre las prostaglandinas. En general, en la década de los 80`s ya se estableció la función de las citoquinas inflamatorias interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), como activadores del endotelio vascular, potenciadores de la adhesión de los leucocitos y por la identificación de las moléculas de adhesión: selectinas e integrinas. En 1998, otro Premio Nobel fue otorgado a Robert Furchgott, Louis Ignarro y Ferid Murad por sus estudios sobre el óxido nítrico (García, 2008).

En cuanto a la inmunología veterinaria, en 1754, surge el primer intento de vacuna al ganado bovino, ya que grandes cantidades de animales enfermaban y morían debido a los brotes de peste bovina que habían sido frecuentes desde el siglo IX en Europa occidental. La técnica consistía en mojar una cuerda con las secreciones nasales de un animal enfermo, e introducirlo en un pequeño corte en la papada del animal que se quería vacunar, resultando una infección más leve que la original y dejando al animal totalmente protegido de la enfermedad gracias a la Respuesta Inmunitaria (RI). En 1798, el médico inglés Edward Jenner, pudo probar que se podían reemplazar las costras utilizadas para la vacuna contra la viruela humana, por el material de las lesiones de viruela bovina, y debido a que esta enfermedad animal no producía



enfermedad grave en los humanos, se pudo al fin vacunar (del latín *vacca*) eficazmente, logrando en 1970 erradicar la viruela del mundo. A partir de este hecho, se iniciaron nuevos experimentos para intentar prevenir otras enfermedades de origen animal: la viruela ovina (ovinación), la pleuroneumonía bovina y el moquillo canino. En 1879, Louis Pasteur descubre como inmunizar aves contra el cólera aviar producido por la bacteria *Pasteurella multocida*, en 1882 contra el carbunco (*Bacillus anthracis*) y posteriormente contra la rabia de manera eficaz. Daniel Salmon y Theobald Smith, demostraron en EEUU que también podían utilizarse microorganismos muertos para producir vacunas, realizando experimentos con las bacterias inactivadas del cólera porcino (*Salmonella enterica cholerasuis*) para proteger a las palomas de la enfermedad producida por el mismo organismo. Luego Emil Von Bhering y Shibasaburo Kitasato en Alemania, demostraron que la toxina del bacilo *Clostridium tetani*, podía proteger a los animales contra el tétanos, aún si el filtrado del cultivo no tuviese bacterias. Desde 1900 hacia la actualidad, han existido numerosos avances en la inmunología de las especies de interés veterinario, aunque todavía queda mucho por investigar (Tizard, 2009).

### 2.1.2. Concepto.

Para entender el concepto general del proceso inflamatorio y las bases orgánicas que lo controlan, es necesario hablar de inmunidad. Como parte del instinto de supervivencia de los animales y el hombre, existe un proceso inherente a su existencia, que es su defensa ante agentes patógenos medioambientales tanto de naturaleza biológica (virus, bacterias, hongos, parásitos), como físico-química (radiaciones, contaminantes químicos, etc.), que se encuentran en casi todos



los espacios del planeta, pero además de estos agentes externos, hay que considerar los posibles agentes internos nocivos como por ejemplo las células neoplásicas, que pueden también inducir dicha reacción (Farreras & Rozman, 2012). Debido a que la resistencia eficaz a la infección es esencial, el organismo no puede disponer de un solo mecanismo de defensa, sino que depende de varios mecanismos interrelacionados para que esta defensa sea efectiva y segura (Tizard, 2009).

Este proceso de activación de mecanismos está organizado en dos partes esenciales para su efecto: inmunidad natural, innata, no adaptativa o inespecífica e inmunidad específica, adaptativa o adquirida. La primera es la que desencadena el proceso inflamatorio inicial, que se define como inespecífico y del cual se habla en la presente investigación. Esta inmunidad innata (II) está conformada por barreras cutáneo-mucosas y sus secreciones, elementos moleculares como: proteínas de fase aguda (PCR, fibrinógeno), sistema de complemento, colectinas, defensinas, interferones y otras citocinas, y elementos celulares como: células fagocíticas mononucleares y polimorfonucleares (primera línea de defensa), células dendríticas, células proinflamatorias (mastocito) y células citotóxicas Natural Killer (NK). La segunda, que es la inmunidad adquirida (IA), actúa de manera interconectada con la primera potenciando su acción. Es la que define el concepto de inmunidad, ya que cuenta con células y moléculas extraordinariamente específicas para las innumerables sustancias derivadas de los agentes patógenos ambientales existentes. Su base anatómico-funcional se encuentra en los linfocitos, los cuales, disponen de un mecanismo de reordenación genética único y privativo, el cual, a través de su desarrollo somático, les permite adquirir receptores distribuidos de manera clonal (clonotípicos), específicos para cada una de dichas sustancias llamadas antígenos (Ag) del medio ambiente (Farreras & Rozman, 2012).



La respuesta inmune inicia con la unión de los linfocitos y sus receptores al Ag presentado por células dendríticas de la II, pero tardan algunos días en multiplicarse e incrementar su número, sufriendo además cambios madurativos que, en algunos linfocitos, promueve la liberación de moléculas específicas para el Ag que los estimuló, que son los anticuerpos (Ac), en otros estimula una actividad citolítica contra los propios linfocitos que se han unido en primera instancia al Ag, y en otro tipo, la liberación de factores que incrementan la actividad fagocitaria. Este proceso de maduración y multiplicación, es conocido como respuesta primaria, y conduce a que los linfocitos se conviertan en células “memoria”, las cuales, al exponerse por segunda ocasión al mismo Ag, actuarán de manera más rápida y efectiva, siendo esta última la llamada respuesta secundaria. A su vez, la unión Ag-Ac actúa como palanca para desencadenar nuevamente la cascada de los mecanismos inflamatorios inespecíficos, a partir de la activación del complemento y la potenciación de la fagocitosis y las citocinas producidas por los linfocitos T, estimulando e inhibiendo los mecanismos efectores de la Respuesta Inmunitaria Innata (RII) y permitiendo que estos dos procesos se interconecten y trabajen conjuntamente en la defensa del organismo (Farreras & Rozman, 2012).

Pero contar con estos dos mecanismos: específicos (linfocitos) e inespecíficos (complemento, células fagocíticas y células inflamatorias), no siempre resulta como se espera, pues en ocasiones, los mecanismos inflamatorios pueden producir un gran poder lesivo y ser en muchos de los casos, la causa primaria de la enfermedad, como ocurre en las alergias, en las que la respuesta inmune está dirigida hacia factores medioambientales no infecciosos ni tóxicos. Otra situación de interés en la medicina ocurre cuando los linfocitos a lo largo de su vida no llegan a adquirir la capacidad de diferenciar entre agentes patógenos y los componentes del propio



organismo, convirtiéndose estos últimos en dianas del sistema inmunológico y blancos de las lesiones subsiguientes al proceso inflamatorio, habiendo descrito las variadas formas de enfermedades autoinmunes en esencia (Farreras & Rozman, 2012).

Con estos antecedentes, se puede decir que la inflamación es un conjunto de mecanismos celulares, humorales y vasculares, que actúan como parte fundamental de la activación y ejecución de la inmunidad innata y que se mantienen durante la inmunidad adaptativa, para proteger al organismo y luchar contra cualquier agresión física, química o biológica (agente infeccioso o su toxina) (Geffner & Fainboim, 2005; Farreras & Rozman, 2012). Es la respuesta inmunológica de un organismo, que aunque dolorosa, es reparadora y demanda un enorme gasto de energía metabólica (García, 2008). Todos sus procesos tienen como objetivo limitar el daño producido por los patógenos, eliminar tejido dañado y generar tejido sano (Martínez, *et al.*, 2001), pero este proceso no siempre tiene un único efecto reparador, como se ha mencionado anteriormente, ya que en ciertas ocasiones se vuelve crónico y degenerativo como en la artritis, arterioesclerosis o incluso en el cáncer; y en otras ocasiones produce una reacción sistémica, generalizada, pero pasajera, que puede haber partido de una afección local, llamada Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS) o inflamación aguda y que produce malestar general, fiebre y alteración del nivel de proteínas y leucocitos en sangre. La inflamación se considera peligrosa cuando se inicia una cadena de reacciones sin control o “inflamación maligna”, que puede terminar produciendo disfunción multiorgánica y la muerte del individuo (García, 2008).

“La inflamación, aunque en principio representa un proceso universal e inespecífico encaminado a restaurar la homeostasis disturbada, puede elegir, según la causa desencadenante, diferentes escenarios de actuación para conseguir resultados determinados” (García, 2008, p. 91).

**Figura 1:** Proceso inflamatorio restaurando la homeostasis según la causa desencadenante.



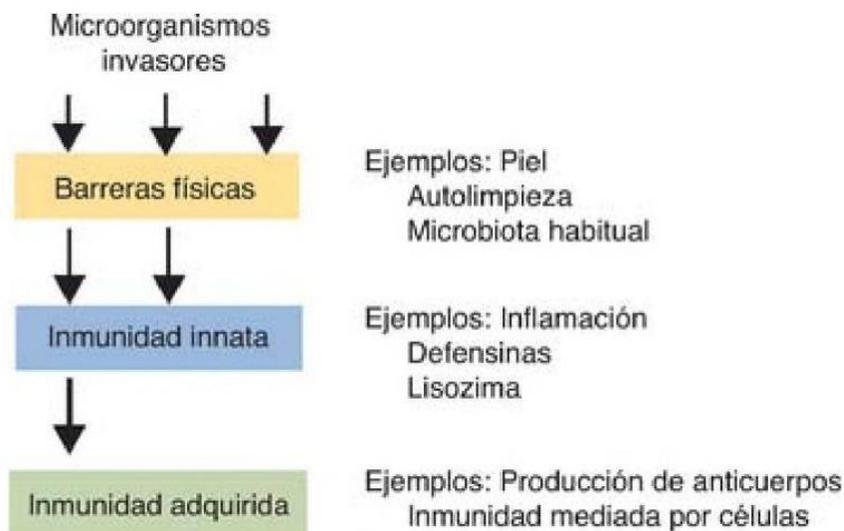
**Fuente:** García, 2008.

### 2.1.3. Inmunidad innata: Proceso inflamatorio.

La reacción inmunitaria innata, es la encargada de dar una respuesta inmediata a las innumerables agresiones externas e internas contra el organismo, empleando diversos elementos fijos (barreras muco-cutáneas y receptores de membrana) y móviles (mono y polimorfonucleares y moléculas solubles) que actúan de manera rápida, coordinada y sistémica para neutralizar al

agente patógeno y reparar los daños producidos por éste (Farreras & Rozman, 2012). Su función radica en eliminar al patógeno antes de que pueda producir demasiados daños en los tejidos, bloqueando todos sus intentos de invasión, resultando en que sólo aquellos patógenos que logren evadir esta defensa y multiplicarse lo suficiente (patógenos primarios), podrán instaurar la enfermedad y activarán el siguiente mecanismo inmunitario (Tizard, 2009).

**Figura 2:** Los tres principales mecanismos mediante los cuales el organismo animal se defiende frente a la invasión microbiana.



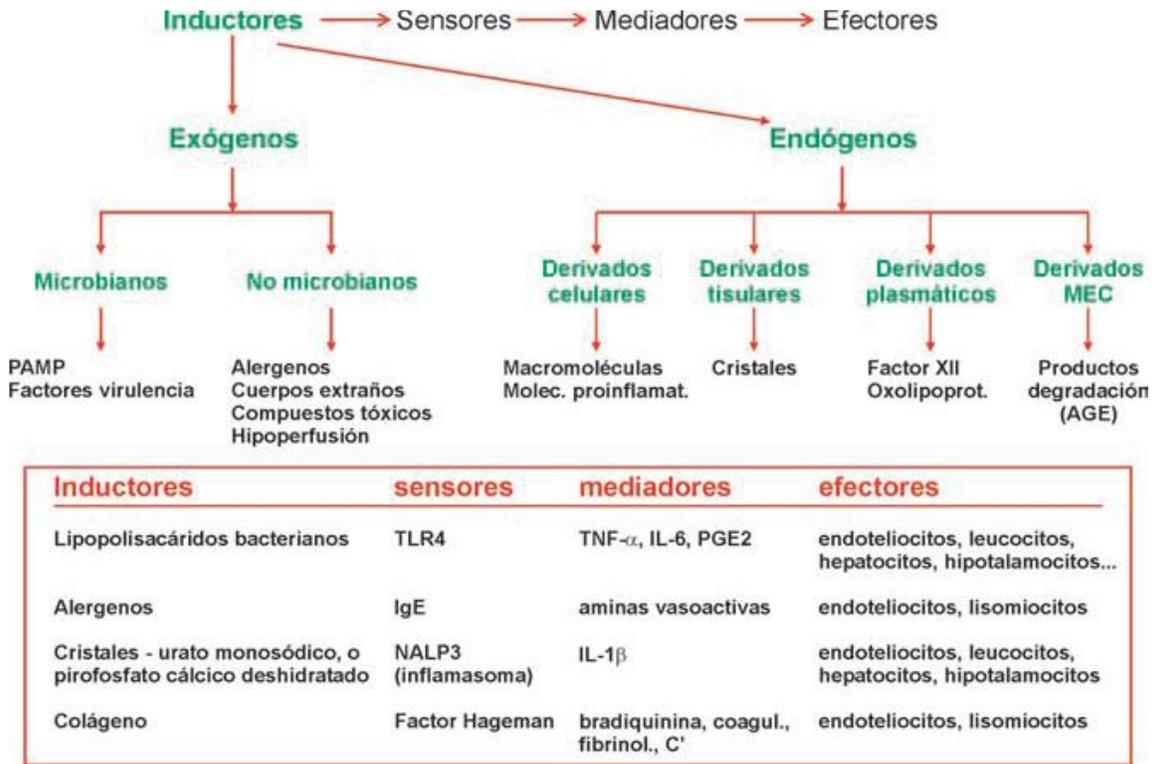
**Fuente:** Tizard, 2009.

Como parte inicial de la inmunidad innata, la piel y las mucosas como: el tracto orofaríngeo, respiratorio, gastrointestinal, urogenital y conjuntivo-corneal, con sus diversas células locales como: los queratinocitos de la piel y los enterocitos del tracto intestinal, juegan un papel fundamental en el proceso de defensa del organismo, pues a más de servir de barrera física,



mecánica y anatómica que impide la penetración de agentes patógenos, producen sustancias de acción microbiostática y microbicida (quimiocinas, citocinas) y un conjunto de mediadores que actúan a través de complejas redes reguladoras, capaces de inducir y orientar la respuesta inflamatoria local (Geffner & Fainboim, 2005; García, 2008; Farreras & Rozman, 2012). En las mucosas, las defensas físicas simples incluyen los procesos de “autolimpieza” como: tos, estornudos y moco en el tracto respiratorio; vómito y diarrea en el digestivo y la micción en el urinario. Es esencial también la presencia de una microbiota normal en la piel e intestino para que eliminen por competencia a aquellos microorganismos invasores y potencialmente patógenos que están menos adaptados que los comensales (Tizard, 2009). Pero en general, a más de las barreras físicas, los elementos centrales de dicha respuesta innata son: el complemento, las citocinas y las quimiocinas (Farreras & Rozman, 2012). Es importante distinguir entre mediadores e inductores de la inflamación, ya que representan diferentes tipos de señales que desencadenan el proceso. Los inductores dan inicio activando lotes específicos de mediadores, los cuales alteran la función de las células, tejidos y órganos efectores de la inflamación, logrando su adaptación y reparación del daño producido por el inductor (García, 2008).

**Figura 3:** Una vía inflamatoria genérica incluye, secuencialmente, inductores, sensores, mediadores y efectores. Los inductores pueden clasificarse en exógenos y endógenos, y ellos a su vez en clases diferentes.



**Fuente:** García, 2008, p. 92.

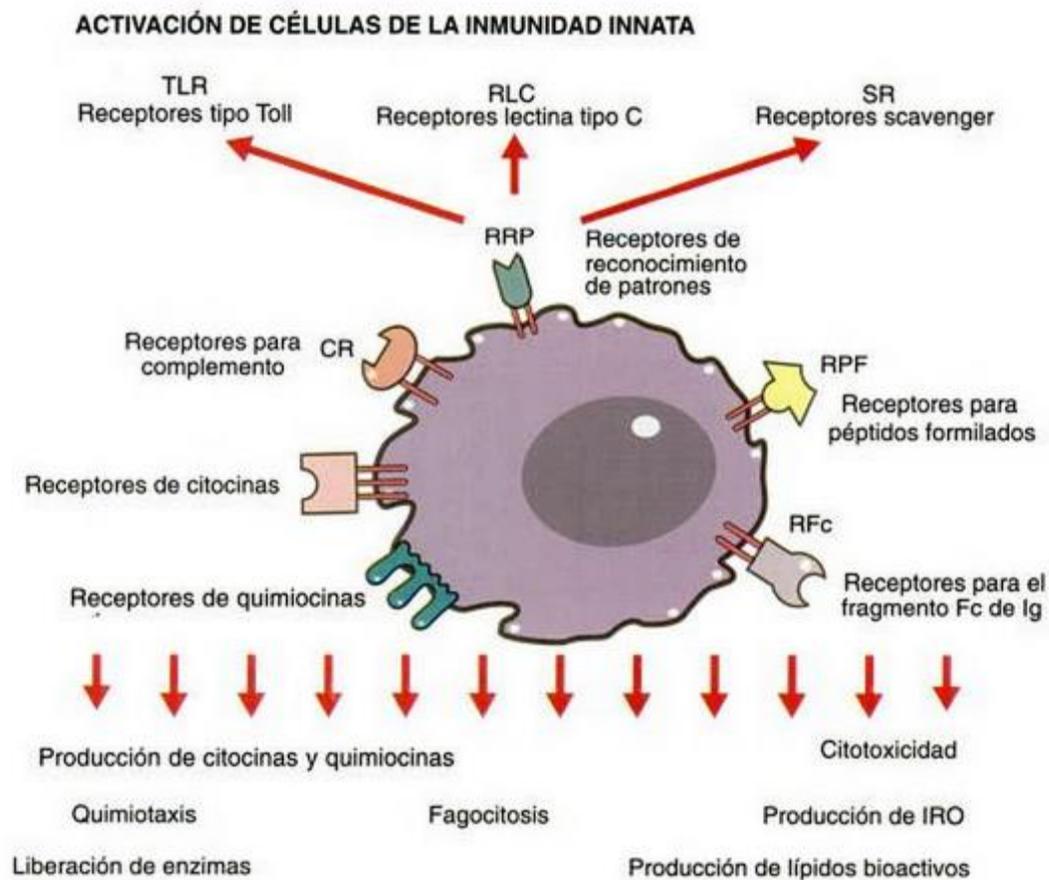
Dicha respuesta inflamatoria local, producida a partir del establecimiento de un foco infeccioso primario que ha superado las barreras mecánicas naturales de los epitelios, incluye los siguientes elementos celulares: neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células NK, células dendríticas, células mieloides, células plasmocitoides, mastocitos, células endoteliales y células NKT; y humorales: sistema del complemento, proteínas de fase aguda e interferones  $\alpha$  y  $\beta$  (citocinas) (Geffner & Fainboim, 2005).



“La naturaleza del proceso infeccioso condicionará la participación de cada uno de los componentes mencionados en la defensa de nuestro organismo” (Geffner & Fainboim, 2005, p. 3), por ejemplo: en infecciones por bacterias extracelulares, es el sistema de complemento el que juega un papel fundamental, ya que conduce al depósito de sustancias activas sobre la membrana polisacárida o pared de las bacterias para que sean reconocidas por los fagocitos. De la misma manera, en las infecciones por bacterias intracelulares, son los macrófagos los protagonistas de la acción defensiva; en las infecciones virales los interferones (IFN) de tipo I, las células NK y las células dendríticas plasmocitoides; y cuando se trata de parásitos, los mastocitos y los eosinófilos son los que actúan en fases tempranas de la infección (Geffner & Fainboim, 2005).

Las células de esta inmunidad, reconocen un número limitado de estructuras presentes en los patógenos llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP), a través de los receptores de reconocimiento de patrones (RRP) no polimórficos, estos últimos son tanto moléculas solubles como las integrales de membrana o citosólicas que pueden reconocer los polisacáridos bacterianos, los ácidos nucleicos virales, la proteína flagelina, entre otros. A más de reconocer a los PMAP, los RRP reconocen también a los patrones moleculares asociados a daños PMAD, junto con los cuales, los PMAP emiten señales de peligro que inician y controlan las respuestas inmunitarias primero innatas (minutos, horas) y luego adquiridas (varios días, semanas) para eliminar o controlar agentes patógenos y luego para reparar el daño tisular producido. Además de este mecanismo de reconocimiento, existen también en los patógenos, números receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas y para los componentes del sistema de complemento; así la células que batallan al principio, podrán diferenciar lo propio de lo no propio (infeccioso, tóxico) (Geffner & Fainboim, 2005; Farreras & Rozman, 2012).

**Figura 4:** Principales mecanismos a través de los cuales las células de la inmunidad innata reconocen, mediante receptores, a los microorganismos, a sus productos o a los mediadores producidos a lo largo de la reacción inflamatoria.



**Fuente:** Geffner & Fainboim, 2005.

Los elementos protagonistas de la respuesta innata, como ya habíamos mencionado, son: el sistema de complemento, las citocinas y las quimiocinas. El **sistema de complemento**, es un conjunto de más de treinta proteínas solubles, sintetizadas en su mayor parte por los hepatocitos, que conforman el 15% de las globulinas séricas, están presentes en el plasma sanguíneo y en la



superficie de algunas células y sus funciones principales son: a) opsonización y eliminación de microorganismos, de restos apoptóticos y de inmunocomplejos; b) desarrollo de respuestas inflamatorias; c) lisis de gérmenes y otras células y d) control del desarrollo de linfocitos B y T y de las respuestas primarias y secundarias de Ac. Puede activarse por tres vías: clásica, alternativa y de las lectinas, cada una con un sistema complejo de amplificación en cascada que terminan en una sola fase lítica que transforma los componentes terminales del complemento (C5 a C9) en un complejo multimolecular que se inserta en las membranas biológicas, resultando de la activación del complemento, el depósito de componentes en los patógenos para que sean lisados (si es célula), marcados para ser fagocitados o para inducir señales hacia diversas células del Sistema Inmune (SI) que poseen receptores para ellos (Geffner & Fainboim, 2005; Farreras & Rozman, 2012).

Las **citocinas** son péptidos o proteínas solubles de bajo peso molecular, que controlan la función de varias células a bajísimas concentraciones (nano y picomolares) y engloban también a las quimiocinas (citocinas con actividad quimiotáctica o atrayente). Una misma citocina puede ser segregada por varios tipos celulares y puede ejercer su función sobre varios tipos celulares también, fenómeno denominado pleiotropía. Toman, en su mayoría, el nombre de interleucinas (IL), por su característica de ser comunicadoras moleculares entre células leucocitarias y entre leucocitos y otros tipos celulares; seguidas de un número que representa el orden temporal de su descubrimiento (IL-1, IL-2, IL-3, etc.). Algunas interleucinas conservan sus nombres por la función biológica por la que se identificaron en un inicio, como el factor de necrosis tumoral (TNF), factor estimulador de colonias (CSF), factor transformador de crecimiento (TGF) o los IFN. En cuanto a las **quimiocinas**, existen aproximadamente 50 de ellas, de actividad



proinflamatoria y que se dividen en cuatro grandes grupos según su estructura química: a) CC o  $\beta$ -quimiocinas, b) CXC o  $\alpha$ -quimiocinas, c) XC o  $\gamma$ -quimiocinas y d) CX<sub>3</sub>C o  $\delta$ -quimiocinas. Se diferencian de las demás citocinas porque tienen actividad quimiotáctica y reclutan células inflamatorias (Geffner & Fainboim, 2005; Barros, Sakata, Machado & Salomao, 2011; Farreras & Rozman, 2012).

Como ejemplo del proceso de activación de los diferentes mecanismos de la inmunidad innata, se analizará las tan comunes y complicadas enfermedades infecciosas, en las que el patógeno, de origen externo y de naturaleza biológica infectiva, iniciará su replicación en el organismo en dos sitios principales y desde los cuales se debe partir para el entendimiento del proceso. Es así que los microorganismos serán considerados como intra y extracelulares y de esto dependerá, la cantidad y el tipo de elementos participantes. Los microorganismos intracelulares se subdividen en: aquellos que se replican en el citoplasma de las células del huésped (células epiteliales o macrófagos tisulares) como: virus, riketsias, algunos protozoos (*Entamoeba histolytica*, *Plasmodium spp*) y algunas bacterias (*Listeria monocytogenes*); en este caso, las células del huésped procesan el antígeno y lo unen a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (CMH-I), presentándolos en su superficie. Están también aquellos que se replican en el interior del fagosoma o macrófago, como ciertas bacterias (micobacterias, *S. typhimurium*, *Legionella pneumophila*, *Brucella spp* o *Yersenia pestis*), clamidias, protozoos (*Leishmania spp*, *Toxoplasma gondii*) y hongos (*Cryptococcus neoformans*); en este caso los macrófagos unen los antígenos del microorganismo a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (CMH-II) para presentarlos en su superficie (Farreras & Rozman, 2000).



El microorganismo fagocitado activa en el macrófago una serie de mecanismos antimicrobianos que son: a) dependientes del oxígeno, mediante la formación de radicales intermedios de oxígeno (ROI) que inicia con la formación del ion superóxido ( $O_2^-$ ) a partir de  $NADPH+H^+$ ,  $O_2$  y la acción de la enzima NADPH oxidasa; o mediante la formación de radicales intermedios de nitrógeno (RNI) que inicia con la formación de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina,  $O_2$  y la acción de la NO sintasa; todo esto ocurre en el interior del fagosoma. Los mecanismos b) independientes del oxígeno son: la acidificación del fagosoma mediante la fusión de la bomba de protones ATPasa con la membrana vacuolar y la unión del fagosoma al lisosoma, que pone en contacto a las enzimas hidrolíticas, proteínas deprivadoras de nutrientes (lactoferrina), defensinas (permeabilizan la pared celular de los patógenos) y otras proteínas antimicrobianas como la lisozima que se encuentran el interior del lisosoma, con el interior del fagosoma en donde se encuentran los microorganismos (Farreras & Rozman, 2000).

Una vez que el microorganismo ha sido fagocitado, inician otros mecanismos controlados por: la síntesis de interferón alfa y beta ( $IFN-\alpha$  y  $IFN-\beta$ ) por parte de las células infectadas, la acción de los linfocitos T y B y de las células NK y la síntesis de diversas citocinas por parte de los macrófagos. En el caso de infecciones víricas por ejemplo, las citocinas ( $IFN-\alpha$  y  $IFN-\beta$ ) inhiben la replicación vírica y las NK reconocen a las células que tienen antígenos ligados a moléculas del CMH-I y las destruyen induciendo apoptosis. Los linfocitos T y B también reconocen a antígenos ligados a dicho complejo, destruyendo sus células a través de mecanismos poco conocidos (Farreras & Rozman, 2000).



Los microorganismos extracelulares entran a través de la piel, mediante la producción de exotoxinas que destruyen las células epiteliales o las uniones intercelulares, penetrando hacia el espacio subepitelial e intersticial en donde se multiplican y activan la vía alterna del complemento, a los linfocitos B CD5 y a los mastocitos, que estimulan el transporte hacia el sitio de la infección de grandes cantidades de fagocitos que inactivarán a dichos patógenos. El complemento lisa bacterias y virus envueltos a nivel extracelular, los opsoniza para que sean reconocidos por los fagocitos y estimula la fagocitosis, pues posee receptores para la C3b, estimulando la acción antimicrobiana de la vía clásica y ahorrando el tiempo de 5 a 7 días que requiere la producción de anticuerpos. Además los péptidos C3a y C5a, conocidos como toxinas anafilácticas, incrementan directa e indirectamente la inflamación local, induciendo la liberación de histamina. Los linfocitos B CD5, reconocen antígenos de patógenos extracelulares por sus inmunoglobulinas de superficie produciendo anticuerpos, en su mayoría IgM, dirigidos a polisacáridos. Esta acción celular es independiente de los linfocitos T y por lo tanto es inespecífica y se genera a las 48 horas de iniciada la infección. Los mastocitos se activan cuando el patógeno ha atravesado la barrera epitelial y ha instaurado la infección local, están localizados en el espacio subepitelial y tejido conectivo subyacente en los vasos sanguíneos y contienen varios gránulos citoplasmáticos llenos de histamina, cuya función principal como amina vasoactiva, es incrementar el flujo sanguíneo y la permeabilidad vascular en el sitio, lo que permite el acumulo rápido de neutrófilos y eosinófilos. Para su estabilidad, los mastocitos generan leucotrienos que controlan la respuesta vascular y estimulan la contracción de la musculatura lisa, produciendo diarrea, vómitos o aumento de la contracción bronquial que



produce tos y moco, en el intento de expulsar al patógeno del organismo; también sintetizan IL-4 y TNF- $\alpha$  (Farreras & Rozman, 2000).

Los macrófagos juegan un papel fundamental en la respuesta innata, pues al fagocitar microorganismos extracelulares o los provenientes de la destrucción de células epiteliales o dendríticas infectadas (intracelulares), secretan un gran conjunto de citocinas: TNF- $\alpha$ , IL-1, 6 y 12 y quimiocinas. El TNF- $\alpha$  o caquectina, producido también por monocitos y linfocitos T, inicia la respuesta inflamatoria caracterizada por dolor, rubor, calor y tumefacción a partir de los cambios vasculares locales como: incremento del diámetro vascular y por lo tanto del flujo sanguíneo (rubor y calor), incremento de la permeabilidad vascular con secuestro local de fluidos (dolor y edema), con la acumulación de inmunoglobulinas, complemento y otras proteínas sanguíneas, con la inducción de la formación de moléculas de adhesión en células endoteliales para que se ligan a la superficie de los monocitos y neutrófilos circulantes incrementando la cantidad de células fagocíticas que migran hacia el tejido afectado y con la inducción de otro tipo de moléculas en dichas células que estimulan la coagulación en pequeños vasos locales para impedir la diseminación generalizada del patógeno por vía sanguínea. El fluido secuestrado en el tejido, transporta a los microorganismos, ya sea libres o dentro de un fagocito, a través de la linfa y hacia los nódulos linfáticos regionales, en donde se inicia la respuesta inmune específica o adquirida. Si el patógeno logra diseminarse por vía sanguínea, el TNF- $\alpha$  desencadena un mecanismo catastrófico llamado sepsis y al ser producido, en este caso, por los macrófagos de todo el organismo, provoca de manera masiva la vasodilatación y pérdida de volumen plasmático, ocasionando un cuadro de shock hipovolémico (Farreras & Rozman, 2000; Barros, *et al.*, 2011).



Las IL-1 y 6 coordinan la respuesta del cuerpo a la infección, son pirógenos endógenos que incrementan la temperatura corporal, actuando sobre el hipotálamo anterior (ciclooxigenasa-2, prostaglandina E2), produciendo fiebre que disminuye la capacidad de replicación de los patógenos, intensifica la respuesta inmune específica posterior y tiene un efecto protector frente a los efectos perjudiciales del TNF- $\alpha$ . La IL-1 y el TNF- $\alpha$ , inducen la producción de IL-6 en macrófagos, monocitos, eosinófilos, células de la glía y células Kupffer (macrófagos de los sinusoides hepáticos), la que a su vez estimula a los hepatocitos para la síntesis y liberación de proteínas de fase aguda, de las cuales son de mayor interés: la PCR que se une a la fosforilcolina de la membrana microbiana activando el complemento para lisarla y opsonizarla, y la lectina ligadora de manano, proteína o lectina calcio-dependiente que se liga a residuos de manosa presentes en muchas bacterias, iniciando la vía clásica de activación del complemento y actúa como opsonina para los monocitos carentes del receptor para la manosa (Farreras & Rozman, 2000; Barros, *et al.*, 2011).

Las quimiocinas son sintetizadas por macrófagos, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos y células de la musculatura lisa, por estímulo de productos bacterianos, víricos o agentes que ocasionan daño físico como la sílica o los cristales de urato. Sus funciones dependerán del tipo y estructura de quimiocina, como por ejemplo la CXC promueve la migración de neutrófilos al sitio de infección, la CC promueve la migración de monocitos y la C la de eosinófilos. A más del TNF- $\alpha$ , las IL-1, 6 y 12 y las quimiocinas, existen otros productos liberados por el macrófago hacia el espacio extracelular que son: el activador del plasminógeno, la fosfolipasa, las prostaglandinas, los leucotrienos (LT) en especial LT-B4 y el factor activador



de plaquetas (PAF) que incrementan la respuesta, aumentan el flujo sanguíneo y reclutan fagocitos en el sitio de infección (Farreras & Rozman, 2000).

En cuanto a los fagocitos migratorios, existen tres tipos principales de leucocitos polimorfonucleares: a) los neutrófilos, que son los más numerosos (65%) y circulan en la sangre, poseen los mismos mecanismos antimicrobianos de los macrófagos, pero su vida media es más corta, no presentan antígenos a los linfocitos y secretan menos citocinas, son cruciales en la respuesta innata pues migran rápidamente y en gran cantidad al foco infeccioso donde fagocitan un gran número de patógenos y se destruyen formando pus; b) los eosinófilos (45%), que se encuentran en gran cantidad en tejidos submucosos del tracto intestinal y respiratorio, son menos efectivos en la fagocitosis y destrucción de patógenos, pero son muy efectivos en la fagocitosis de complejos antígeno-anticuerpo, se los relaciona con procesos alérgicos e infecciones parasitarias; c) los basófilos (1%), que poseen gránulos con histamina y heparina y se los relaciona con los mastocitos y con procesos alérgicos y parasitarios helmínticos. Además de los polimorfonucleares, están los monocitos (3%), que se encuentran en un punto intermedio antes de convertirse en macrófagos, tienen una menor capacidad bactericida que sus formas maduras y se encuentran únicamente en los tejidos (Farreras & Rozman, 2000).

La respuesta innata a más de resolver o controlar el proceso infeccioso naciente, condiciona el camino en el que se desarrollará la respuesta inmune adaptativa, la cual inicia con la migración de células dendríticas que han capturado al agente infeccioso en el sitio de la infección, hacia los órganos linfoides secundarios donde los linfocitos B y T reconocen al antígeno e inician su proceso clonal y de diferenciación de células efectoras de la inmunidad



específica. En este proceso modulador, las citocinas juegan un papel fundamental, especialmente la IL-12 y 4 (Geffner & Fainboim, 2005).

#### **2.1.4. Inmunidad adquirida o adaptativa.**

La respuesta inmunitaria adaptativa, adquirida o específica es un conjunto de procesos en el cual, a partir del encuentro con un Ag, se inicia la expansión de un pequeño número de clones linfocitarios específicos para ese Ag, expandiendo sus funciones efectoras sobre el mismo y generando las consecuencias clínico-biológicas sobre el receptor (Farreras & Rozman, 2012). Es el último nivel de defensa del organismo y aunque tarde varios días, es extremadamente eficaz (Tizard, 2009).

Existen dos tipos principales de Respuesta Inmunitaria Adquirida (RIA): una celular mediada por linfocitos T, que cumple diversas funciones y que por lo general se activa al combatir patógenos intracelulares o endógenos; y una humoral mediada por linfocitos B productores de Ac, que se activa al combatir patógenos extracelulares o exógenos (Tizard, 2009; Farreras & Rozman, 2012). Esta clasificación, aunque algo obsoleta, es de gran utilidad para comprender los mecanismos inmunitarios y sus funciones, incluso cuando son transferidos de un animal a otro mediante suero (Ac) o leucocitos (linfocitos T, células) (Farreras & Rozman, 2012).

La respuesta inmunitaria mediada por células (linfocitos T), se ejemplifica fácilmente en los procesos de trasplante de órganos o tejidos de un donante específico, en los que el rechazo a



éstos, será lento durante el primer procedimiento, pero en el segundo y tercero el rechazo será rápido pues las células que intervienen, que son principalmente linfocitos, recuerdan el tipo de células del donante incluso después de meses o años del primer trasplante. La forma de transferir esta memoria de un individuo a otro no será el suero, como en la RI mediada por Ac, sino mediante células vivas (linfocitos T) (Tizard, 2009).

La respuesta inmunitaria mediada por Ac (linfocitos B) o respuesta humoral, es una reacción que incrementa su eficacia a medida que el animal es expuesto a un Ag determinado durante varias ocasiones, como en el caso del tétanos con su toxina tetánica: en la tercera inoculación del toxoide (toxina químicamente detoxificada), se alcanza un nivel de Ac alto mucho más rápido y duradero (años), comparado con la primera inoculación (semanas). Esta memoria del sistema inmune es la base del mecanismo utilizado en la vacunación y el nivel de Ac no ascenderá indefinidamente, sino que se estabilizará a cierto nivel incluso luego de repetidas inoculaciones (Tizard, 2009).

La respuesta inmunitaria es única y se diferencia de la innata por poseer linfocitos T y B que cuentan con receptores clonales específicos y diversos para cada uno de los epítopes (secuencias aminoacídicas cortas) particulares de los Ag (Geffner & Fainboim, 2005; Farreras & Rozman, 2012). Pero esta enorme variedad de receptores, se refleja en un repertorio inicial que tendrá uno o pocos linfocitos con receptores específicos para cada posible epítipo y que en conjunto pueden reconocer casi a cualquier microorganismo invasor (ontogenia) (Geffner & Fainboim, 2005; Tizard, 2009; Farreras & Rozman, 2012). Este repertorio inicial, mediante



estrategias y mecanismos particulares, puede convertirse en una respuesta de alta especificidad, alta eficiencia y capaz de generar memoria (Farreras & Rozman, 2012).

Todo inicia en la **primera fase de la RIA**, con la activación de linfocitos T  $CD4^+$  (en su mayor parte) y  $CD8^+$  (siempre que se hayan estimulado los  $CD4^+$  primero) debido a la presentación de antígenos peptídicos por parte de las células presentadoras de Ag (CPA), en su mayoría células dendríticas (CD) de la inmunidad innata, que capturaron al Ag en el tejido de entrada del patógeno y lo llevaron al ganglio linfático más cercano, y dentro de las cuales el Ag ha sufrido cambios que generaron péptidos que se unieron a moléculas del CMH, las cuales presentan al Ag en la superficie de dichas células, formando el complejo péptido-CMH (pCMH) que será la diana del receptor del linfocito T (RLT) (Farreras & Rozman, 2012). Para los linfocitos T  $CD4^+$ , será el CMH-II el que se una al péptido del antígeno y para los linfocitos T  $CD8^+$  será el CMH-I (Geffner & Fainboim, 2005).

La **segunda fase de la RIA**, es el reconocimiento del complejo pCMH por parte del RLT, que formará un complejo trimolecular pCMH-RLT entre las dos células; pero además, para este reconocimiento eficiente, se requieren de otras parejas de moléculas ligando-receptor presentes en dichas dos células (CD y linfocitos T) y de moléculas coestimuladoras y de adhesión que facilitarán la formación de un complejo supramolecular (sinapsis inmunológica) que dará paso a la siguiente fase. La **tercera fase de la RIA** es la activación celular, en la que el RLT emite varias señales intracelulares que activan factores de transcripción necesarios para la expresión de múltiples genes y para la proliferación celular. La primera señal es la que emite el RLT al unirse al ligando pCMH. Una segunda señal es la de las moléculas coestimuladoras de la CPA, que son



la CD80 y la CD86, y también de los ligandos de esta célula en el linfocito T (CD28). La interacción CD28-CD80 y CD86 generan señales que sumadas a las de la activación del RLT, permitirán que las células expresen el gen de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL2 y de la propia citocina IL2, que será la que estimule el inicio de la cuarta fase (Farreras & Rozman, 2012).

La **cuarta fase de la RIA** es la expansión clonal, que consiste en la proliferación masiva de los linfocitos tras su activación para llegar a formar en unos días, alrededor de  $10^4$  células por clon activado. Es un proceso estrictamente regulado que transformará a los linfocitos T activados en células efectoras de la última fase de la RIA que será la eliminación de los agentes patógenos. En esta diferenciación de linfocitos, intervienen las citocinas producidas por las CPA que inducirán la expresión de factores de transcripción específicos de cada estirpe celular efectora, permitiendo su diferenciación final (Farreras & Rozman, 2012). La presencia de IL-12 y citocinas relacionadas a esta, promueven la diferenciación de linfocitos T  $CD4^+$  en un perfil de linfocitos T helper 1 (Th1), mientras que la IL-4, sobre todo cuando la IL-12 es baja, promueve la diferenciación de linfocitos T  $CD4^+$  en un perfil de linfocitos T helper 2 (Th2). A más de estos dos perfiles, los linfocitos T  $CD4^+$  también pueden diferenciarse en T reguladores que son los que mantienen bajo control a la expansión clonal (Geffner & Fainboim, 2005). Intervienen también citocinas producidas por otros tipos celulares (macrófagos, linfocitos B, células NK, mastocitos, entre otros) de la inmunidad innata, que serán activadas en distintos patrones, dependiendo del caso, a partir de la estimulación de ciertos receptores reconocedores de agentes patógenos, determinando así, el tipo dominante de células efectoras que se producirán en la RIA (Farreras & Rozman, 2012).



En la **quinta fase de la RIA**, los linfocitos efectores Th1, Th2 y T helper 17 (Th17) ya diferenciados, saldrán de la médula de ganglio a través de los vasos eferentes y pasarán de la circulación linfática a la sanguínea para migrar hacia los tejidos periféricos y actuar en el sitio de la infección, reconociendo al Ag con mayor facilidad y estimulando una serie de mecanismos, incluso de la misma inmunidad innata, para eliminar al agente patógeno en su totalidad (Farreras & Rozman, 2012).

Los linfocitos B se activarán ante el estímulo de un Ag, sólo si los linfocitos CD4 se activaron paralelamente contra el mismo Ag. Se expanden de manera clonal y se diferencian en células efectoras productoras de Ac llamadas plasmocitos. Se unen a un epítoto diferente del Ag mediante su receptor de linfocitos B (RLB) que procesa toda la molécula, diferenciándose así del péptido que se une al RLT y no necesitan de CPA para reconocerlo (antígeno nativo) (Geffner & Fainboim, 2005; Farreras & Rozman, 2012).

### **2.1.5. Fases de la inflamación.**

De forma esquemática, la inflamación se divide en cinco etapas:

1. Liberación de mediadores
2. Efecto de los mediadores
3. Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio
4. Regulación de la respuesta inflamatoria
5. Reparación



### ***2.1.5.1. Liberación de mediadores.***

Esta etapa se inicia por parte del mastocito, célula inmune inespecífica procedente de la médula ósea, que contiene en el citoplasma gránulos con mediadores de la inflamación preformados, que son liberados junto con otros de carácter lipídico. El mastocito se detecta en casi todos los tejidos, siendo localizado principalmente alrededor de los pequeños vasos, sobre los que actuarán los mediadores una vez liberados (Bordés, Martínez, García & Guisado, 2010).

### ***2.1.5.2. Efecto de los mediadores.***

Los mediadores preformados son: la **histamina**, que está ampliamente distribuida por el organismo pero que se detecta principalmente en el mastocito y basófilo, se obtiene por descarboxilación del aminoácido histidina y actúa sobre los receptores H1 (histamina 1) de los vasos produciendo vasodilatación e incremento de la permeabilidad; **enzimas proteolíticas** como la kininogenasa que actúa sobre las proteínas procedentes de la sangre denominadas kininógenos, produciendo su ruptura en péptidos más pequeños, las kininas, las que inducen vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y estimulan las terminaciones nerviosas del dolor; **factores quimiotácticos**, como el Factor Quimiotáctico de Eosinófilos para Anafilaxia (ECF-A) que incluye dos tetrapéptidos que atraen eosinófilos al foco inflamatorio induciendo simultáneamente la activación de estas células y el Factor Quimiotáctico de Neutrófilos (NCF) que es una proteína con capacidad de atraer y activar al neutrófilo; **heparina** que al inhibir la coagulación, favorece la llegada al foco inflamatorio desde la sangre, de moléculas y células; y **el óxido nítrico**, responsable de la relajación del músculo liso, regula el reclutamiento de



leucocitos y disminuye la agregación plaquetaria inducida por citocinas (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) (Montero, Hurtado & Cabrera, 2001; Rubio, Lasa, Arroabarren, Garrido, García & Tabar, 2003; Bordés, *et al.*, 2010; Martínez, Acera, Soria, González & Suárez, 2011).

Los mediadores sintetizados de novo son: **prostaglandina E2 (PGE2)**, que produce vasodilatación y dolor y que en coordinación con el factor C5a y LT-B4, aumenta la permeabilidad vascular; **LT-B4** que es un factor quimiotáctico para eosinófilos, neutrófilos, mastocitos y macrófagos; **PAF**, que activa a las plaquetas estimulando su agregación debido a la liberación de mediadores, da inicio a los procesos de coagulación y produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad; y **Citocinas** que influyen en la actividad, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia de la célula inmunológica y regulan la producción y la actividad de otras citocinas, siendo las principales: IL-1, 2, 4, 6, 10, 13, 17, TGF- $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Bordés, *et al.*, 2010; Barros, *et al.*, 2011).

#### ***2.1.5.3. Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.***

La fase inicial está representada por la llegada de moléculas: las **inmunoglobulinas M y G (IgM e IgG)** que activan el complemento por la vía clásica y la IgG, a su vez, se une a los receptores de membrana de los fagocitos por la porción Fc (FcR), potenciando la fagocitosis; los **factores del complemento**, pues además de la activación de la vía clásica indicada anteriormente, el complemento se puede activar por la vía alternativa, por productos liberados directamente por el germen; así cuando el complemento sigue una u otra vía, alcanza la vía común produciendo la lisis del germen o la célula extraña inductora de la inflamación;



nuevamente los **kininógenos** sobre los que actúan las kininogenasas liberadas por el mastocito y basófilo, dando lugar a las kininas; las **proteínas de fase aguda**, como la PCR que tiene la capacidad de fijar determinados gérmenes como el neumococo y de activar el complemento por la vía clásica; y los **factores de la coagulación** como el fibrinógeno (Bordés, *et al.*, 2010).

En la fase tardía, la llegada de células es el mecanismo principal. Los leucocitos (neutrófilos, basófilos, monocitos/macrófagos, eosinófilos, linfocitos T y B) son llamados al sitio de la lesión, cumpliendo, cada uno de ellos, diversas funciones que analizaremos posteriormente (Bordés, *et al.*, 2010).

#### ***2.1.5.4. Regulación de la respuesta inflamatoria.***

Es de suma importancia que la reacción inflamatoria sea regulada para evitar una respuesta exagerada o perjudicial. Los factores que intervienen en esta regulación son: **histamina** que actúa sobre los receptores H<sub>2</sub>, induce la inhibición de la liberación de mediadores en el mastocito y el basófilo, inhibe la actividad del neutrófilo y la quimiotaxis y activa las células T supresoras; la **PGE**, inhibe la liberación de mediadores en el mastocito y basófilo e inhibe la proliferación y diferenciación de los linfocitos; **agonistas autonómicos**, como aquellos que actúan de receptores en el mastocito y basófilo llamados receptores  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicos y  $\zeta$ -colinérgicos que al activarse, ejercen un efecto inhibitorio ( $\beta$ -adrenérgico) y estimulador ( $\alpha$ -adrenérgico y  $\zeta$ -colinérgico) de la liberación de mediadores; **heparina** que inhibe la coagulación y la activación de los factores del complemento; el **eosinófilo** que atraído por el ECF-A, se dirige al foco inflamatorio y libera enzimas que degradan a los mediadores potenciadores de la



inflamación, como la histaminasa que degrada a la histamina, la arilsulfatasa a los leucotrienos y la fosfolipasa C al PAF; y el **Sistema Nervioso Central (SNC)** que libera neurotransmisores que regulan la diferenciación y funcionamiento de las células tanto de la inmunidad innata como de la adquirida, actuando sobre los órganos linfoides a través de su inervación; además existe un control reflejo de la inflamación a partir de la producción de corticoesteroides que inhiben la respuesta inmune y de circuitos sensoriales y efectores del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) que transmiten impulsos, que inducen de manera refleja, una respuesta antiinflamatoria (Bordés, *et al.*, 2010; Vergara, 2011; Silva, Montes, García & Olloquequi, 2015).

#### ***2.1.5.5. Reparación.***

Se inician cuando las causas de la agresión han desaparecido o han sido eliminadas por la propia respuesta inflamatoria o inmune. Se han identificado tres fases en el proceso: la inflamatoria, en la que hay liberación local de células y compuestos traídos por la sangre y la activación de los mecanismos de la coagulación; la proliferativa en la que hay formación de tejido nuevo debido al crecimiento y migración celular y a la participación de diversas proteínas de adherencia; y la última fase de remodelación tisular en la que se forma un tejido estable similar al que hubo en un principio (antes de la lesión) llamado tejido cicatrizal. En la recuperación del funcionamiento del área afectada participan factores de crecimiento, citoquinas y otros componentes sanguíneos (Benavides, 2008; Bordés, *et al.*, 2010).



## **2.1.6. Cambios producidos durante el proceso inflamatorio.**

### ***2.1.6.1. Cambios vasculares:***

*2.1.6.1.1. Cambios del flujo y calibre vascular.* Al inicio se produce un período transitorio e inconstante de vasoconstricción arteriolar, luego vasodilatación con incremento de la velocidad del flujo sanguíneo y de la temperatura mediada por histamina, quininas y óxido nítrico que actúan sobre el músculo liso vascular produciendo enrojecimiento (rubor) de la zona lesionada. Luego se produce hiperemia pasiva con formación de exudado inflamatorio y el paso de éste al tejido perivascular por incremento de la permeabilidad microvascular; y finalmente, estasis del flujo sanguíneo por aumento de la viscosidad debido a pérdida de líquido produciendo enlentecimiento del flujo y marginación leucocitaria (Zeballos, 2011; León, Alvarado, de Armas, Miranda, Varens & Cuesta, 2015).

*2.1.6.1.2. Cambios de la permeabilidad vascular.* Ocurren en arteriolas, vénulas y capilares, mediados por sustancias químicas como histamina, bradiquinina, leucotrienos, sustancia P, entre otras, que ocasionan extravasación de fluido rico en proteínas hacia los tejidos produciendo un edema inflamatorio agudo. Esta alteración de la permeabilidad puede ser de tres tipos principales: inmediata transitoria que es reversible y que se produce en un lapso de 10 a 30 minutos afectando únicamente a vénulas; inmediata mantenida, que causa necrosis, desprendimiento de células endoteliales y afecta a capilares, vénulas y arteriolas; y tardía prolongada, que inicia en horas o días y afecta a capilares y vénulas por lesión directa, como en quemaduras o radiación. Existen otros procesos en los que la permeabilidad se ve afectada, como en la lesión endotelial mediada por leucocitos, en el aumento de la transición por incremento de



los canales endoteliales y en la extravasación a partir de nuevos vasos formados en la reparación de tejidos dañados (Zeballos, 2011; León, *et al.*, 2015).

### **2.1.6.2. Cambios celulares:**

#### *2.1.6.2.1. Marginación, rodamiento, adhesión, transmigración y quimiotaxis leucocitarias.*

Cada uno de estos fenómenos celulares, depende de la presencia y expresión de las moléculas de adhesión intercelular (MAIC) que cambian de un fenómeno a otro con una rapidez que dependerá de si éstas están ya preformadas o si comienzan a transcribirse al momento de recibir el estímulo (sintetizadas de *novo*). Los leucocitos migran hacia las células endoteliales para luego adherirse firmemente en un proceso conocido como pavimentación, mediante la fijación de las MAIC en la pared de dichas células, proceso mediado por quimiocinas y citocinas. Los receptores de adhesión son: selectinas, que se unen a los oligosacáridos de las glicoproteínas de la pared celular por dominios de lectinas y son la E, P y L-selectinas; inmunoglobulinas de adhesión endotelial que son las MAIC como la MAIC-1 y la molécula de adhesión de células vasculares-1 (MACV-1), las cuales se unen a las integrinas de los leucocitos; y estas últimas (integrinas), que son glicoproteínas de adherencia transmembranales consideradas como receptores de adhesión para la matriz extracelular (Zeballos, 2011).

El proceso continúa entonces con la adhesión leucocitaria modulada por quimiocinas y citocinas por tres mecanismos: redistribución de las moléculas de adhesión preformadas hacia la superficie celular, inducción de moléculas de adhesión sobre el endotelio e incremento de la afinidad de unión. Así la adhesión y transmigración leucocitarias se producen de la siguiente



manera: 1) activación endotelial por acción de mediadores químicos que producen un incremento de selectinas E y P, 2) rodamiento leucocitario en el cual los leucocitos salen del flujo vascular y ruedan a lo largo del endotelio, 3) activación y adhesividad de leucocitos establecidas por las integrinas bajo la acción de las quimiocinas, 4) transmigración y diapédesis en las que los leucocitos emiten pseudópodos y pasan a través del endotelio hacia el espacio extravascular con posible salida de glóbulos rojos que explica la formación de exudados hemorrágicos en las reacciones inflamatorias, y 5) quimiotaxis que es la migración unidireccional de los leucocitos atraídos al sitio de la lesión por estímulos químicos llamados factores quimiotácticos que son: el complejo trimolecular activado del complemento, el fragmento desdoblado por plasmina de C3, productos bacterianos, productos de la vía lipooxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico, citocinas como la IL-8 y factores bacterianos solubles que poseen el AAN-Formil-Metionina. Además, los receptores de la membrana activan la proteína G que estimula la liberación de calcio del retículo endoplásmico, el cual ensambla los filamentos de actina-miosina propiciando el movimiento celular (movimiento ameboideo) (Montero, *et al.*, 2001; Zeballos, 2011; León, *et al.*, 2015).

*2.1.6.2.2. Activación leucocitaria.* Dada por la acción de factores quimiotácticos, receptores Trol, receptores de citocinas de fragmentos del complemento y de inmunoglobulinas sobre los leucocitos, estimulando la fagocitosis, la producción de metabolitos del ácido araquidónico, la degranulación y secreción de enzimas lisosómicas, la secreción de citocinas y el aumento de la actividad de las moléculas de adhesión y de las integrinas (Zeballos, 2011).



2.1.6.2.3. *Fagocitosis*. Es la ingestión y digestión de partículas extrañas por parte de los neutrófilos y macrófagos en el sitio de la lesión, que se efectúa en 4 etapas principales: 1) Reconocimiento y unión de los leucocitos a las partículas al ser estas recubiertas por opsoninas (fragmento de Fc de inmunoglobulinas, fragmento C3b del complemento y colectinas) y por sus proteínas (péptidos) que se unen a los receptores leucocitarios (Fc $\gamma$ R, receptores del complemento 1, 2 y 3 y receptores C1q). 2) Englobamiento de la partícula extraña en la que los leucocitos emiten pseudópodos que rodean a la partícula y la llevan a su interior en un fagosoma intracelular que se fusionará con los lisosomas, liberando enzimas hidrolíticas y productos metabólicos tanto al interior como al exterior de la célula (regurgitación durante la ingestión). 3) Destrucción del material fagocitado mediante mecanismos dependientes e independientes del oxígeno, es decir, mecanismos oxidativos y enzimas proteolíticas respectivamente. 4) Liberación extracelular de productos leucocitarios como: enzimas lisosómicas regurgitadas durante la fagocitosis o liberadas por el proceso citotóxico de la muerte de los leucocitos, metabolitos del oxígeno y productos del metabolismo del ácido araquidónico que producen daño tisular (Zeballos, 2011; León, *et al.*, 2015).

### **2.1.7. Células que intervienen en la inflamación.**

2.1.7.1. *Células cebadas-mastocitos*. Actúan como centinelas del sistema inmunitario ya que tienen receptores capaces de detectar casi cualquier factor de lesión y contribuyen en la liberación de mediadores diversos. Son células granulares que se encuentran en mayor cantidad en el tejido conectivo localizado alrededor de los vasos sanguíneos de pequeño calibre, cerca de



nervios, de células de la musculatura lisa, de glándulas mucosas, de folículos pilosos, piel, vías aéreas, tracto gastrointestinal y en las serosas en donde, al igual que en los basófilos, existen gránulos de heparina, histamina y enzimas. Si bien, su función en los procesos alérgicos es conocida, en los últimos años se han descrito varias funciones esenciales que van desde la iniciación y mantenimiento de la inflamación aguda, hasta la activación de los mecanismos de la inmunidad adquirida (Bordés, *et al.*, 2010; Zeballos, 2011; Silva, *et al.*, 2015).

**2.1.7.2. Neutrófilos.** Son células de la primera línea de defensa del organismo, se producen en la médula ósea y se liberan al torrente sanguíneo pocos minutos después de iniciado el proceso inflamatorio por la liberación de productos inflamatorios. Poseen especies reactivas del oxígeno, citoquinas proinflamatorias (IL-8), mediadores lipídicos (LT-B4), péptidos antibacterianos (defensinas) y gránulos de enzimas catalíticas lisosomales como la fosfatasa alcalina (FA), desoxirribonucleasa, ribonucleasa, beta glucoronidasa, fagocitina y lisozima, utilizadas para su principal función que es la fagocitosis. Además de esto, regulan en general el proceso inflamatorio agudo (Zeballos, 2011; Silva, *et al.*, 2015).

**2.1.7.3. Monocitos/macrófagos.** Son células efectoras de larga vida y con gran capacidad reactiva. Llegan al foco inflamatorio más tardíamente y aquí se diferencian en **macrófagos**, presentan funciones idénticas a las del neutrófilo llegando a su nivel en 6 a 24 horas, respondiendo mejor a los estímulos de los factores quimiotácticos. Pueden secretar más de 100 sustancias que intervienen en la activación del movimiento, crecimiento y diferenciación celulares, así como en la regulación del crecimiento de vasos sanguíneos y en la remodelación de estructuras formadas por tejido conjuntivo. Actúan además, como células presentadoras del



antígeno a las células específicas T y B, iniciando de esta forma, la respuesta específica (Bordés, *et al.*, 2010; Zeballos, 2011; Silva, *et al.*, 2015).

**2.1.7.4. Eosinófilos.** Se presentan con mayor frecuencia en enfermedades inmunológicas, alérgicas y parasitarias en las que son la célula fagocitaria de elección. Se presentan en mayor cantidad en médula ósea, piel, pulmones e intestino y en horas vespertinas, con un período de vida de 8 a 12 horas (Zeballos, 2011).

**2.1.7.5. Células dendríticas.** Población especializada de células mononucleares encargadas del reconocimiento, la captación y la presentación del Ag a los linfocitos para iniciar la respuesta inmunitaria adquirida (Silva, *et al.*, 2015).

**2.1.7.6. Linfocitos T y B.** Son la base funcional de la inmunidad adquirida, se producen en la médula ósea y órganos linfoides cuando la inflamación primaria (inmunidad innata) se vuelve crónica. Su período de vida es de 3 a 4 días y potenciados por el macrófago, inician la respuesta específica. Las células B procedentes de los tejidos linfoides, asociados a tejidos o mucosas, sintetizan IgE que unidas al mastocito o basófilo pueden potenciar la inflamación. Por otra parte, las células T comienzan a producir linfoquinas que prolongan la inflamación en una respuesta inmune más elaborada (Bordés, *et al.*, 2010; Zeballos, 2011; Farreras & Rozman, 2012).

**2.1.7.7. Células plasmáticas o plasmocitos.** Se derivan a partir de los linfocitos B y secretan gran cantidad de Ac, participando junto con los linfocitos en la inmunidad adquirida (Zeballos, 2011; Farreras & Rozman, 2012).



### 2.1.8. Clasificación de la inflamación.

La inflamación puede clasificarse, por las características del exudado en **serosa**, que se produce rápidamente en las fases tempranas de la inflamación aguda con presencia de líquido acuoso pobre en proteínas por un aumento rápido de la permeabilidad vascular; **fibrinosa**, inflamación aguda grave con un extremo aumento de la permeabilidad vascular que permite la formación de un exudado con alto contenido de fibrinógeno, el cual al convertirse en fibrina, se localiza en el tejido de la lesión para luego ser degradado por fibrinólisis evitando así la fibrosis del órgano o tejido afectado; **supurativa**, caracterizada por la presencia de exudado purulento lleno de neutrófilos llamado pus, que se deposita en el sitio de la lesión y puede presentarse en forma de absceso, flemón o empiema; y **hemorrágica**, que se justifica por la necrosis y ruptura de los vasos de pequeño calibre por efecto de enzimas endógenas (Zeballos, 2011).

Por el agente etiológico se clasifica en: infecciosa bacteriana, vírica y parasitaria, granulomatosa, pseudomembranosa, catarral e inmunomediada (alergias y enfermedades autoinmunes). Por el tiempo de duración en crónica y aguda (Zeballos, 2011).

#### 2.1.8.1. *Inflamación crónica.*

Reacción inflamatoria de larga duración que se produce cuando un proceso inflamatorio agudo no ha sido resuelto, debido por ejemplo, a la acción prolongada de un agente patógeno. En este cuadro inflamatorio la inflamación activa, el poder lesivo sobre los tejidos y el intento de cicatrización, ocurren de manera simultánea. En este caso, el infiltrado celular estará compuesto



de macrófagos principalmente, linfocitos, células plasmáticas, células epiteloides gigantes, eosinófilos y fibroblastos. Hay angiogénesis, fibrinólisis, formación de tejido fibroso y necrosis tisular a causa de infecciones provocadas por microorganismos intracelulares, por exposición prolongada a sustancias tóxicas endógenas o exógenas o por reacción inmune (Zeballos, 2011; León, *et al.*, 2015).

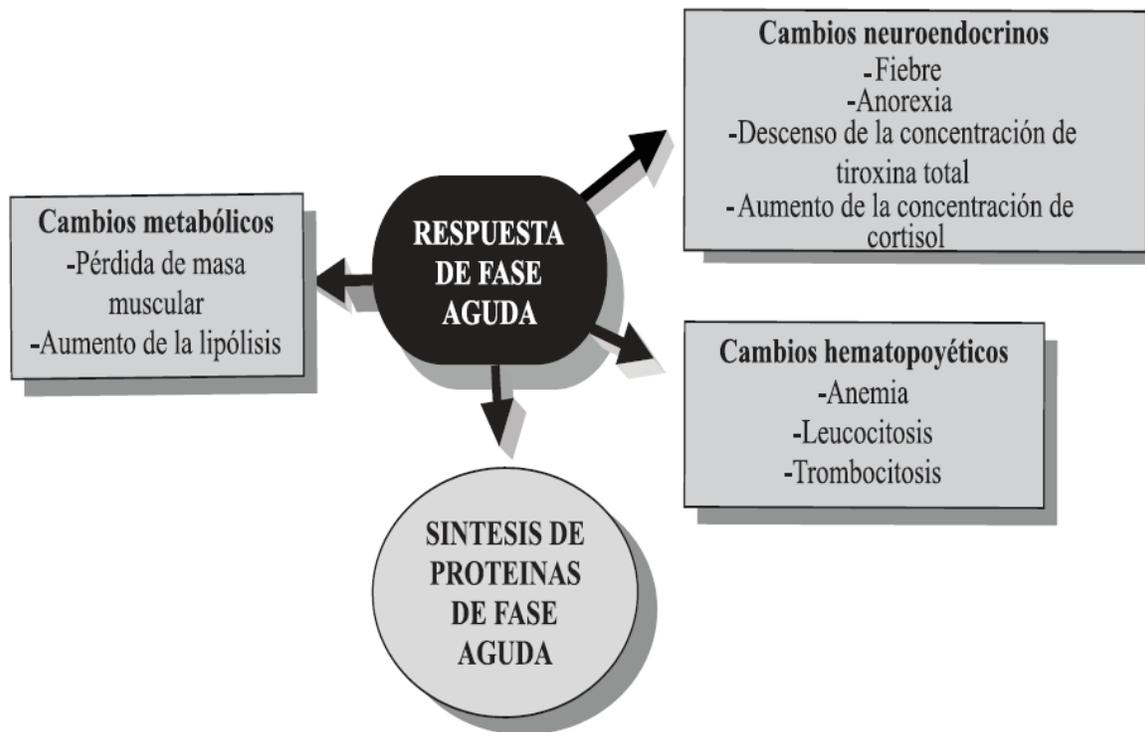
#### **2.1.8.2. Inflamación aguda.**

Conformada, por ser inflamatoria, por todos los mecanismos ya descritos en la inflamación, pero de inicio rápido y de corta duración, caracterizada por la emigración de neutrófilos del espacio perivascular al extravascular, con formación de exudado inflamatorio o edema como consecuencia de la hiperemia que se produce en los primeros 10 a 15 minutos y con la capacidad de producir, como parte de sus mecanismos, proteínas de fase aguda que también están presentes en procesos no agudos pero que son indicativas, en mayor medida, de este tipo de inflamación. La intensidad de la respuesta inflamatoria dependerá de la naturaleza y grado de la lesión y del nivel de respuesta del paciente, con la posibilidad de desencadenar en cualquiera de estas tres opciones: una resolución completa de la lesión, el avance hacia una inflamación crónica o el reemplazo del tejido lesionado por tejido conectivo cicatrizal (fibrosis) (Zeballos, 2011; León, *et al.*, 2015).

Este tipo de inflamación no sólo se da de manera primaria sino que puede ser secundaria a otros procesos primarios y sus principales causas son: inflamaciones agudas iniciales, crónicas, infecciones bacterianas, víricas y parasitarias, endotoxemia, intervenciones quirúrgicas,

traumatismos, quemaduras, procesos tumorales, infecciones neonatales, preñez y estrés (Martínez, *et al.*, 2001).

**Figura 5:** “Cambios producidos durante la respuesta de fase aguda”.



**Fuente:** Martínez, *et al.*, 2001.

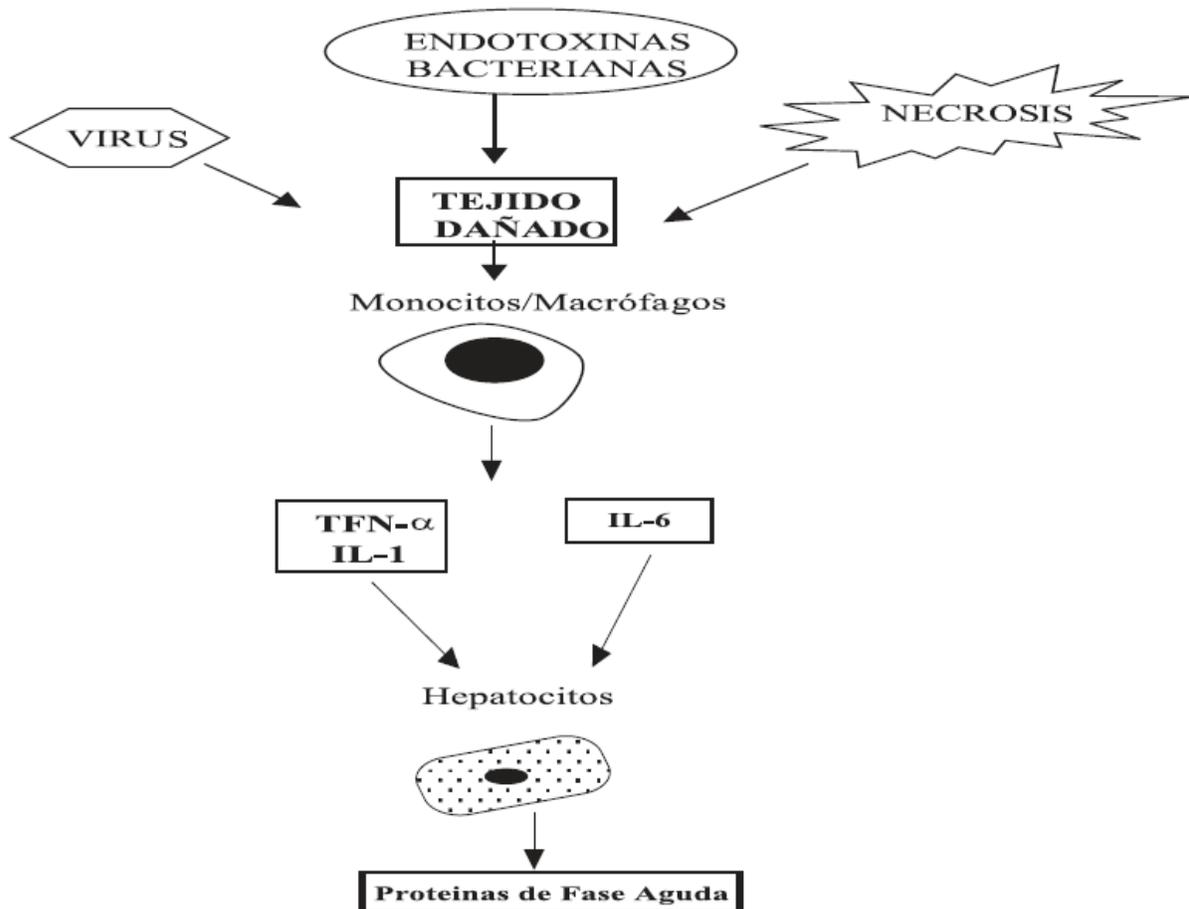
## 2.2. PROTEÍNAS DE FASE AGUDA

### 2.2.1. Generalidades.

Las proteínas de fase aguda son proteínas presentes en el plasma que pueden ser utilizadas para el diagnóstico, monitorización, evolución y respuesta al tratamiento de diversas

patologías que cursan con inflamación mediante la medición de su concentración. Son sintetizadas y liberadas por los hepatocitos a partir del estímulo de citocinas como la IL-6, siendo las principales: haptoglobina, proteína C reactiva, amiloide A sérico, ceruloplasmina, alfa1-glicoproteína ácida y el fibrinógeno (Martínez, *et al.*, 2001; Farreras & Rozman, 2012).

**Figura 6:** Producción de proteínas de fase aguda a partir del foco de la lesión.



**Fuente:** Martínez, *et al.*, 2001.

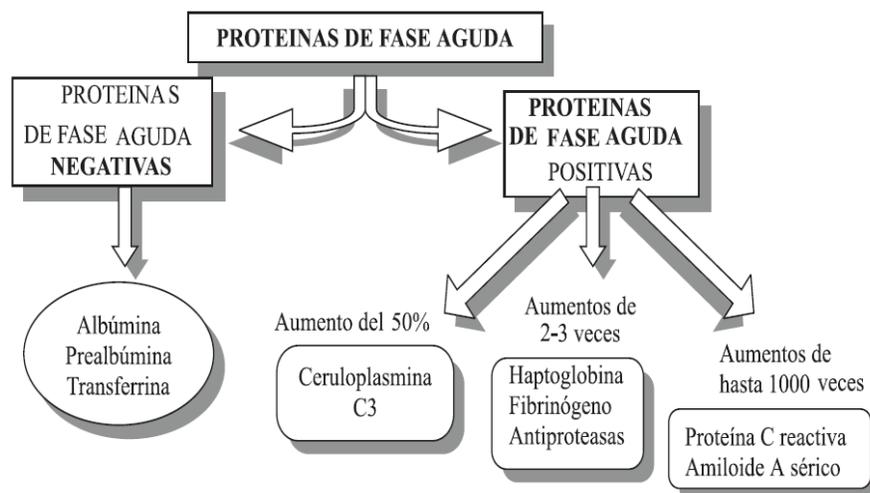
### 2.2.2. Clasificación.

Las proteínas de fase aguda pueden clasificarse de la siguiente manera:

**2.2.2.1. Por el tipo de respuesta cuantitativa al estímulo.** Positivas como la ceruloplasmina C3, haptoglobina, fibrinógeno, antiproteasas, proteína C reactiva y amiloide A sérico; y Negativas como la albúmina, prealbúmina y transferrina (Martínez, *et al.*, 2001).

**2.2.2.2. Por la función biológica que desempeñan.** Proteínas que intervienen en la defensa del hospedador como la PCR, amiloide A sérico, componentes del complemento y fibrinógeno; proteínas inhibidoras de las serinproteasas que limitan la actividad de las enzimas de las células fagocíticas protegiendo la integridad del tejido y son:  $\alpha$ 1-antitripsina y  $\alpha$ 1-antiquimotripsina; y proteínas transportadoras con actividad antioxidante como la ceruloplasmina, haptoglobina y hemopexina (Martínez, *et al.*, 2001).

**Figura 7:** Clasificación de las proteínas de fase aguda según la respuesta cuantitativa.



**Fuente:** Martínez, *et al.*, 2001.



### **2.2.3. Proteína C reactiva.**

#### **2.2.3.1. Concepto y estructura.**

Llamada así por primera vez en el año de 1930, por su capacidad de reaccionar con el polisacárido C de la cápsula del neumococo durante la fase aguda de la neumonía neumocócica, en la que su concentración plasmática aumenta drásticamente. Es una proteína plasmática (globulina) de masa molecular de 118 kDa, con estructura pentamérica, es decir, compuesta por 5 subunidades globulares cíclicas idénticas de 23 kDa cada una, unidas por enlaces no covalentes y está clasificada dentro de la superfamilia de las pentraxinas. Es sintetizada principalmente por los hepatocitos y en menor medida por los adipocitos, bajo el estímulo de IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  producidos por monocitos y macrófagos del tejido en respuesta al proceso inflamatorio (Martínez, *et al.*, 2001; Domínguez & Patiño, 2008; de Mingo, 2011). Estudios recientes sostienen que también se produce en las células musculares lisas de las arterias coronarias y se expresa principalmente en los vasos lesionados (Velarde, Carrizo, Prado, Díaz, Fonio, Bazán y Abregú, 2010). Fue aislada y caracterizada por primera vez del suero bovino a pesar de que en esta especie no reacciona marcadamente durante una respuesta de fase aguda como en otras especies (Martínez, *et al.*, 2001).

#### **2.2.3.2. Fisiología.**

Se la asocia con la aterogénesis debido, entre otros procesos, a su unión a enzimas de lipoproteínas de baja densidad LDL-c oxidadas con la formación de células espumosas que son



parte de las lesiones ateroscleróticas. Sus principales funciones biológicas son: activación del complemento, opsonización bacteriana, modulación de monocitos y macrófagos, producción de citoquinas, inducción de la expresión de moléculas de adhesión, unión a cromatina bacteriana y prevención de migración tisular de neutrófilos (Domínguez & Patiño, 2008; Crossley, Coloma, Ríos & González, 2010). También se considera que desempeña una función importante en la inmunidad innata como un mecanismo de defensa temprano (de Mingo, 2011).

### ***2.2.3.3. La PCR como indicador de inflamación.***

Los niveles incrementados de PCR, son un importante marcador clínico tanto en enfermedades inflamatorias no infecciosas como en las infecciosas (Domínguez & Patiño, 2008). Con excepción del fallo hepático agudo, la PCR se incrementa siempre que haya un proceso inflamatorio y su índice de concentración plasmática depende de la duración del estímulo y de la respuesta hepática. En el ser humano, se encuentra normalmente en niveles séricos menores de 10 mg/L (Domínguez & Patiño, 2008; de Mingo, 2011). En algunos estudios, la forma ultrasensible de la PCR (PCRus) en la mayoría de los individuos normales, presenta cifras no mayores a 1 mg/L e incluso, en otros estudios, se encuentran como promedio cifras menores a ésta (0,26 mg/L). La determinación de esta proteína puede dar valores que clasifican a las patologías según su riesgo, como por ejemplo, en enfermedades cardiovasculares (ECV) en las que se consideran de bajo riesgo valores de PCRus menores a 1 mg/L, de riesgo promedio entre 1 y 3 mg/L y de riesgo alto entre 3 y 10 mg/L. Si los valores obtenidos superan los 10 mg/L, se debe repetir la prueba o indagar en busca de posibles enfermedades inflamatorias o infecciosas



que justifiquen este valor (Domínguez & Patiño, 2008). Frente al estímulo inflamatorio, los valores de PCR aumentan en las primeras 4 a 6 horas, se duplican cada 8 horas, alcanzan el pico máximo a las 36 a 50 horas y ante un estímulo muy intenso pueden llegar a ser hasta de 500 mg/L. Al desaparecer el estímulo inflamatorio, la PCR cae rápidamente pues tiene un período de vida de 19 horas; no obstante, puede permanecer elevada su concentración por largos períodos de tiempo si la causa de su incremento persiste, lo que hace que pueda ser útil también como marcador evolutivo en las enfermedades inflamatorias (de Mingo, 2011).

Esta proteína puede incrementar su concentración rápidamente hasta 1.000 veces debido a procesos infecciosos, traumas, cirugías y otros eventos inflamatorios agudos. En el caso de enfermedades de evolución crónica como tumores o enfermedades autoinmunes, puede mantener sus valores constantes y persistentes. Posee un gran significado práctico pues su rango de concentración normal y anormal no varía y no se encuentra influenciado por alteraciones en las proteínas sanguíneas; como si ocurre en la velocidad de eritrosedimentación (VSG) que permanece elevada aún en ausencia de inflamación, como por ejemplo: en cuadros de anemia debido a la disminución del número de eritrocitos, en el embarazo debido al incremento del fibrinógeno y en nefrosis debido a la pérdida de albúmina y al relativo incremento de globulinas (Marín, Moya, Campos & Alfaro, 2002). Estudios recientes realizados en humanos como el de Allin, *et al.*, 2009, sugieren que la PCR elevada es un potencial biomarcador de un riesgo mayor de cáncer (Crossley, *et al.*, 2010).



En perros sanos, según diversos autores, las concentraciones plasmáticas de PCR no deben superar los 12 mg/L, no se han encontrado diferencias significativas entre machos y hembras y entre animales de diferentes edades (Muñoz, 1995).

Se considera una de las principales proteínas reactantes de fase aguda en perros y cerdos y en especial en la primera especie, en la que sus niveles se incrementan incluso más rápidamente que en humanos frente a diversos estímulos como: la cirugía, inyección de caseína y turpentina, en diversas patologías infecciosas bacterianas (leptospirosis, enteritis bacteriana y hemorrágica), víricas (parvovirus) y parasitarias (erlichiosis), en procesos tumorales y en infecciones experimentales con *Bordetella bronchiseptica* (Martínez, *et al.*, 2001).

Como marcador pronóstico, se ha demostrado que la PCR se incrementa en síndromes coronarios agudos, significando su aumento un mal pronóstico tanto a corto como a largo plazo (de Mingo, 2011). “También la PCRus es considerada un predictor de mortalidad cardiovascular” (Velarde, *et al.*, 2010, p. 45).

## **2.2.4. Fibrinógeno.**

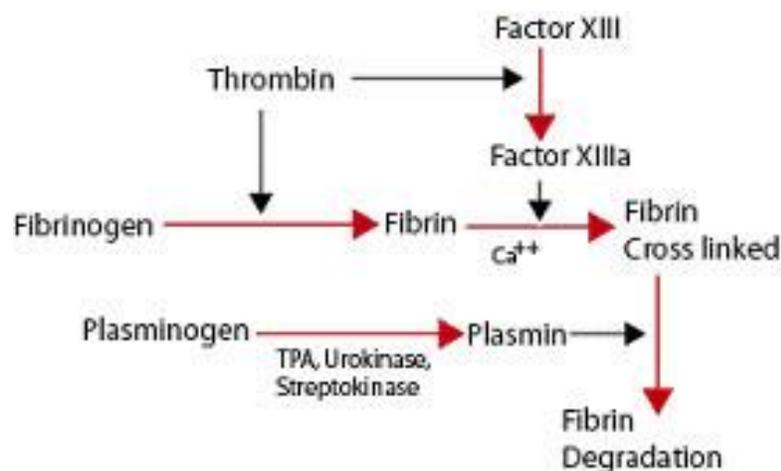
### **2.2.4.1. Concepto.**

Es una proteína reactante de fase aguda, con activa participación en la función endotelial, trombosis e inflamación y es el factor I de la cascada de la coagulación (Milla, 2013). Junto con los cambios vasculares secundarios a una lesión, se activa la cascada de la coagulación debido a

la lesión endotelial y a la liberación del factor tisular (FT) que abunda en las células que rodean el lecho vascular (fibroblastos y músculo liso) y que interactúa con el factor VII de la coagulación (proconvertina), siendo estos dos factores considerados en la actualidad como la piedra angular de la activación de los procesos coagulatorios. La activación de la cascada de la coagulación, finaliza con la formación y diseminación de grandes cantidades de trombina encargada de degradar moléculas de fibrinógeno para obtener hebras de fibrina que dan lugar a la formación de un coágulo insoluble (León, *et al.*, 2015).

Fue durante años la única proteína de fase aguda conocida y detectable, que se incrementa en los procesos inflamatorios pero cuyo patrón de producción y liberación es diferente en las distintas especies de animales y en los distintos procesos patológicos (Martínez, *et al.*, 2001).

**Figura 8:** Cascada de coagulación de proteínas.

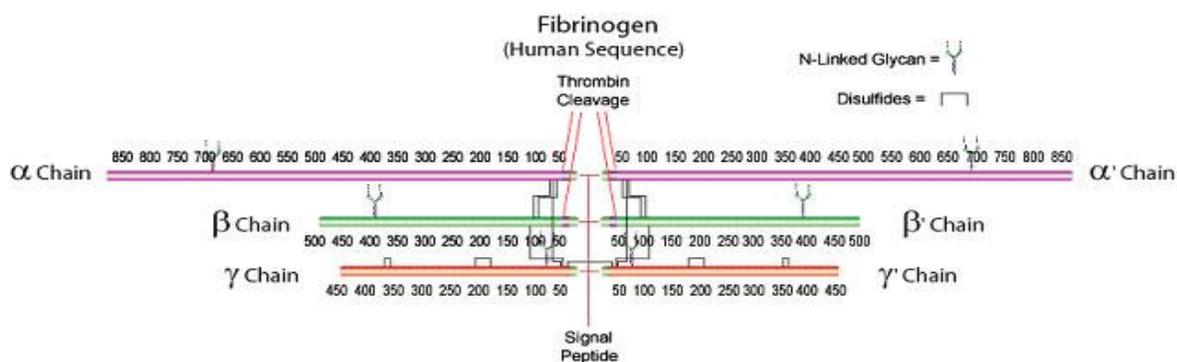


**Fuente:** Milla, 2013.

### 2.2.4.2. Estructura y fisiología.

El fibrinógeno es una glicoproteína dimérica con peso molecular de 340 kDa con una estructura de tres cadenas polipeptídicas (alfa, beta y gamma), las dos subunidades están compuestas de un dominio D que contiene una región globular y un dominio E que contiene un enlace disulfuro que une ambas subunidades. Sintetizada principalmente por los hepatocitos, su principal función en la coagulación es transformarse, por acción de la trombina, en fibrina insoluble. Tiene una vida media de 100 horas (3 a 6 días), en humanos sus niveles plasmáticos de 150 a 450 mg/dL superan las concentraciones mínimas de 50 a 100 mg/dL que se requieren para producir hemostasia, pero en patologías inflamatorias puede incrementar 2 a 20 veces su valor normal. Durante esta respuesta se observan cifras anormales a los 3 a 5 días de iniciada la inflamación y desciende gradualmente, retornando a su nivel basal una vez resuelta la injuria. Su catabolismo está mediado por plasmina, que al actuar sobre el fibrinógeno y la fibrina, genera productos de degradación D y E que estimulan la producción de macrófagos, IL-6 y otros factores, los que a su vez activan a los hepatocitos para incrementar su síntesis (Milla, 2013).

**Figura 9:** Molécula de fibrinógeno humana.



**Fuente:** Milla, 2013.



### 2.2.4.3. *Uso diagnóstico.*

Sus valores pueden ser medidos en sangre venosa. Los niveles normales en humanos varían entre 150 a 400 mg/dL, dependiendo del método usado para su medición (Milla, 2013). Según Quesada (2012), a pesar de que en pacientes caninos clínicamente sanos pueden encontrarse valores desde 103 hasta 486 mg/dL, los valores referenciales de fibrinógeno se consideran entre 149 a 298 mg/dL. Otros autores sugieren diferentes valores referenciales para esta proteína en caninos, por ejemplo: entre 100 y 400 mg/dL según Sodikoff (2002); entre 100-500 mg/dL según Bush (1999) y Trall (2004); y entre 200 a 400 mg/dL según Kirk, *et al.*, (1995) (Quesada, 2013). En circunstancias normales, el fibrinógeno es medido usando muestras de plasma citratado en el laboratorio, sin embargo también se pueden analizar muestras de sangre completa usando la técnica de tromboelastometría en la que se inhibe la función plaquetaria usando citocalasina D (Milla, 2013).

En humanos, los niveles más altos están asociados con enfermedad cardiovascular (> 343 mg/dL) debido a que esta proteína juega un papel importante en la agregación plaquetaria, en la viscosidad plasmática y en la formación de fibrina; pero en general, puede estar elevada en cualquier forma de inflamación ya que es un reactante de fase aguda, por ejemplo en el tejido gingival humano durante la fase inicial de la enfermedad periodontal. De manera fisiológica, los niveles de fibrinógeno aumentan durante el embarazo en un promedio de 450 mg/dL, en comparación con un promedio de 300 mg/dL en mujeres no embarazadas (Velarde, *et al.*, 2010; Milla, 2013). De manera patológica, en enfermedades hepáticas como atrofía amarilla aguda, cirrosis hepática y hepatitis de diversas causas, con gran destrucción del parénquima hepático, el



nivel plasmático de esta proteína se encuentra disminuido y no aumentado, por lo que en estos casos no tendrá un comportamiento común ante la infección. En los casos de enfermedades hepáticas con lesión moderada del parénquima el fibrinógeno si se incrementará ante los mecanismos inflamatorios (Muzzo, 1943).

En caninos de manera fisiológica, en estados de gestación (primeros 28 a 37 días) y lactancia, caracterizados por un mayor consumo de agua en el organismo, mediado por hormonas (estrógenos, aldosterona), declinan los valores del eritrograma con incremento de la eritrosedimentación y como consecuencia del fibrinógeno (Coppo, 2010; Quesada, 2013). De manera patológica, el fibrinógeno incrementa en todos los procesos inflamatorios excepto en aquellos que cursan con fallo hepático agudo. En el perfil bioquímico sanguíneo de 6 caninos con cirrosis hepática, el fibrinógeno se encontró significativamente más bajo que los valores de referencia para esta especie (Elhiblu, Dua, Mohindroo, Mahajan, Sood & Dhaliwal, 2015).



## **CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. MATERIALES**

#### **3.1.1. Lugar de la investigación.**

La investigación se realizó en la Clínica de Especialidades Caninas y Felinas CLINICAN, ubicada en las calles Diez de Agosto y Hortencia Mata, Parroquia Yanuncay, Cantón Cuenca, Provincia del Azuay, en donde los caninos fueron atendidos y su leucograma fue elaborado en el respectivo laboratorio de la clínica. La medición de las concentraciones de fibrinógeno y PCR se realizó en el Laboratorio Clínico JJPAZ, ubicado en la Avenida Loja 2-114 y Galápagos, Parroquia Sucre, Cantón Cuenca, Provincia del Azuay.

#### **3.1.2. Período de la investigación.**

La investigación estuvo vigente durante un período de 13 meses comprendidos entre julio de 2015 y agosto de 2016.



### **3.1.3. Recursos.**

#### **3.1.3.1. *Animales.***

- Los 69 caninos: 39 aparentemente sanos y 30 afectados por un proceso inflamatorio.

#### **3.1.3.2. *Biológicos.***

- Las 207 muestras sanguíneas, 3 por paciente, tanto para el leucograma como para la medición de fibrinógeno y PCR en cada paciente.

#### **3.1.3.3. *Físicos.***

- Fichas clínicas.
- Agujas hipodérmicas 20G, 18G y 16G.
- Tubos EDTA (lila), Citrato Sódico (azul) y Serum (rojo).
- Pipetas de dilución de Thoma para glóbulos blancos.
- Cámara de Neubauer.
- Portaobjetos.
- Olympus CX21, microscopio óptico.
- Contador manual de 4 dígitos.
- Laboratory DC Counter, contador manual de glóbulos blancos.
- HuMax 3K Human, centrífuga.
- Cubetas.
- Pipetas de 5  $\mu$ L, 25  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 225  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L.



- CoaData 504, coagulómetro para medición cuantitativa de fibrinógeno.
- Mindray BS-130, equipo para determinación cuantitativa de PCR.
- Hoja de reporte de resultados.
- Materiales de oficina.

#### **3.1.3.4. Químicos.**

- Diluyente para glóbulos blancos.
- Tinción Diff Quick
- Aceite de inmersión
- Reactivos para la medición de fibrinógeno y de PCR.

#### **3.1.4. Universo.**

El universo está constituido por todos los caninos con enfermedad inflamatoria de la ciudad de Cuenca-Ecuador.

#### **3.1.5. Muestra.**

El estudio se realizó con una muestra de 69 caninos divididos en dos grupos: un grupo control conformado por 39 caninos aparentemente sanos, 20 hembras y 19 machos, con edades comprendidas entre 5 meses y 12 años; y un grupo de 30 caninos con enfermedad inflamatoria, 12 hembras y 18 machos, con edades comprendidas entre 2 meses y 17 años, todos ellos



atendidos en la Clínica de Especialidades Caninas y Felinas CLINICAN en un período de 13 meses comprendidos entre julio de 2015 y agosto de 2016. El tamaño de la muestra se determinó por el tiempo en el que el estudio estuvo vigente (estudio prospectivo para 13 meses).

### *3.1.5.1. Criterios de inclusión.*

Para el grupo control:

- Pacientes caninos de cualquier edad, raza o sexo.
- Pacientes clínicamente sanos y sometidos a observación.
- Pacientes que no hayan usado medicación reciente y que no hayan padecido de algún proceso patológico del que estén todavía convalecientes.
- Pacientes que no presenten patologías crónicas o incurables que estén siendo controladas con medicación.
- Pacientes mantenidos en un lugar tranquilo y libre de estrés antes, durante y después del procedimiento.
- Pacientes que presenten valores dentro del rango normal en el leucograma.
- Hembras no gestantes.

Para el grupo con inflamación:

- Pacientes de cualquier edad, raza o sexo.



- Pacientes que mediante evaluación clínica presenten signología inflamatoria como malestar general, letargo e hipertermia, a más de aquella propia de cada patología que variará según el caso (diarrea, vómito, secreciones nasales, entre otras).
- Pacientes que no estén siendo tratados con algún tipo de antiinflamatorio, ya sea esterooidal o AINES.
- Pacientes que no estén siendo tratados con antimicrobianos como eritromicina y tetraciclina, con antihistamínicos, con butabarbital o fenobarbital y con vitamina K.
- Pacientes que no presenten cuadros inflamatorios de causa hepática estructural.
- Pacientes mantenidos en un lugar tranquilo y libre de estrés antes, durante y después del procedimiento.
- Pacientes en los que mediante un leucograma, obtenido en el momento de su ingreso a la clínica, se determine un cuadro inflamatorio representado por una leucocitosis por neutrofilia y la presencia de un número excesivo de neutrófilos juveniles (desviación a la izquierda).
- Hembras no gestantes.

### ***3.1.5.2. Criterios de exclusión.***

Serán todos aquellos criterios que no permitan incluir a un individuo dentro del grupo de estudio.



## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Tipo de estudio.

Estudio observacional, transversal, analítico. Estudio de casos y controles prospectivo (planteamiento inicial de 13 meses).

### 3.2.2. Variables estudiadas.

#### 3.2.2.1. *Variable independiente.*

La variable independiente es la presencia o ausencia de inflamación: Inflamación (1) o Control (0). Es una variable cualitativa nominal dicotómica.

#### 3.2.2.2. *Variables dependientes.*

Las variables dependientes o de resultado principal son: el nivel sérico de PCR y el nivel plasmático de Fb medidos en pacientes con inflamación y en pacientes sanos. Son variables cuantitativas continuas.

### 3.2.3. Muestreo.

Al momento del ingreso del paciente, se comprobó mediante evaluación clínica si éste era un candidato para pertenecer a la población estudio (sanos o con inflamación). Se abrió un registro de cada paciente recopilando información sobre sus antecedentes (edad, raza, sexo,



entero/castrado, número de gestaciones anteriores), anamnesis, historial de enfermedades y tratamientos anteriores y los hallazgos obtenidos en consulta. Los pacientes candidatos, tanto para el grupo de sanos (control) como para el grupo con inflamación, fueron atendidos en un lugar tranquilo, libre de sonidos fuertes y de otros animales que pudiesen ponerlos en alerta. Esperando a que el animal se acostumbre a nuestra presencia (ejecutor y ayudante), se iniciaron los procedimientos de toma de muestra para la elaboración del leucograma que verificó si el paciente finalmente pertenece o no a la población de estudio. Para el grupo control se esperó a que el leucograma realizado presente todos los valores dentro del rango normal adoptado por el laboratorio, es decir, que a pesar de que se haya comprobado la perfecta salud del paciente mediante la ausencia de signología de enfermedad en consulta y un historial libre de patologías crónicas o recientes, el leucograma no revele ninguna alteración que pueda justificarse por una patología subclínica o por un nivel alto de estrés en el momento de la toma de la muestra.

Para el grupo con inflamación, se esperó a que el leucograma presente un aumento del nivel de leucocitos sobre el rango normal que se justifique por un elevado nivel de neutrófilos maduros y de neutrófilos juveniles, tomando en consideración que los otros niveles de células blancas podían estar también elevados. Una vez confirmado el cuadro inflamatorio (grupo con inflamación) o un aparente estado de salud (grupo control), se inició el procedimiento de toma de muestras para la medición de Fb y PCR a las 12 horas del ingreso del paciente y esperando a que éste se encuentre relajado y cómodo con el procedimiento. No se tomó en consideración el inicio exacto de la signología y por ende de la enfermedad, pues los datos obtenidos de los propietarios están afectados por múltiples factores que se mantienen fuera del control del investigador.



### **3.2.4. Técnicas y procedimientos.**

#### ***3.2.4.1. Valoración clínica.***

El empleo de una buena exploración física y un adecuado registro de los datos en el historial, es de gran importancia para la valoración clínica del paciente. Es por esta razón que deben considerarse todos los aspectos relevantes de la condición física para determinar con certeza la presencia o ausencia de enfermedad en un canino. Los aspectos considerados fueron: actitud, temperamento y estado mental, peso y condición corporal, pulso, frecuencia cardíaca y respiratoria, temperatura, mucosas, grado de hidratación, exploración de ganglios linfáticos, palpación abdominal y auscultación cardíaca y respiratoria.

#### ***3.2.4.2. Leucograma manual.***

Es el análisis formado por el recuento manual total (WBC) y diferencial (fórmula leucocitaria) de los glóbulos blancos o leucocitos en sangre periférica (Campuzano, 2007).

##### ***3.2.4.2.1. Toma de muestra.***

Obtención de 1 mL de sangre periférica colectada de la vena braquial o yugular en un tubo microtainer de tapa lila que contiene EDTA, utilizando una aguja 20G para perros pequeños, 18G para perros medianos y 16G para perros grandes. La muestra debidamente homogenizada, fue sometida a un recuento manual de los componentes sanguíneos de la línea



blanca y a la determinación de la fórmula leucocitaria, en el laboratorio de la Clínica de Especialidades Caninas y Felinas CLINICAN.

#### *3.2.4.2.2. Técnica.*

##### *3.2.4.2.2.1. Recuento total de glóbulos blancos (WBC).*

Consiste en determinar la cantidad de glóbulos blancos por litro de sangre periférica (Campuzano, 2007). El resultado obtenido se expresa como el número de leucocitos  $\times 10^9/L$ , de acuerdo con el sistema de unidades adoptado por el laboratorio clínico de la Clínica de Especialidades Caninas y Felinas CLINICAN.

#### Materiales:

- Pipeta de dilución de Thoma para glóbulos blancos.
- Diluyente para glóbulos blancos.
- Cámara de Neubauer.
- Olympus CX21, microscopio óptico.
- Contador manual de 4 dígitos.

#### Procedimiento:

- Homogenizar la muestra.
- Pipetear la muestra hasta 0,5 con la pipeta de Thoma.
- Completar hasta 11 con el diluyente para glóbulos blancos.
- Homogenizar el preparado de la pipeta hasta su completa dilución.



- Colocar la tercera o cuarta gota en la cámara de Neubauer.
- Observar en el microscopio y realizar el conteo de leucocitos de los cuadrantes L1, L2, L3 y L4 utilizando el contador manual de 4 dígitos.

Cálculo: El número total obtenido del conteo de los cuadrantes, se multiplica por 50 (valor constante) y el resultado se divide para 1000 (valor constante). Se obtiene entonces el número de leucocitos  $\times 10^9/L$ .

$$\frac{(\text{Número de leucocitos contados}) \times 50}{1000} = \text{WBC } (\times 10^9/L)$$

Valores de referencia: Los valores de referencia para este elemento, tanto en caninos adultos como en cachorros y manejados por el laboratorio del estudio son: de 6 a 17 leucocitos  $\times 10^9/L$  de sangre.

#### 3.2.4.2.2.2. Recuento diferencial de glóbulos blancos (Fórmula leucocitaria).

Corresponde a la concentración de las subpoblaciones de glóbulos blancos en sangre periférica que son: polimorfonucleares neutrófilos maduros y sus variaciones juveniles, polimorfonucleares eosinófilos, polimorfonucleares basófilos, linfocitos y monocitos (Campuzano, 2007).

Materiales:

- Portaobjetos.
- Tinción Diff Quick.



- Aceite de inmersión.
- Olympus CX21, microscopio óptico.
- Laboratory DC Counter, contador manual de glóbulos blancos.

Procedimiento:

- Homogenizar la muestra.
- Colocar una gota de la muestra en un portaobjetos.
- Realizar el extendido sanguíneo en una monocapa y de manera que tenga cabeza, cuerpo y cola.
- Dejar secar el extendido por 10 minutos.
- Teñir con Diff Quick utilizando sus tres componentes: 1) Solución Diff Quick Fijador (tinte de triarilmetano y metanol al 95%) por 1 minuto; 2) Solución Diff Quik I o eosinofílica (colorante de xanteno, tampón de pH y azida sódica) por 1 minuto; y 3) Solución Diff-Quik II o basófila (tiazina y tampón de pH) por 1 minuto más y enjuagar con agua destilada.
- Dejar secar el extendido teñido por 10 minutos.
- Colocar una gota de aceite de inmersión sobre el extendido y observar al microscopio.
- Realizar el conteo de los subtipos leucocitarios contenidos en un total de 100 células blancas, utilizando el contador manual de glóbulos blancos (Laboratory DC Counter).



Cálculo: El número de células contadas en cada subtipo leucocitario contenido en 100 células, representa el porcentaje de dicho subtipo (fórmula leucocitaria relativa) y sus proporciones correspondientes y contenidas en el número total de glóbulos blancos (WBC), obtenido previamente y que representa el 100%, serán el número de leucocitos reales de cada subtipo leucocitario (fórmula leucocitaria absoluta) y se expresan en las mismas unidades que el WBC ( $\times 10^9/L$ ).

Valores de referencia: Sus valores referenciales tanto en caninos adultos como en cachorros y manejados por el laboratorio del estudio son: Neutrófilos Segmentados 3 a 11,5  $\times 10^9/L$ , Neutrófilos Juveniles 0 a 0,3  $\times 10^9/L$ , Basófilos  $<0,1 \times 10^9/L$ , Linfocitos 1 a 4,8  $\times 10^9/L$ , Monocitos 0 a 1,4  $\times 10^9/L$  y Eosinófilos 0 a 0,9  $\times 10^9/L$ .

### ***3.2.4.3. Medición de fibrinógeno.***

#### ***3.2.4.3.1. Toma de muestra.***

Obtención de 1,7 mL de sangre periférica colectada de la vena braquial o yugular en un tubo de 3 mL de tapa azul que contiene citrato sódico al 3,2% (respetando la proporción de 9 partes de sangre y 1 de citrato), utilizando una aguja 20G para perros pequeños, 18G para perros medianos y 16G para perros grandes. La muestra debidamente homogenizada se envió al laboratorio JJPAZ en la siguiente hora a su extracción, para la medición de fibrinógeno mediante el método coagulométrico de Clauss en el equipo Analizador de 1 canal para ensayos de coagulación CoaDATA 504.



#### 3.2.4.3.2. Método de Von Clauss.

El método de Von Clauss mide el índice de conversión del fibrinógeno en fibrina en presencia de un exceso de trombina y ha demostrado ser una prueba rápida, sensible y exacta. Cuando el plasma diluido se coagula por exceso de trombina, el nivel de fibrinógeno es inversamente proporcional al tiempo de coagulación (LINEAR CHEMICALS, S.L., 2015).

#### Materiales:

- Cubetas específicas del equipo.
- Pipetas de 25  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L y 225  $\mu$ L.
- CoaDATA 504, coagulómetro.

#### Reactivos (R):

- R1-Fibrinógeno: Trombina bovina liofilizada  $\approx$ 100 NIH U/mL en tampón, estabilizantes y conservantes.
- R2-Imidazole: Tampón de imidazol, estabilizantes y conservantes. Listo para su uso.
- R3-Optativo: Plasma control level 1 Ref. 3520101 y Plasma control level 2 Ref. 3520201 (LINEAR CHEMICALS, S.L., 2015).

#### Reconstitución de reactivos:

- Se reconstituye el vial de Fibrinógeno (**R1**) con 2.0 mL de agua destilada.



- Tapar el vial y agitar suavemente hasta disolver su contenido evitando la formación de espuma.
- Mantener 30 minutos a temperatura ambiente antes de su uso.

Procedimiento:

- Se obtiene el plasma colocando la muestra de sangre bien homogenizada en la centrífuga durante 15 minutos a 2.500 x g.
- Se transfiere el plasma a un tubo de plástico. Plasmas hemolizados o con más de 10,000 plaquetas por mL, no deben usarse en pruebas de coagulación.
- Preparar una dilución 1:10 con 25 µL del plasma de la muestra y otra del plasma control (Level 1, Level 2) con 225 µL del diluyente Tampón de imidazol (**R2**).
- Encender el coagulómetro y seleccionar la prueba.
- Atemperar el equipo a 37°C.
- Pipetear 100 µL de plasma diluido en una cubeta.
- Incubar el plasma a 37°C durante 2 minutos.
- Esperar 1 minuto hasta que en la pantalla del equipo aparezca la palabra **GO**.
- Inmediatamente adicionar 50 µL del reactivo de fibrinógeno precalentado (**R1**).
- Esperar y leer el resultado.
- Registrar el tiempo de coagulación que reporta la pantalla del equipo.
- Anotar el resultado obtenido de fibrinógeno en mg/dL.
- Es recomendable realizar la medición por duplicado (LINEAR CHEMICALS, S.L., 2015).



Valores de referencia: En caninos de cualquier edad, raza o sexo, los valores referenciales adoptados por el laboratorio del estudio son valores entre 100 a 400 mg/dL, excepto en hembras gestantes en las que estos valores son superiores, razón por la cual fueron excluidas del estudio.

Control de calidad: Se realiza incluyendo en cada serie los Plasmas control valorados (Level 1 y Level 2), mencionados anteriormente y que se tratan como muestras problema (LINEAR CHEMICALS, S.L., 2015).

Se han publicado numerosos artículos que reconocen al método de von Clauss como el más idóneo por su gran precisión, rapidez, reproducibilidad y sensibilidad en los resultados. En un estudio comparativo entre el método de Von Clauss y el de Quick, el primero resultó lineal, preciso, exacto y específico. Las determinaciones se realizaron en un menor tiempo, ahorrando significativamente los recursos, determinando una mayor repetibilidad, reproducibilidad y precisión en los resultados, que posibilitaron la introducción de esta técnica para el establecimiento de valores de referencia (Zamora, Rodríguez, Castillo, Almagro, Agramonte, Fonseca, Tejeda & Graña, 2010).



### **3.2.4.4. Medición de PCR.**

#### **3.2.4.4.1. Toma de muestra.**

Obtención de 2 mL de sangre periférica colectada de la vena braquial o yugular en un tubo de 3 mL de tapa roja (serum), utilizando una aguja 20G para perros pequeños, 18G para perros medianos y 16G para perros grandes. La muestra se envió al laboratorio JJPAZ, en la siguiente hora a su extracción, para la medición de PCR mediante un ensayo turbidimétrico conocido como PCR–Turbilátex, con el equipo especializado Mindray BS-130.

#### **3.2.4.4.2. Método PCR-Turbilátex.**

PCR–Turbilátex es un ensayo turbidimétrico para la cuantificación de proteína C reactiva en suero o plasma. Las partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-PCR, reconocen los epítopes antigénicos en la PCR formando un inmunocomplejo Anti-PCR-PCR. El proceso de aglutinación provoca un cambio de absorbancia que es directamente proporcional a la concentración de la PCR presente en el suero problema, y por comparación con un calibrador de PCR de concentración conocida, se determina el contenido de esta proteína en la muestra ensayada (SPINREACT, S.A., 2015).

Materiales:

- Cubetas específicas del equipo.
- Pipetas de 5  $\mu$ L, 100  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L.



- Equipo especializado Mindray BS-130.

Reactivos (R):

- R1-Diluyente: Tampón Tris 20mmol/L, pH 8,2. Conservante.
- R2-Látex: Partículas de látex cubiertas de IgG de cabra anti – PCR, pH 7.3. Conservante.
- R3-PCR-CAL: Calibrador Referencia 1107002. La concentración de PCR viene indicada en la etiqueta del vial.
- R4-Opcional: Ref: 1102114 Suero Control ASO/PCR/FR/Nivel L y Ref: 1102115 Suero Control ASO/PCR/FR/Nivel H (SPINREACT, S.A., 2015).

Reconstitución de reactivos:

Se reconstituye únicamente el Calibrador PCR Referencia 1107002 mezclando el liofilizado con 1 mL de agua destilada, agitándolo con suavidad y dejándolo reposar 10 minutos antes de usarlo.

Procedimiento:

- Se obtiene el suero sanguíneo mediante el reposo de la muestra durante 20 minutos y luego por centrifugación a 1000 x g durante 15 minutos.
- El suero con restos de fibrina debe centrifugarse nuevamente y no se utilizan muestras altamente hemolizadas o lipémicas.
- Se prende el equipo durante 10 minutos previos a su uso, para calentar la lámpara.



- Se pipetea en una cubeta: 900  $\mu$ L de Diluyente (**R1**) más 100  $\mu$ L de Látex (**R2**) y se calientan a 37°C por 2 minutos.
- Añadir 5  $\mu$ L de calibrador, suero control (Nivel L, Nivel H) o suero muestra.
- El equipo absorbe parte del preparado final y realiza la lectura automática que es inmediata, pero que de forma didáctica se explica de la siguiente manera: el equipo lee la absorbancia frente al blanco inmediatamente (A1) y a los dos minutos (A2) de efectuada la mezcla. El cálculo es el siguiente:

$$\frac{(A2 - A1)muestra}{(A2 - A1)calibrador} \times \text{Concentración del calibrador} = \text{mg/L}$$

- El resultado de PCR aparece en la pantalla del equipo en mg/L (SPINREACT, S.A., 2015).

Valores de referencia: En caninos de cualquier edad, raza o sexo, los valores referenciales adoptados por el laboratorio del estudio son valores inferiores a 5 mg/L, excepto en hembras gestantes en las que estos valores son superiores, razón por la cual fueron excluidas del estudio.

Control de calidad: Se realiza utilizando los sueros control Ref: 1102114 Suero Control ASO/PCR/FR/Nivel L y Ref: 1102115 Suero Control ASO/PCR/FR/Nivel H, mencionados anteriormente y que se tratan como muestras problema (SPINREACT, S.A., 2015).



### 3.2.5. Análisis estadístico.

Para determinar la relación e impacto del cuadro inflamatorio, entendido como la variable independiente, sobre las variables dependientes Fb y PCR y la capacidad de estas últimas de determinar si un caso de estudio está afectado por un proceso inflamatorio o no, se estableció un análisis descriptivo de los datos obtenidos y una representación gráfica de su dispersión tanto para Fb como para PCR, a más de las representaciones gráficas de los parámetros iniciales de estudio: recuento leucocitario (WBC), neutrófilos segmentados (NS) y neutrófilos juveniles (NJ), estableciendo una media o punto de corte de 0,5 para Fb y PCR representado por una concentración específica de estas proteínas, a partir de la cual, los casos pueden clasificarse en este estudio como aparentemente sanos (0 - 0,49) o con inflamación (0,5 - 1). Se empleó un cálculo de un modelo de regresión logístico que determinó la posibilidad de pertenencia de un caso al grupo de pacientes aparentemente sanos = 0 o al de los afectados por un proceso inflamatorio = 1 a partir de las concentraciones de PCR y Fb de manera individual y luego de manera conjunta, cambiando la dependencia de las variables pues en esta ocasión fueron las concentraciones de dichas proteínas (variables independientes) las que determinaron si en un canino existe un cuadro inflamatorio o se trata de un paciente aparentemente sano (presencia o ausencia de inflamación = variable dependiente) y generando con ello también la posibilidad de un modelo de predicción a partir de la lectura de dichas concentraciones. Las concentraciones de Fb y PCR del punto de corte se obtuvieron mediante manipulación algebraica del modelo. Se realizó además, a partir de dicho modelo de regresión, un cálculo de los casos pronosticados como sanos y afectados por inflamación en base a la concentración del punto de corte 0,5 para Fb y PCR, y mediante el análisis conjunto de éstos con los casos observados en inicio y basados



en la valoración clínica y el leucograma, se obtuvo un porcentaje de especificidad y sensibilidad para cada variable (Fb y PCR) en este estudio. El modelo logístico con variable binomial quedaría expresado por:

$$\Pr(\text{grupo} = \text{inf lamación}) = \frac{1}{1 + e^{-(b_0 + b_1 * \text{PCR} + b_2 * F)}} \quad (1)$$

**Fuente:** Visauta & Martori, 2003

Donde  $b_1$  y  $b_2$  son los parámetros del modelo que a su vez determinan estimaciones de los indicadores *Odds Ratio* correspondientes a cada grupo, mediante el cálculo de cada  $e^{b_i}$ , es decir, de cada parámetro estimado correspondiente a cada variable, elevada a la base de los logaritmos naturales ( $e \approx 2,718281829$ ). El modelo (1) determina la probabilidad de pertenecer a un grupo respectivo dadas las variables  $X_i$  representadas por las variables predictivas PCR y Fb. Los coeficientes se consideraron significativos para un  $p < 0,10$ .

Adicionalmente se consideró que las suposiciones del modelo (1) no implicaron normalidad, homocedasticidad, ni análisis de correlación de residuos. Este modelo fue al inicio empleado para el análisis de cada variable de manera independiente y posteriormente de manera conjunta. Las pruebas estadísticas ejecutadas e interpretadas fueron las siguientes:

- Prueba estadística de Wald.
- Razón de Verosimiludes.



- Bondad de Ajustes
- Test de Líneas Paralelas.
- Precisión de clasificación.
- Prueba Shapiro Wilk.



## CAPITULO IV: RESULTADOS

### CUADRO # 1

#### DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA EN LOS GRUPOS CONTROL Y CON INFLAMACIÓN

| GRUPOS      | FRECUENCIA | PORCENTAJE |
|-------------|------------|------------|
| CONTROL     | 39         | 56,52%     |
| INFLAMACIÓN | 30         | 43,48%     |
| TOTAL       | 69         | 100%       |

**Fuente:** Hoja de reporte de resultados

**Autora:** Investigadora

El grupo predominante es el control con un 56,52% de caninos del total de la muestra. El grupo con inflamación representa el 43,48%.



## CUADRO # 2

## DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA REPRESENTADA POR LOS GRUPOS CONTROL Y CON INFLAMACIÓN, SEGÚN EDAD

| EDAD            | CONTROL    |            | INFLAMACIÓN |            |
|-----------------|------------|------------|-------------|------------|
|                 | FRECUENCIA | PORCENTAJE | FRECUENCIA  | PORCENTAJE |
| 0 años-5 años   | 28         | 71,79%     | 13          | 43,33%     |
| 6 años-11 años  | 9          | 23,08%     | 11          | 36,67%     |
| 12 años-17 años | 2          | 5,13%      | 6           | 20,00%     |
| <b>TOTAL</b>    | 39         | 100%       | 30          | 100%       |

**Fuente:** Hoja de reporte de resultados

**Autora:** Investigadora

El rango de edad predominante es el de 0 a 5 años tanto en el grupo control como en el grupo con inflamación, en el primero con un 71,79% del total de 39 caninos y el segundo con un 43,33% del total de 30 caninos de este grupo.

**CUADRO # 3****DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA REPRESENTADA POR LOS GRUPOS CONTROL Y CON INFLAMACIÓN, SEGÚN RAZA**

| RAZA             | CONTROL    |            | INFLAMACIÓN |            |
|------------------|------------|------------|-------------|------------|
|                  | FRECUENCIA | PORCENTAJE | FRECUENCIA  | PORCENTAJE |
| <b>Raza Pura</b> | 31         | 79,49%     | 27          | 90,00%     |
| <b>Mestizos</b>  | 8          | 20,51%     | 3           | 10,00%     |
| <b>TOTAL</b>     | 39         | 100%       | 30          | 100%       |

**Fuente:** Hoja de reporte de resultados

**Autora:** Investigadora

El grupo de raza predominante es el representado por los caninos de raza pura, tanto en el grupo control como en el grupo con inflamación, en el primero con un 79,49% del total de 39 caninos y el segundo con un 90% del total de 30 caninos de este grupo.

**CUADRO # 4****DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA REPRESENTADA POR LOS GRUPOS CONTROL Y CON INFLAMACIÓN, SEGÚN SEXO**

| SEXO           | CONTROL    |            | INFLAMACIÓN |            |
|----------------|------------|------------|-------------|------------|
|                | FRECUENCIA | PORCENTAJE | FRECUENCIA  | PORCENTAJE |
| <b>Hembras</b> | 20         | 51,28%     | 12          | 40,00%     |
| <b>Machos</b>  | 19         | 48,72%     | 18          | 60,00%     |
| <b>TOTAL</b>   | 39         | 100%       | 30          | 100%       |

**Fuente:** Hoja de reporte de resultados

**Autora:** Investigadora

El grupo predominante es el de las hembras en el grupo control con un 51,28% del total de 39 caninos de este grupo; y en el grupo con inflamación, la mayor cantidad de caninos son machos con un 60% del total de 30 caninos de este grupo.



## CUADRO # 5

**DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA REPRESENTADA POR LOS GRUPOS CONTROL Y CON INFLAMACIÓN, EN RANGOS DE RECuento LEUCOCITARIO**

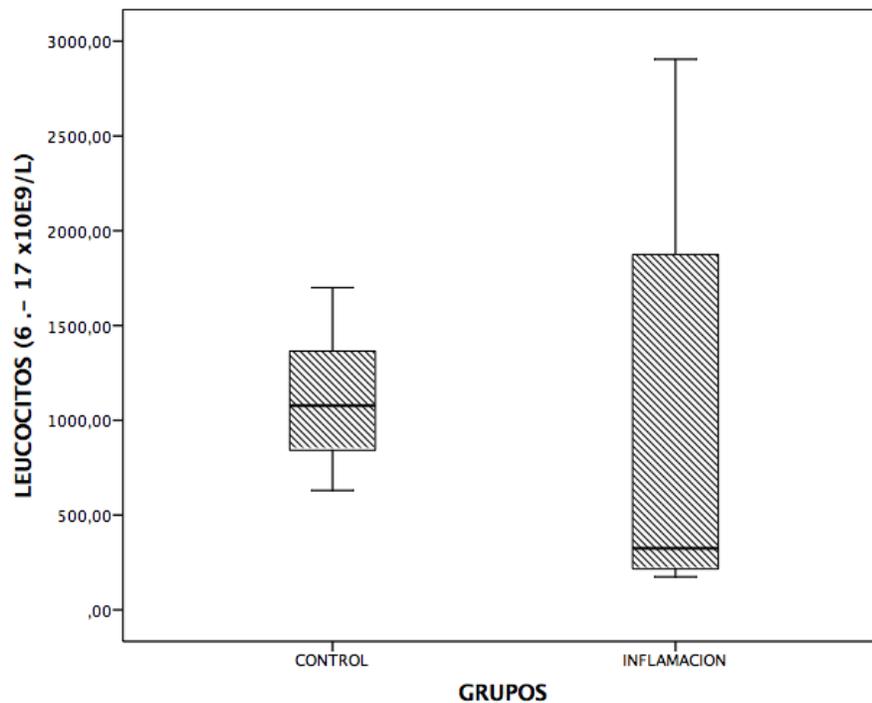
| LEUCOCITOS                    | CONTROL    |            | INFLAMACIÓN |            |
|-------------------------------|------------|------------|-------------|------------|
|                               | FRECUENCIA | PORCENTAJE | FRECUENCIA  | PORCENTAJE |
| 6 a 17 X10 <sup>9</sup> /L    | 39         | 100,00%    | 0           | 0,00%      |
| 17,1 a 28 X10 <sup>9</sup> /L | 0          | 0,00%      | 21          | 70,00%     |
| 28,1 a 39 X10 <sup>9</sup> /L | 0          | 0,00%      | 6           | 20,00%     |
| >39 X10 <sup>9</sup> /L       | 0          | 0,00%      | 3           | 10,00%     |
| <b>TOTAL</b>                  | 39         | 100%       | 30          | 100%       |

**Fuente:** Hoja de reporte de resultados

**Autora:** Investigadora

En el grupo control, el 100% de casos se encontraron en el rango de 6 a 17 X10<sup>9</sup>/L, pues este representa el rango de referencia de normalidad en el leucograma. El grupo con inflamación está distribuido en un 70% en el rango de 17,1 a 28 X10<sup>9</sup>/L, en un 20% en el rango de 28,1 a 39 X10<sup>9</sup>/L y en un 10% en el rango de >39 X10<sup>9</sup>/L.

**GRÁFICO # 1**  
**BOX PLOT PARA RECUENTO LEUCOCITARIO**



**Fuente:** Hoja de reporte de resultados

**Autora:** Investigadora

En la representación gráfica de los datos de WBC mediante Box Plot, se determinó una mayor dispersión de los datos, incluyendo algunos casos atípicos, dentro del grupo de caninos con inflamación, en comparación con el grupo control de caninos aparentemente sanos en el cual todos los datos se ubicaron dentro del rango referencial normal establecido en este estudio.



## CUADRO # 6

**DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA REPRESENTADA POR LOS GRUPOS CONTROL Y CON INFLAMACIÓN, EN RANGOS DE NEUTRÓFILOS SEGMENTADOS**

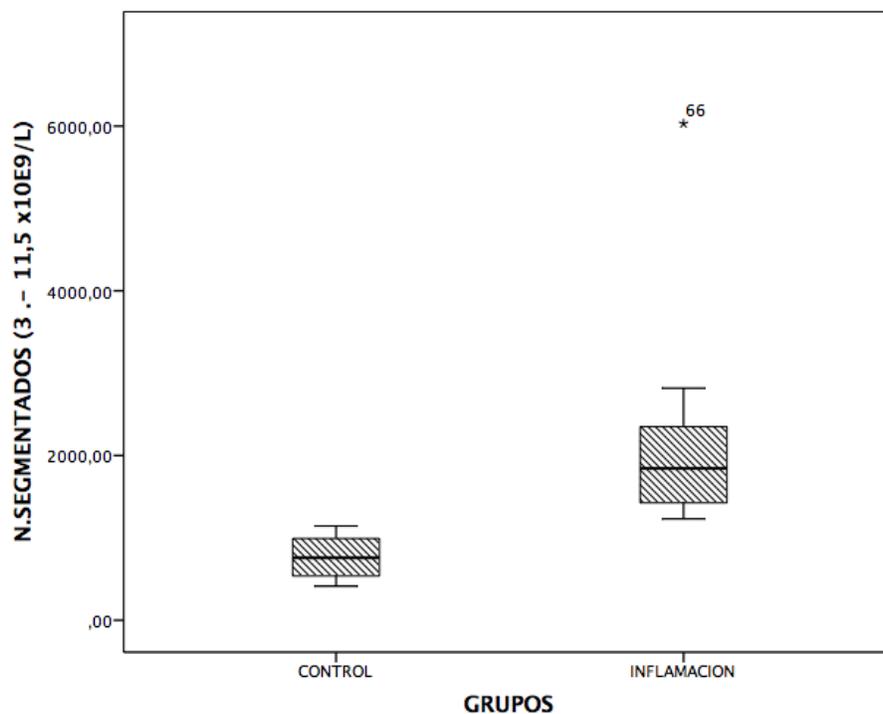
| N. SEGMENTADOS                  | CONTROL    |            | INFLAMACIÓN |            |
|---------------------------------|------------|------------|-------------|------------|
|                                 | FRECUENCIA | PORCENTAJE | FRECUENCIA  | PORCENTAJE |
| 3 a 11,5 X10 <sup>9</sup> /L    | 39         | 100,00%    | 0           | 0,00%      |
| 11,6 a 20,1 X10 <sup>9</sup> /L | 0          | 0,00%      | 20          | 66,67%     |
| 20,2 a 28,7 X10 <sup>9</sup> /L | 0          | 0,00%      | 9           | 30,00%     |
| >28,7 X10 <sup>9</sup> /L       | 0          | 0,00%      | 1           | 3,33%      |
| <b>TOTAL</b>                    | 39         | 100%       | 30          | 100%       |

**Fuente:** Hoja de reporte de resultados

**Autora:** Investigadora

En el grupo control el 100% de casos se encontraron en el rango de 3 a 11,5 X10<sup>9</sup>/L pues este representa el rango de referencia de normalidad en el leucograma. El grupo con inflamación está distribuido en un 66,67% en el rango de 11,6 a 20,1 X10<sup>9</sup>/L, en un 30% en el rango de 20,2 a 28,7 X10<sup>9</sup>/L y en un 3,33% en el rango de >28,7 X10<sup>9</sup>/L.

**GRÁFICO # 2**  
**BOX PLOT PARA NEUTRÓFILOS SEGMENTADOS**



**Fuente:** Hoja de reporte de resultados

**Autora:** Investigadora

En la representación gráfica de los datos de NS mediante Box Plot, se determinó una mayor dispersión de los datos, incluyendo algunos casos atípicos, dentro del grupo de caninos con inflamación, en comparación con el grupo control de caninos aparentemente sanos en el cual todos los datos se ubicaron dentro del rango referencial normal establecido en este estudio.



## CUADRO # 7

**DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA REPRESENTADA POR LOS GRUPOS CONTROL Y CON INFLAMACIÓN, EN RANGOS DE NEUTRÓFILOS JUVENILES**

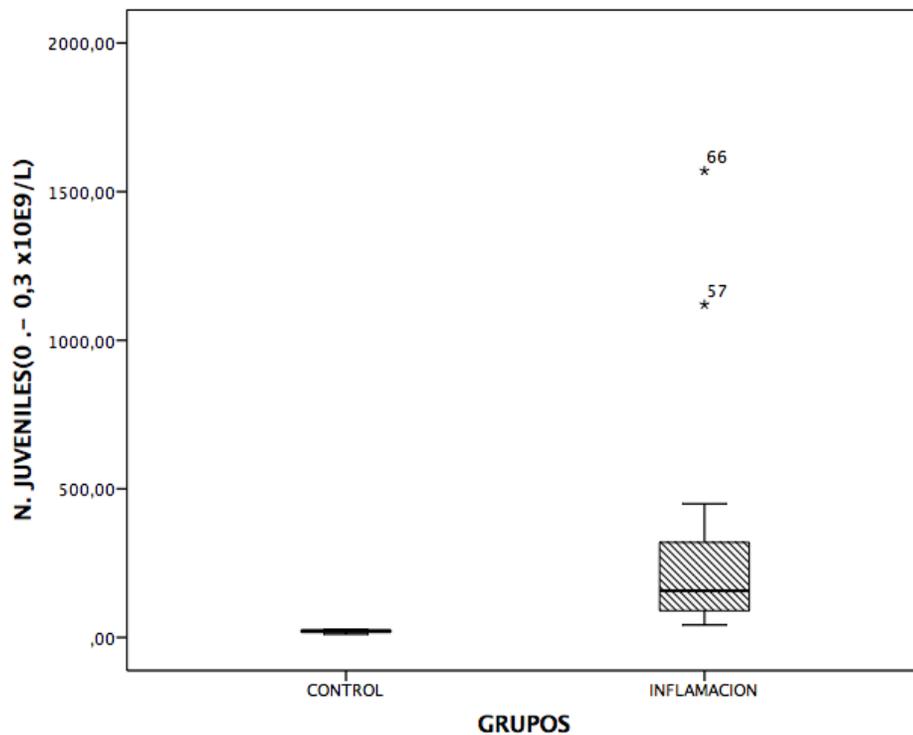
| N. JUVENILES                  | CONTROL    |            | INFLAMACIÓN |            |
|-------------------------------|------------|------------|-------------|------------|
|                               | FRECUENCIA | PORCENTAJE | FRECUENCIA  | PORCENTAJE |
| 0 a 4 X10 <sup>9</sup> /L     | 39         | 100,00%    | 26          | 86,67%     |
| 4,1 a 8 X10 <sup>9</sup> /L   | 0          | 0,00%      | 2           | 6,67%      |
| 8,1 a 12 X10 <sup>9</sup> /L  | 0          | 0,00%      | 1           | 3,33%      |
| 12,1 a 16 X10 <sup>9</sup> /L | 0          | 0,00%      | 1           | 3,33%      |
| <b>TOTAL</b>                  | 39         | 100%       | 30          | 100%       |

**Fuente:** Hoja de reporte de resultados

**Autora:** Investigadora

En el grupo control, el 100% de casos se encontraron en el rango de 0 a 4 X10<sup>9</sup>/L, pues dentro de éste se encuentra contenido el rango referencial de neutrófilos juveniles que es de 0 a 0,3 X10<sup>9</sup>/L. El grupo con inflamación está distribuido en un 86,67% en el primer rango, con valores desde 0,4 en adelante, en un 6,67% en el rango de 4,1 a 8 X10<sup>9</sup>/L, en un 3,33% en el rango de 8,1 a 12 X10<sup>9</sup>/L y en un 3,33% en el rango de 12,1 a 16 X10<sup>9</sup>/L.

**GRÁFICO # 3**  
**BOX PLOT PARA NEUTRÓFILOS JUVENILES**



**Fuente:** Hoja de reporte de resultados

**Autora:** Investigadora

En la representación gráfica de los datos de NJ mediante Box Plot, se determinó una mayor dispersión de los datos, incluyendo algunos casos atípicos, dentro del grupo de caninos con inflamación, en comparación con el grupo control de caninos aparentemente sanos en el cual todos los datos se ubicaron dentro del rango referencial normal establecido en este estudio.



## CUADRO # 8

**DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA REPRESENTADA POR LOS GRUPOS CONTROL Y CON INFLAMACIÓN VS CONCENTRACIÓN DE FIBRINÓGENO**

| FIBRINÓGENO     | CONTROL    |            | INFLAMACIÓN |            |
|-----------------|------------|------------|-------------|------------|
|                 | FRECUENCIA | PORCENTAJE | FRECUENCIA  | PORCENTAJE |
| <401 mg/dL      | 39         | 100,00%    | 16          | 53,33%     |
| 401 a 500 mg/dL | 0          | 0,00%      | 12          | 40,00%     |
| 501 a 600 mg/dL | 0          | 0,00%      | 1           | 3,33%      |
| >600 mg/dL      | 0          | 0,00%      | 1           | 3,33%      |
| <b>TOTAL</b>    | 39         | 100%       | 30          | 100%       |

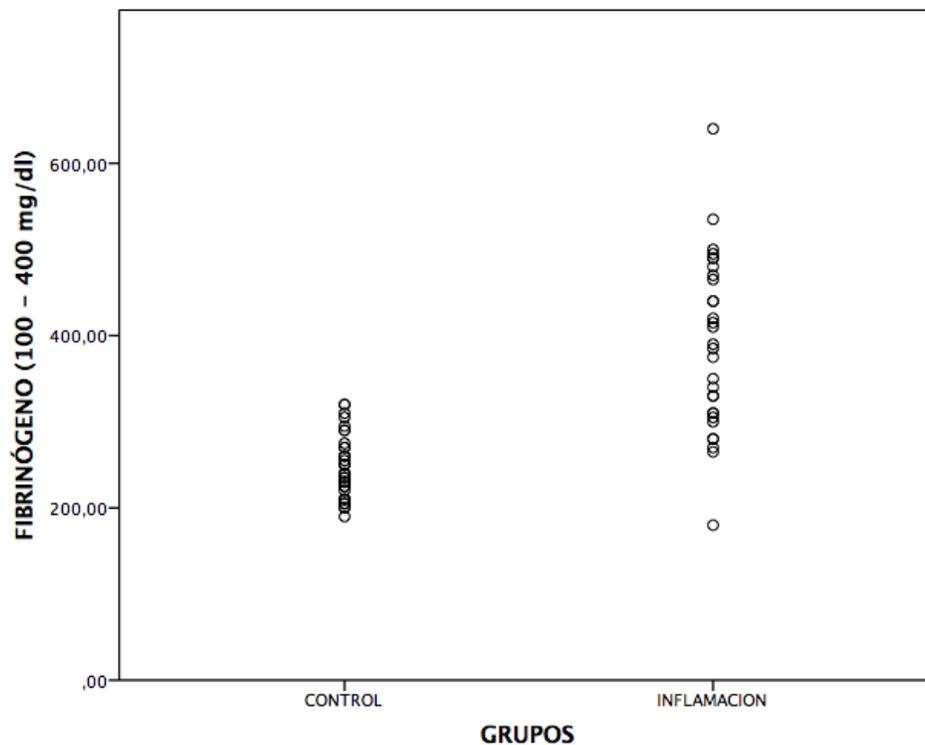
**Fuente:** Hoja de reporte de resultados

**Autora:** Investigadora

En el grupo control, el 100% de casos se encontraron en el rango de <401 mg/dL, es decir, en el rango de referencia. En el grupo con inflamación el nivel de Fb se incrementó en 14 de los 30 casos y sus valores están distribuidos en un 53,33% en el rango de <401 mg/dL, en un 40% en el rango de 401 a 500 mg/dL, en un 3,33% en el rango de 501 a 600 mg/dL y en un 3,33% en el rango de >600 mg/dL.

### GRÁFICO # 4

#### DOT PLOT PARA FIBRINÓGENO



**Fuente:** Hoja de reporte de resultados

**Autora:** Investigadora

En la representación gráfica de los datos de Fb mediante Dot Plot, se determinó una mayor dispersión de los datos, incluyendo algunos casos atípicos, dentro del grupo de caninos con inflamación, en comparación con el grupo control de caninos aparentemente sanos en el cual todos los datos se ubicaron dentro del rango referencial normal establecido en este estudio.



## CUADRO # 9

**DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA REPRESENTADA POR LOS GRUPOS CONTROL Y CON INFLAMACIÓN VS CONCENTRACIÓN DE PCR**

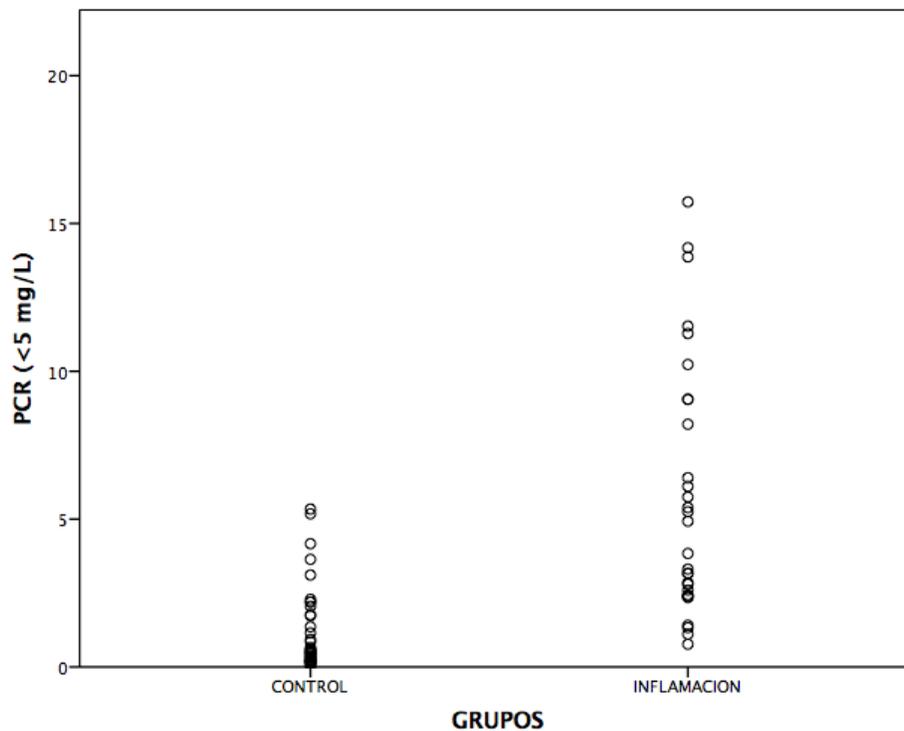
| PCR            | CONTROL    |             | INFLAMACIÓN |             |
|----------------|------------|-------------|-------------|-------------|
|                | FRECUENCIA | PORCENTAJE  | FRECUENCIA  | PORCENTAJE  |
| <5 mg/L        | 37         | 94,87%      | 16          | 53,33%      |
| 5 a 10 mg/L    | 2          | 5,13%       | 8           | 26,67%      |
| 10,1 a 15 mg/L | 0          | 0,00%       | 5           | 16,67%      |
| >15 mg/L       | 0          | 0,00%       | 1           | 3,33%       |
| <b>TOTAL</b>   | <b>39</b>  | <b>100%</b> | <b>30</b>   | <b>100%</b> |

**Fuente:** Hoja de reporte de resultados

**Autora:** Investigadora

En el grupo control, 2 de los 39 casos incrementaron su nivel de PCR, es decir, el 94,87% de casos se encontraron en el rango de <5 mg/L, que es el rango referencial para PCR, y el 5,13% en el siguiente rango de 5 a 10 mg/L. En el grupo con inflamación el nivel de PCR se incrementó en 14 de los 30 casos y sus valores están distribuidos en un 53,33% en el rango de <5 mg/L, en un 26,67% en el rango de 5 a 10 mg/L, en un 16,67% en el rango de 10,1 a 15 mg/L y en un 3,33% en el rango de >15 mg/L.

**GRÁFICO # 5**  
**DOT PLOT PARA PCR**



**Fuente:** Hoja de reporte de resultados

**Autora:** Investigadora

En la representación gráfica de los datos de PCR mediante Dot Plot, se determinó una mayor dispersión de los datos, incluyendo algunos casos atípicos, dentro del grupo de caninos con inflamación, en comparación con el grupo control de caninos aparentemente sanos en el cual el 94,87% de los datos se ubicaron dentro del rango referencial normal establecido en este estudio.



## CUADRO # 10

ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS PARA LAS VARIABLES Fb Y PCR SEGÚN LOS  
GRUPOS CONTROL E INFLAMACIÓN

## GRUPOS \*

|  | Control |       |        |     | Inflamación |        |        |     | Total  |        |        |     |
|--|---------|-------|--------|-----|-------------|--------|--------|-----|--------|--------|--------|-----|
|  | Media   | E.E.  | Median | CV% | Media       | E.E.   | Median | CV% | Media  | E.E.   | Median | CV% |
| PCR (mg/L)                               | 1,17a   | 0,23  | 0,5    | 121 | 5,8b        | 0,78   | 4,4    | 74  | 3,2    | 0,45   | 2,1    | 119 |
| Fibrinógeno<br>(mg/dl)                   | 245,1a  | 5,68  | 240    | 14  | 389,7b      | 18,31  | 387,5  | 26  | 308    | 12,16  | 275    | 33  |
| R. Leucocitario<br>(x10 <sup>9</sup> /L) | 1118,1b | 50,5  | 1095   | 28  | 857,2a      | 164,88 | 324,5  | 105 | 1004,7 | 78,05  | 890    | 65  |
| N. Segmentados<br>(x10 <sup>9</sup> /L)  | 759,7a  | 39,27 | 770    | 32  | 2010,4b     | 163,87 | 1843   | 45  | 1303,5 | 105,45 | 1084   | 67  |
| N. Juveniles<br>(x10 <sup>9</sup> /L)    | 20,8a   | 0,81  | 22     | 24  | 271,3b      | 58,44  | 157    | 118 | 129,7  | 29,33  | 26     | 188 |

\* Letras diferentes (a,b) indican significancia estadística ( $p < 0,05$ ) con la prueba U de Mann-Whitney.

**E.E.**= Error Estándar

**CV%**= Coeficiente de Variación en %.

**Fuente:** Hoja de reporte de resultados

**Autora:** Investigadora

Las variables Fb, PCR, WBC, NS y NJ para cada grupo (sanos y afectados por un proceso inflamatorio), denotaron alta volatilidad, es decir, alto valor porcentual del Coeficiente



de Variación (CV%) como se puede observar en el Cuadro # 10. La volatilidad fue mucho más alta en el grupo con inflamación, el mismo que presentó también una cantidad más alta de casos atípicos (Gráficos # 1-5). Por lo tanto, de acuerdo al comportamiento de los datos y empleando la prueba Shapiro Wilk en ambos grupos (sanos y afectados por un proceso inflamatorio), se encontró que estos no siguen una distribución normal ( $p < 0,05$ ) en casi todas las variables (Anexo D).

También se encontró, de acuerdo a este cuadro, la existencia de significancias estadísticas ( $p < 0,05$ ) en la comparación entre los dos grupos, resultando que Fb, PCR, NS y NJ son estadísticamente mayores en el grupo de caninos con inflamación comparados con los valores de estas variables en el grupo de caninos aparentemente sanos, mientras que los resultados de WBC son estadísticamente inferiores en caninos con inflamación con respecto a los sanos.

#### 4.1. ESTIMACIÓN DEL MODELO MATEMÁTICO

De acuerdo a la construcción del modelo de regresión logístico binomial (1) (Anexo E), los resultados para las variables independientes Fb y PCR (modelos 2 y 3 respectivamente) y para la variable dependiente INFLAMACIÓN, de manera individual y luego conjunta (modelo 4) son los siguientes:

$$\Pr(\text{Grupo} = \text{inf } \text{lamación}) = \frac{1}{1 + e^{(-2,3 + 0,81 * \text{PCR})}} \quad (2)$$



$$\Pr(\text{Grupo} = \text{inf lamación}) = \frac{1}{1 + e^{-(-10,99 + 0,04 * F)}} \quad (3)$$

$$\Pr(\text{Grupo} = \text{inf lamación}) = \frac{1}{1 + e^{-(-13,54 + 0,47 * PCR + 0,04 * F)}} \quad (4)$$

Los modelos de regresión estimados (2, 3 y 4), caracterizan, según la alta significancia estadística, a cada uno de los parámetros estimados tanto para PCR ( $p < 0,01$ ) como para Fb ( $p < 0,01$ ).









De acuerdo a los gráficos # 6, 7 y 8 se observa que a partir de la probabilidad de corte de 0,50 (50% de probabilidad) son muy pocos los casos de la muestra estudiada que fueron mal clasificados como C (Control) dentro del grupo I (Inflamación), los mismos que se encontraron después del punto de corte ( $>0,5$ ); así como también fueron pocos los casos que se clasificaron como I dentro del grupo C y que se ubicaron antes del punto de corte ( $\leq 0,5$ ). De acuerdo a las probabilidades estimadas para cada caso, gran cantidad de las mismas se encontraron altamente cercanas a 1 (Inflamación) o altamente cercanas a 0 (Control), lo que indicaría que el punto de corte 0,5 no supone una influencia para un mayor o menor porcentaje de clasificación correcta.



## CUADRO # 11

**CLASIFICACIÓN DE CASOS OBSERVADOS Y PRONOSTICADOS EN LOS GRUPOS DE SANOS Y CON INFLAMACIÓN PARA LA VARIABLE PCR<sup>a</sup> (MODELO 2)**

| OBSERVADO | GRUPOS                   | PRONOSTICADO |             | Porcentaje correcto |
|-----------|--------------------------|--------------|-------------|---------------------|
|           |                          | GRUPOS       |             |                     |
|           |                          | CONTROL      | INFLAMACION |                     |
|           | CONTROL                  | 34           | 5           | 87,2                |
|           | INFLAMACION              | 10           | 20          | 66,7                |
|           | <b>Porcentaje global</b> |              |             | <b>78,3</b>         |

a. El valor de corte es ,500

La clasificación de los casos en el grupo de caninos sanos o en el grupo de caninos con inflamación a partir de las concentraciones de Fb y PCR, se llevaron a cabo considerando una probabilidad de corte del 0,5 o el 50%, es decir, dados ciertos valores de PCR y de Fb, si el resultado es una probabilidad de 0 – 0,49, esto implica clasificar los casos dentro del grupo de caninos sanos y si es 0,5 – 1 esto implica una clasificación dentro del grupo con inflamación. Es así que el Cuadro # 11 indica que existe una clasificación correcta de los casos observados y pronosticados en un 78,3%, es decir, del 100% de casos el 78,3% coinciden tanto en la clasificación a partir del punto de corte (0,5) para PCR que fue de 2,84 mg/L, como en la clasificación inicial observada mediante la valoración clínica y el leucograma de cada paciente. De acuerdo a este cuadro, existe una sensibilidad del 66,7% y una especificidad del 87,2% de la concentración de PCR como prueba diagnóstica de inflamación.



## CUADRO # 12

**CLASIFICACIÓN DE CASOS OBSERVADOS Y PRONOSTICADOS EN LOS GRUPOS DE SANOS Y CON INFLAMACIÓN PARA LA VARIABLE FIBRINÓGENO<sup>a</sup> (MODELO 3)**

| OBSERVADO                 | PRONOSTICADO |             |                     |
|---------------------------|--------------|-------------|---------------------|
|                           | GRUPOS       |             | Porcentaje correcto |
|                           | CONTROL      | INFLAMACION |                     |
| <b>GRUPOS CONTROL</b>     | 35           | 4           | 89,7                |
| <b>GRUPOS INFLAMACION</b> | 6            | 24          | 80,0                |
| <b>Porcentaje global</b>  |              |             | 85,5                |

a. El valor de corte es ,500

En este caso, el Cuadro # 12 indica que existe una clasificación correcta de los casos observados y pronosticados en un 85,5%, es decir del 100% de casos, el 85,5% coinciden tanto en la clasificación a partir del punto de corte (0,5) para Fb que fue de 274,75 mg/dL, como en la clasificación inicial observada mediante la valoración clínica y el leucograma de cada paciente. De acuerdo a este cuadro, existe una sensibilidad del 80% y una especificidad del 89,7% para la concentración de Fb como marcador diagnóstico de inflamación.



## CUADRO # 13

**CLASIFICACIÓN DE CASOS OBSERVADOS Y PRONOSTICADOS EN LOS GRUPOS DE SANOS Y CON INFLAMACIÓN PARA LAS VARIABLES EN CONJUNTO<sup>a</sup> (MODELO 4)**

| OBSERVADO                | PRONOSTICADO       |             |                     |      |
|--------------------------|--------------------|-------------|---------------------|------|
|                          | GRUPOS             |             | Porcentaje correcto |      |
|                          | CONTROL            | INFLAMACION |                     |      |
| <b>GRUPOS</b>            | <b>CONTROL</b>     | 35          | 4                   | 89,7 |
|                          | <b>INFLAMACION</b> | 5           | 25                  | 83,3 |
| <b>Porcentaje global</b> |                    |             |                     | 87,0 |

a. El valor de corte es ,500

En el cuadro # 13, el modelo 4 permitió clasificar por cada 100 casos, 87 casos de manera correcta y en este caso los porcentajes tanto de capacidad clasificatoria como de predictibilidad de inflamación, fueron mayores que los observados en los cuadros 11 y 12 de los modelos 2 y 3 respectivamente.

Finalmente, los resultados del ajuste del modelo indican: un porcentaje alto de predictibilidad tanto para la PCR en el Modelo 2 con un  $R^2 = 55,9\%$ , como para el Fb en el Modelo 3 con un  $R^2 = 69,4\%$  y de manera conjunta en el Modelo 4 con un  $R^2 = 77,2\%$  (Anexo F); significancia global ( $p < 0,05$  omnibus test, Anexo G).



Estos resultados revelan que el Fb tuvo mejores indicadores estadísticos que la PCR y que en conjunto estas dos variables, superan con sus indicadores estadísticos a los que se obtuvieron de manera individual; es así que el modelo 4 que relaciona la variable INFLAMACIÓN con el conjunto de las dos variables (Fb y PCR), resultó ser altamente significativo ( $p < 0,05$ ), demostrando que las concentraciones de Fb y PCR, con una alta probabilidad, pueden determinar adecuadamente si un caso está afectado por un proceso inflamatorio o no, es decir, pueden actuar como marcadores diagnósticos de inflamación con mayor eficacia de manera conjunta que individualmente.

Adicionalmente, de acuerdo a los valores de los parámetros en los modelos 2, 3 y 4, se observó que los Odds ratio fueron superiores a 1 (modelo 2: OR para PCR= 2,2; modelo 3: OR para Fb= 1,04; modelo 4: OR para PCR= 1,6 y OR para Fb= 1,04) lo que refleja una posible asociación entre las variables analizadas (Anexo E) ya sea que se consideren de manera individual o conjunta. Es así que los signos positivos encontrados en los modelos 2, 3 y 4 para las variables explicativas (modelo 2: PCR = 0,81; modelo 3: Fb = 0,04 y modelo 4: PCR=0,47 y Fb=0,04) indican que mientras más se incrementan los valores de estas variables, mayor probabilidad tiene un caso de ser clasificado como inflamatorio (Inflamación = 1).



## CAPITULO V: DISCUSIÓN

En el presente estudio, se observó diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) al comparar los grupos con inflamación y control, las concentraciones de Fb, PCR, NS y NJ son estadísticamente mayores en el grupo de caninos con inflamación que el grupo de caninos aparentemente sanos; no así, la concentración de WBC que es estadísticamente mayor en caninos sanos comparado con los caninos con inflamación.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, se obtuvo un porcentaje alto de predictibilidad de inflamación de 55,9% para la PCR; 69,4% para el fibrinógeno y 77,2% para las dos proteínas en conjunto. Estos hallazgos son similares con los reportados por otros autores como Martínez, *et al.*, (2003) quienes estudiaron las concentraciones séricas de proteínas de fase aguda en donde las concentraciones de PCR estuvieron aumentadas en el momento del diagnóstico de leishmaniosis, pero disminuyeron significativamente luego de iniciado el tratamiento por lo que concluyen que la PCR es una herramienta útil para evaluar la respuesta inicial al tratamiento en perros con esta patología. Tecles, *et al.*, (2005), determinaron proteínas de fase aguda, observaron concentraciones séricas elevadas de PCR en todos los perros con diferentes enfermedades, comparadas con los perros sanos; ellos consideran a la PCR como la principal proteína de fase aguda debido a la magnitud de respuesta en procesos inflamatorios.

Gebhardt, *et al.*, (2009), determinaron que la PCR en suero fue mayor en perros enfermos con SRIS, en comparación con los niveles de éste en el grupo control, corroborando que la PCR



es parte de la respuesta de fase aguda secundaria a la estimulación de los hepatocitos por citoquinas pro-inflamatorias y que el incremento se correlaciona con el grado y curso de la enfermedad. Christensen, *et al.*, (2015), en su artículo de revisión indican que la PCR incrementa su concentración en perros con inflamación sistémica y que es un marcador diagnóstico útil. Ellos concluyeron que la concentración sérica de PCR puede incrementar significativamente en perros con complicaciones infecciosas post-quirúrgicas comparado con perros sin este tipo de complicaciones. Además, la concentración sérica de PCR puede reflejar el grado de trauma según la categoría de la cirugía. Meléndez, *et al.*, (2015), al conocer que la anemia secundaria a procesos inflamatorios es una de las principales causas de anemia en veterinaria y debido a que la homeostasis del hierro se altera por la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, evaluaron la relación entre parámetros reticulocitarios y la inflamación determinada por PCR, concluyendo que estos parámetros particularmente los relacionados con la concentración de hemoglobina se afectan por condiciones inflamatorias; por lo que, la PCR puede utilizarse como biomarcador inflamatorio.

Yuki, *et al.*, (2016), evaluaron pacientes con pancreatitis severa y determinaron niveles de enzimas hepáticas y concentraciones de PCR sin encontrar diferencias significativas entre pacientes con y sin pancreatitis concluyendo que estas variables no son útiles en el diagnóstico de pancreatitis aguda; sin embargo, determinaron que la concentración de PCR fue significativamente más baja en el día 5 sugiriendo que la PCR es una medida de laboratorio útil para monitorear la recuperación de esta patología. Reimann, *et al.*, (2016), concluyeron que, aunque la asociación entre la concentración de PCR y la severidad de la enfermedad mixomatosa de la válvula mitral MMVD asintomática fue débil, los hallazgos de incrementos moderados de



PCR deben involucrarse en la patogénesis de Insuficiencia Cardíaca Congestiva debido a MMVD, ya que este incremento moderado de la PCR puede resultar de daño miocárdico.

En este estudio, luego del análisis estadístico, se determinó que las concentraciones de Fb y PCR tienen una relación altamente significativa con la pertenencia de un caso a un grupo específico (control o con inflamación), determinando un porcentaje de certeza en el diagnóstico de un proceso inflamatorio de 78,3% para la PCR; de 85,5% para el Fb y de 87% cuando se toman el Fb y la PCR de manera conjunta. Algunos autores también determinaron estas proteínas de fase aguda; así, Torrente, *et al.*, (2015), evaluaron la concentración de hierro plasmático, PCR, albúmina y Fb en perros con SIRS, los resultados son similares ya que encontraron que los niveles de PCR fueron significativamente superiores en el grupo con SIRS comparado con el grupo control, además diferenció el grupo con SIRS del que presentaba inflamación focal; en relación al Fb, hubo diferencia significativa entre perros enfermos y sanos pero no hubo diferencia por la severidad de la inflamación, sin embargo, ambos se consideran marcadores sensibles de la inflamación. Según los autores esta diferencia puede deberse a que el Fb es considerado como marcador de procesos hemostáticos y se incrementa de forma moderada en procesos inflamatorios.

Los resultados obtenidos en esta investigación también concuerdan con el estudio de Pazzi, *et al.*, (2014), donde se evaluaron las anomalías hemostáticas en caninos con espirocercosis y su asociación con inflamación sistémica, evidenciando que las concentraciones medias de PCR y Fb fueron significativamente superiores en el grupo neoplásico comparado con el no neoplásico y el grupo control. Las concentraciones elevadas de Fb pueden explicarse por el



estado de hipercoagulabilidad, además a esta proteína se le considera como un factor influyente directo de la inflamación ya que desencadena la producción de citoquinas pro-inflamatorias y quimoquinas.

El valor y uso de la PCR y el Fb en patologías hormonales, parece justificarse sólo en los casos que se complican con enfermedades inflamatorias severas como en el estudio de Caldin *et al.*, (2009), en el que los perros con hiperadrenocortisismo (HAC) presentaron incrementos moderados de Fb sin cambios significativos en la PCR en comparación con los perros sanos; por otro lado, en perros con HAC y enfermedad inflamatoria severa hubo concentraciones significativamente más altas de PCR. El incremento de Fb puede deberse a que el exceso de glucocorticoides incrementa su síntesis, produciendo un estado de hipercoagulabilidad lo cual está asociado a HAC.

Según el análisis de los valores obtenidos, la PCR parece ser más reactiva que el Fb pues incrementa más sus valores en la inflamación, pero según los porcentajes de clasificación y predictibilidad obtenidos de manera individual en este estudio, el Fb resulta ser más eficaz al momento de clasificar un caso como inflamatorio. A pesar de esto, existen estudios en los que la PCR, el Fb y el recuento de glóbulos blancos (WBC) en conjunto se incrementan en un proceso inflamatorio, como en el estudio de Bayramli y Ulutas (2008), en el que estos tres parámetros incrementaron sus concentraciones en el primer día de haberse inducido experimentalmente una lesión de la mucosa gástrica en perros, esto se explicaría ya que la respuesta de fase aguda es una parte del sistema de defensa innato de un animal contra el trauma, inflamación e infección. Barić, *et al.*, (2013), observaron que en perros con babesiosis, las concentraciones de Fb y PCR



aumentaron significativamente antes del tratamiento, en comparación con los perros sanos y permanecieron altas durante 3 días después de la terapia, no así el WBC que fue significativamente más bajo antes del tratamiento, normalizándose 3 días después de este, concluyendo que la PCR es un marcador no específico de inflamación en perros y que puede usarse como un marcador predictivo de riesgo de enfermedad y para monitorizar la respuesta al tratamiento.

Es importante recalcar que no en todos los procesos inflamatorios se pueden encontrar valores sanguíneos elevados de estas proteínas de fase aguda (Fb y PCR), especialmente si el proceso inflamatorio se ha definido como localizado y sin influencia en los indicadores sistémicos de la inflamación, como en el estudio de Bauer *et al.*, (2014), en el que se observó que la PCR y el Fb no cambiaron en un proceso inflamatorio localizado estéril definido, concluyendo que este último no induce una respuesta inflamatoria sistémica significativa. A pesar de que el Fb y la PCR se muestran reactivos ante un cuadro inflamatorio, algunos autores como Viitanen, *et al.*, (2016), determinaron que perros con neumonía bacteriana presentaron niveles de PCR significativamente elevados al inicio de la enfermedad y que la magnitud del aumento no se correlacionó con la gravedad de la enfermedad; por lo que, la PCR sérica puede ser útil en discriminar la neumonía bacteriana de otras enfermedades pulmonares pero no es útil como indicador de severidad de enfermedad; sin embargo, la concentración de PCR disminuyó rápidamente al iniciar el tratamiento y reflejó un proceso adecuado de recuperación.



## CAPITULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Al finalizar la presente investigación “Efecto del Proceso Inflamatorio sobre el Nivel Sanguíneo de Fibrinógeno y Proteína C Reactiva en Caninos atendidos en la Clínica de Especialidades Caninas y Felinas CLINICAN de Cuenca-Ecuador”, se determinan las siguientes conclusiones:

1. Con relación al grupo con inflamación los valores de WBC se distribuyeron como leucocitosis leve 70%, moderada 20% y severa 10%. Los valores de NS se distribuyeron como neutrofilia leve 66,67%, moderada 30% y severa 3,33%, finalmente el 100% de los valores de NJ presentaron desviación a la izquierda. En el grupo control, el 100% de los valores se ubicaron dentro de los valores referenciales.
2. Los resultados de WBC, NS, NJ, Fb y PCR del grupo control y con inflamación, se ubicaron en su mayoría cercanos a la media, existiendo datos atípicos que denotaron alta volatilidad sobre todo en el grupo con inflamación. En el grupo con inflamación, el WBC presentó menor incremento con respecto a las otras variables.
3. Las concentraciones de Fb y de PCR se incrementaron en 14 de los 30 caninos del grupo con inflamación, es decir, el 46,67% presentó valores superiores a 401 mg/dL para el Fb



y valores superiores a 5mg/L para la PCR; siendo los valores máximos alcanzados de 640 mg/dL y de 15,73 mg/L respectivamente. En el grupo control, en relación al Fb el 100% se ubicó en el rango referencial (100 a 400 mg/dL);y, en relación a la PCR el 94,87% se ubicó en el rango referencial (<5 mg/L) y el 5,13% presentó un incremento leve (5 a 10 mg/L).

4. En relación a la capacidad clasificatoria individual de inflamación tanto la PCR como el Fb se consideran como marcadores diagnósticos de inflamación, siendo de mayor utilidad al ser evaluadas de manera conjunta, igualmente presentan un comportamiento similar en relación al porcentaje de predictibilidad de inflamación.
5. La capacidad diagnóstica y predictiva de inflamación del Fb, así como los porcentajes de sensibilidad y especificidad de esta prueba, fueron mayores a los de la PCR.



## RECOMENDACIONES

1. Considerar a las concentraciones de Fb y PCR como una importante herramienta de apoyo en el diagnóstico de enfermedades que cursan con cuadros inflamatorios; y en consecuencia, procurar su constancia en las órdenes de laboratorio como herramienta de diagnóstico junto con el hemograma/leucograma.
2. Evaluar periódicamente estos dos parámetros de manera conjunta para el control de la enfermedad y respuesta al tratamiento.
3. Realizar estudios posteriores sobre el comportamiento de estas proteínas en patologías inflamatorias específicas, ya que el presente estudio se realizó en cuadros inflamatorios de diversas causas.
4. Difundir los resultados obtenidos a nivel nacional e internacional, mediante los diferentes medios de publicación.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arias Stella, J. (2005). Inflamación: De Virchow a la actualidad, apuntes históricos. *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina de España*, 23-27.
- Arnau Vives, M. A., Rueda Soriano, J., Martínez Dolz, L. V., Osa Sáez, A., Almenar Bonet, L., Morillas Blasco, P., Osca Asensi, J., Quesada Carmona, A., Sanjuán Máñez, R. & Palencia Pérez, M. A. (2002). Valor pronóstico del fibrinógeno en pacientes ingresados con sospecha de angina inestable o infarto de miocardio sin onda Q. *Revista Española de Cardiología*, 55(6), 622-630.
- Aziz Jacobo, J., Camacho Galindo, J. & Fernández Vázquez, J. M. (2006). John Hunter. El primer investigador en Ortopedia. *Acta Ortopédica Mexicana*, 20(2), 85-87.
- Barić Rafaj, R., Kuleš, J., Selanec, J., Vrkić, N., Zovko, V., Zupančič, M., Trampuš Bakija, A., Matijatko, V., Crnogaj, M. & Mrljak, V. (2013). Markers of coagulation activation, endothelial stimulation, and inflammation in dogs with babesiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(5), 1172-1178.
- Barros de Oliveira, C. M., Sakata, R. K., Machado, A. & Salomao, R. (2011). Citocinas y dolor. *Revista Brasileira de Anestesiología*, 61(2), 137-142.
- Bauer, N., Mensinger, S., Daube, G., Failing, K. & Moritz, A. (2012). A moderate aseptic local inflammation does not induce a significant systemic inflammatory response. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 321-330.



- Bayramli, G. & Ulutas, B. (2008). Acute phase protein response in dogs with experimentally induced gastric mucosal injury. *Veterinary Clinical Pathology*, 37(3), 312-316.
- Benavides, J. (2008). Reparación de heridas cutáneas. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología*, 16(1), 29-35.
- Boal, S. & Carreira, M. (2015). Serum and synovial fluid C-reactive protein level variations in dogs with degenerative joint disease and their relationships with physiological parameters. *Veterinary Research Communications*, 39(3), 163-169.
- Bordés González, R., Martínez Beltrán, M., García Olivares, E. & Guisado Barrilao, R. (2010, 02 18). *El Proceso Inflamatorio*. Retrieved 12 15, 2014, from <https://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero%204/pinflamatorio4.htm>
- Brown, H. (1995). Ilya Mechnikov and his studies on comparative inflammation. *Experimental Biology and Medicine*, 209(2), 99-101.
- Bullón Ramírez, A. (1983). *Historia de la Inflamación*. Madrid: GARSI.
- Caldin, M., Tasca, S., Carli, E., Bianchini, S., Furlanello, T., Martinez-Subiela, S. & Cerón, J. J. (2009). Serum acute phase protein concentrations in dogs with hyperadrenocorticism with and without concurrent inflammatory conditions. *Veterinary Clinical Pathology*, 38(1), 63-68.
- Campuzano Maya, G. (2007). Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. *Medicina y Laboratorio*, 13(11-12), 511-550.
- Christensen, M. B., Eriksen, T. & Kjelgaard-Hansen, M. (2015). C-reactive protein: quantitative marker of surgical trauma and post-surgical complications in dogs: a systematic review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57-71.



- Coppo, J. A. (2010). *Interpretación de análisis clínicos en perros y gatos*. Salta-Argentina: EUCASA.
- Crossley, R., Coloma, A., Ríos, C. & González, C. (2010). Determinación de proteína C-reactiva en hembras caninas con tumores mamarios benignos y malignos. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42(1), 101-105.
- de Mingo Alemany, M. C. (2011, 10 25). *Utilidad de la proteína C reactiva como marcador pronóstico en niños con patología infecciosa grave*. Retrieved 12 16, 2014, from Depósito digital de documentos de la Universidad Autónoma de Barcelona: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/42013/mcma1de1.pdf;jsessionid=02AB34C429BE7268AB48E282B44428A7.tdx1?sequence=1>
- Domínguez Amorocho, O. & Patiño Cuervo, D. (2008). Proteína C reactiva ultrasensible (PCR-us) como marcador de riesgo de enfermedad cardiovascular. *Medicina y Laboratorio*, 14(9-10), 457-478.
- Elhiblu, M. A., Dua, K., Mohindroo, J., Mahajan, S. K., Sood, N. K. & Dhaliwal, P. S. (2015). Clinico-hemato-biochemical profile of dogs with liver cirrhosis. *Veterinary World: Open access and peer reviewed journal*, 8(4), 487-491.
- Farreras Valentí, P., & Rozman, C. (2000). *Medicina Interna*. Madrid-España: Elsevier.
- Farreras Valentí, P., & Rozman, C. (2012). *Medicina Interna*. Barcelona-España: Elsevier.
- García Barreno, P. (2008). Inflamación. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 102(1), 91-159.
- Gebhardt, C., Hirschberger, J., Rau, S., Arndt, G., Krainer, K., Schweigert, F., Brunnberg, L., Kaspers, B. & Kohn, B. (2009). Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs



- with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 19(5), 450-458.
- Geffner, J. & Fainboim, L. (2005). *Introducción a la Inmunología Humana*. Buenos Aires-Argentina: Médica Panamericana S.A.
- Iglesias Gamarra, A., Siachoque, H., Pons Estel, B., Restrepo, J. F., Quintana, G. & Gómez Gutiérrez, A. (2009). Historia de la autoinmunidad. Primera Parte: La Inmunología ¿desde dónde y hacia dónde?. *Revista Colombiana de Reumatología*, 16(1), 11-31.
- León Regal, M. L., Alvarado Borges, A., de Armas García, J. O., Miranda Alvarado, L., Varens Cedeño, J. A. & Cuesta del Sol, J. Á. (2015). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. *Revista Finlay*, 5(1), 47-62.
- Marín, J. P., Moya, T., Campos, M. & Alfaro, W. (2002). Comparación de dos métodos automatizados para la determinación de Proteína C Reactiva en pacientes pediátricos. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 37(1-2), 29-31.
- Martínez Subiela, S., Bernal, L. J. & Cerón, J. J. (2003). Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. *American Journal of Veterinary Research*, 64(8), 1021-1026.
- Martínez Subiela, S., Tecles, F., Parra, M. D. & Cerón, J. J. (2001). Proteínas de Fase Aguda: Conceptos Básicos y Principales Aplicaciones Clínicas en Medicina Veterinaria. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 17(1), 97-113.
- Martínez, R., Acera, A., Soria, J., González, N. & Suárez, T. (2011). Mediadores alérgicos en lágrimas de niños con conjuntivitis alérgica estacional y perenne. *Archivos de la Sociedad*



- Española de Oftalmología*, 86(6), 187-192.
- Meléndez-Lazo, A., Tvarijonaviciute, A., Cerón, J. J., Planellas, M. & Pastor, J. (2015). Evaluation of the Relationship between Selected Reticulocyte Parameters and Inflammation determined by Plasma C-reactive Protein in Dogs. *Journal of comparative pathology*, 152(4), 304-312.
- Milla Torres, D. F. (2013). *Evaluación de fibrinógeno plasmático en pacientes con enfermedad periodontal en el Centro Médico Naval Cirujano Mayor Santiago Távara en el año 2013*. Retrieved 12 16, 2014, from Cybertesis: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3476>
- Montero González, T., Hurtado de Mendoza, J. & Cabrera, P. (2001). Daño múltiple de órganos: Morfología de la respuesta inflamatoria sistémica. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 30(5), 77-88.
- Muñoz Barros, J. A. (1995). *Determinación de las variaciones en el Leucograma, Fibrinógeno y Proteína C-Reactiva, producto de una Inflamación Post-Quirúrgica en Perros*. Retrieved 01 10, 2017, from Food and Agriculture Organization of the United Nations: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CL19970008711>
- Muzzo Pons, J. (1943). El Fibrinógeno del Plasma en la Enfermedad de Carrión. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 2(1), 25-36.
- Pazzi, P., Goddard, A., Kristensen, A. T. & Dvir, E. (2014). Evaluation of hemostatic abnormalities in canine spirocercosis and its association with systemic inflammation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(1), 21-29.
- Quesada Díaz, F. (2013, 02 12). *Determinación de los valores referenciales del tiempo de*



- protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada y fibrinógeno en caninos (Canis familiaris) del Valle Central de Costa Rica*. Retrieved 01 09, 2017, from Universidad Nacional Costa Rica: <http://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/12942>
- Reimann, M. J., Ljungvall, I., Hillström, A., Møller, J. E., Hagman, R., Falk, T., Höglund, K., Häggström, J. & Olsen, L. H. (2016). Increased serum C-reactive protein concentrations in dogs with congestive heart failure due to myxomatous mitral valve disease. *Veterinary Journal*, 209, 113-118.
- Rubio, C., Lasa, E., Arroabarren, E., Garrido, S., García, B. E. & Tabar, A. I. (2003). Anafilaxia. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26(2), 103-110.
- Silva, R., Montes, J. F., García-Valero, J. & Olloquequi, J. (2015). Efectores celulares de la respuesta inflamatoria en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. *Revista Médica de Chile*, 143(9), 1162-1171.
- Tecles, F., Spiranelli, E., Bonfanti, U., Cerón, J. J. & Paltrinieri, S. (2005). Preliminary Studies of Serum Acute-Phase Protein Concentrations in Hematologic and Neoplastic Diseases of the Dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(6), 865-870.
- TÉCNICAS LINEAR CHEMICALS S.L. Joaquim Costa 18 2ª planta. 08390 Montgat, Barcelona, SPAIN Telf. (+34) 934 694 990 Fax. (+34) 934 693 435. website [www.linear.es](http://www.linear.es). Sept. 2015
- TÉCNICAS SPINREACT, S.A./S.A.U. Ctra. Santa Coloma, 7 E-17176 SANT ESTEVE DE BAS (GI) SPAIN Tel. +34 972 69 08 00 Fax +34 972 69 00 99 e-mail: [spinreact@spinreact.com](mailto:spinreact@spinreact.com). Nov. 2015
- Tizard, I. R. (2009). *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. Texas-EEUU: Elsevier.



- Torrente, C., Manzanilla, E. G., Bosch, L., Fresno, L., Rivera Del Alamo, M., Andaluz, A., Saco, Y. & Ruiz de Gopegui, R. (2015). Plasma iron, C-reactive protein, albumin, and plasma fibrinogen concentrations in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 25(5), 611-619.
- Velarde, M. S., Carrizo, T., Prado, M. M., Díaz, E. I., Fonio, M. C., Bazán, M. C. & Abregú, A. V. (2010). Marcadores de inflamación y disfunción endotelial en niños con diabetes tipo 1. *Medicina (Buenos Aires)*, 70(1), 44-48.
- Vergara, U. (2011). Sistema nervioso central y regulación de la respuesta inmune. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 26(1-2), 41-52.
- Viitanen, S. J., Lappalainen, A. K., Christensen, M. B., Sankari, S. & Rajamäki, M. M. (2017). The Utility of Acute-Phase Proteins in the Assessment of Treatment Response in Dogs With Bacterial Pneumonia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(1), 124-133.
- Visauta, B., & Martori, J. (2003). *Análisis Estadístico con SPSS para Windows*. México: Mc Graw Hill.
- Yuki, M., Hirano, T., Nagata, N., Kitano, S., Imataka, K., Tawada, R., Shimada, R. & Ogawa, M. (2016). Clinical Utility of Diagnostic Laboratory Tests in Dogs with Acute Pancreatitis: A Retrospective Investigation in a Primary Care Hospital. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(1), 116-122.
- Zamora González, Yaneth, Rodríguez Pérez, Loreta, Castillo González, Dunia, Almagro Vázquez, Delfina, Agramonte Llanes, Olga, Fonseca Polanco, Cristina, Tejeda González, Maribel & Graña Ayllón, Gladys. (2010). Introducción en el Instituto de Hematología e



Inmunología, del método de von Clauss para la determinación de fibrinógeno. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 26(3), 253-254.

Zeballos López, L. (2011). Inflamación. *Revista de Actualización Clínica*, 13, 675-681.

## ANEXOS

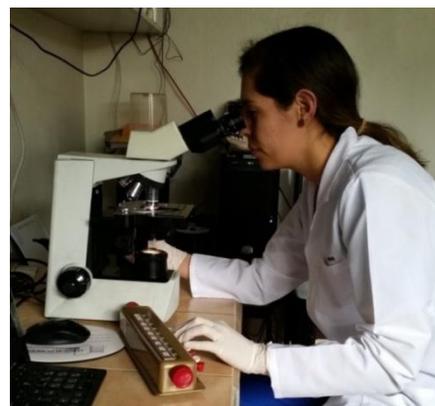
### MAESTRÍA EN MEDICINA CANINA Y FELINA

#### ANEXO A

#### TOMA DE MUESTRAS



#### TÉCNICAS DE MEDICIÓN



## EQUIPOS

**MICROSCOPIO ÓPTICO CX21, CONTADOR MANUAL DE GLÓBULOS BLANCOS  
(LABORATORY DC COUNTER) Y CÁMARA DE NEUBAUER**



**COAGULÓMETRO COADATA 504 PARA MEDICIÓN DE FIBRINÓGENO**



**EQUIPO ESPECIALIZADO MINDRAY BS-130 PARA MEDICIÓN DE PCR**



## ANEXO B

## HOJA DE REPORTE DE RESULTADOS DEL HEMOGRAMA/LEUCOGRAMA

**CLINICAN**  
CLINICA DE ESPECIALIDADES CANINAS Y FELINAS

**Fecha:**  
**Paciente:**  
**Edad:**  
**Raza:**  
**Solicitado:**

**Sexo:**  
**Especie:**

| HEMOGRAMA         | VALOR | UNIDADES           | VALOR DE REF. | OBSERVACIONES |
|-------------------|-------|--------------------|---------------|---------------|
| Eritrocitos:      |       | $\times 10^{12}/L$ | 5,5 - 8,5     |               |
| Hemoglobina:      |       | g/L                | 120 - 180     |               |
| Hematocrito:      |       | L/L                | 0,37 - 0,55   |               |
| VGM:              |       | f/L                | 60 - 77       |               |
| CGMH:             |       | g/L                | 320 - 360     |               |
| Plaquetas         |       | $\times 10^9/L$    | 200 - 700     |               |
| Proteinas totales |       | g/L                | 54 - 71       |               |
| Leucocitos:       |       | $\times 10^9/L$    | 6 .- 17       |               |
| Neutrófilos:      |       | $\times 10^9/L$    | 3 .- 11,5     |               |
| Neutrófilos:      |       | %                  |               |               |
| Juveniles:        |       | $\times 10^9/L$    | 0 .- 0,3      |               |
| Juveniles:        |       | %                  |               |               |
| Basófilos:        |       | $\times 10^9/L$    | <0,1          |               |
| Basófilos:        |       | %                  |               |               |
| Linfocitos:       |       | $\times 10^9/L$    | 1 .- 4,8      |               |
| Linfocitos:       |       | %                  |               |               |
| Monocitos:        |       | $\times 10^9/L$    | 0 - 1,4       |               |
| Monocitos:        |       | %                  |               |               |
| Eosinófilos:      |       | $\times 10^9/L$    | 0 - 0,9       |               |
| Eosinófilos:      |       | %                  |               |               |

Atentamente,

DRA. MVZ. Jenny Idrovo O.  
LABORATORIO CLINICAN



## HOJA DE REPORTE DE RESULTADOS DE FIBRINÓGENO Y PCR



**LABORATORIO CLINICO**  
**JJPaz**

*Dra. María Álvarez de Méndez*  
Bioquímica - Master of Science - Magister en Microbiología

*Dra. Silvana Méndez Álvarez*  
Médico - Tutorials in Clinical Chemistry & Instrumentation

**Horario de Atención 07h00 a 18h00**

---

Cuenca, a \_\_\_\_\_

Nombre del Paciente: \_\_\_\_\_

Médico Solicitante: \_\_\_\_\_

EXAMEN DE: **SANGRE**

**MARCADORES DE INFLAMACIÓN**

---

| PRUEBA       | CONCENTRACION | V. REFERENCIAL |
|--------------|---------------|----------------|
| FIBRINOGENO: | mg/dl.        | 150 - 400      |
| PCR:         | mg/L.         | Hasta 6        |

---

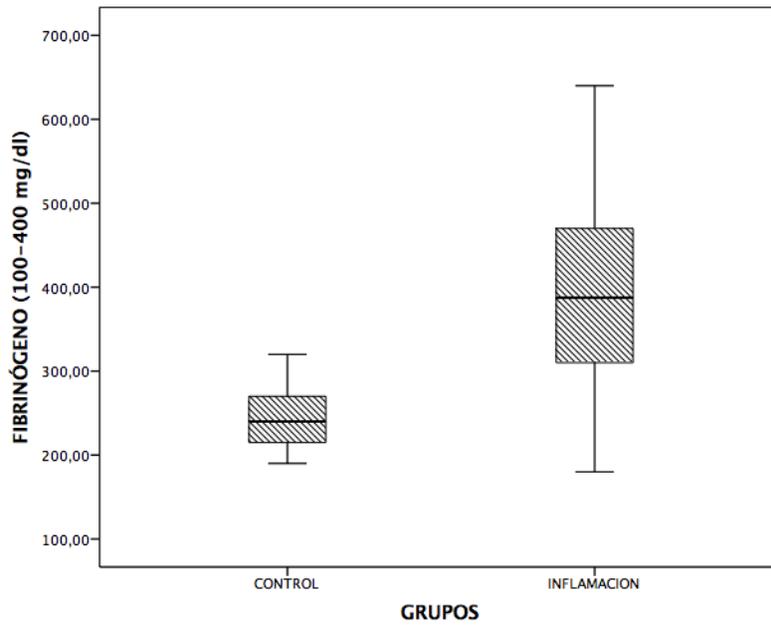
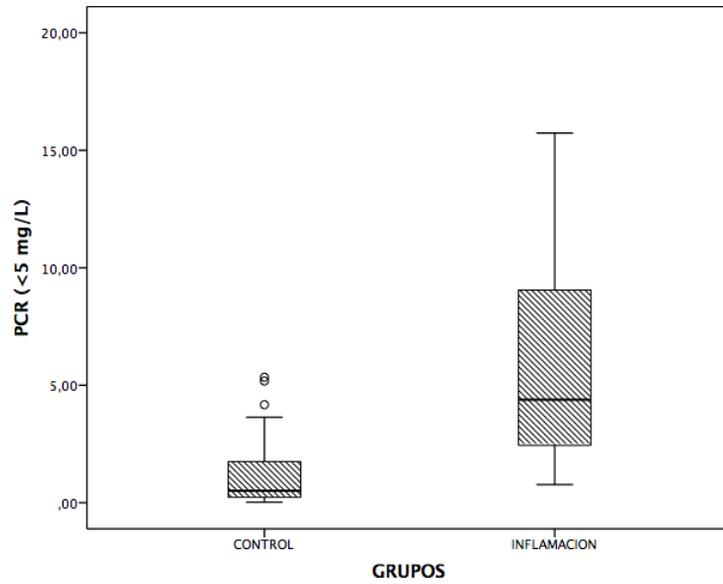
Att. \_\_\_\_\_

Dirección: Av. Loja 2-114 entre Galápagos y Pastaza  
Teléfonos: 2880516 / 4047536 / 0985580621



### ANEXO C

### BOX PLOT PARA PCR Y FIBRINÓGENO CON PRESENCIA DE DATOS ATÍPICOS





## ANEXO D

**PRUEBAS DE VERIFICACIÓN DE LA NORMALIDAD DE LOS DATOS PARA LAS  
VARIABLES INCLUIDAS EN EL ESTUDIO**

|              |             | <b>PRUEBAS DE NORMALIDAD</b>    |    |       |              |    |      |
|--------------|-------------|---------------------------------|----|-------|--------------|----|------|
|              |             | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |       | Shapiro-Wilk |    |      |
| GRUPOS       |             | Estadístico                     | gl | Sig.  | Estadístico  | gl | Sig. |
| LEUCOCITOS   | CONTROL     | ,140                            | 39 | ,052  | ,941         | 39 | ,043 |
|              | INFLAMACION | ,327                            | 30 | ,000  | ,725         | 30 | ,000 |
| N.SEMENTADOS | CONTROL     | ,134                            | 39 | ,076  | ,915         | 39 | ,006 |
|              | INFLAMACION | ,192                            | 30 | ,006  | ,672         | 30 | ,000 |
| N.JUVENILES  | CONTROL     | ,147                            | 39 | ,034  | ,929         | 39 | ,017 |
|              | INFLAMACION | ,237                            | 30 | ,000  | ,611         | 30 | ,000 |
| FIBRINOGENO  | CONTROL     | ,122                            | 39 | ,152  | ,944         | 39 | ,052 |
|              | INFLAMACION | ,091                            | 30 | ,200* | ,976         | 30 | ,718 |
| PCR_CUANTI   | CONTROL     | ,260                            | 39 | ,000  | ,749         | 39 | ,000 |
|              | INFLAMACION | ,184                            | 30 | ,011  | ,883         | 30 | ,003 |

\*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors



## ANEXO E

## RESULTADOS DE LA REGRESIÓN LOGÍSTICA

## Variables en la ecuación del modelo 2

|           | B      | E.T. | Wald   | gl | Sig. | Exp(B) | I.C. 95% para EXP(B) |          |
|-----------|--------|------|--------|----|------|--------|----------------------|----------|
|           |        |      |        |    |      |        | Inferior             | Superior |
| PCR       | ,806   | ,211 | 14,640 | 1  | ,000 | 2,240  | 1,482                | 3,385    |
| Constante | -2,296 | ,553 | 17,238 | 1  | ,000 | ,101   |                      |          |

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: PCR\_CUANTI.

## Variables en la ecuación en el modelo 3

|             | B       | E.T.  | Wald   | gl | Sig. | Exp(B) | I.C. 95% para EXP(B) |          |
|-------------|---------|-------|--------|----|------|--------|----------------------|----------|
|             |         |       |        |    |      |        | Inferior             | Superior |
| FIBRINOGENO | ,037    | ,010  | 14,735 | 1  | ,000 | 1,037  | 1,018                | 1,057    |
| Constante   | -10,989 | 2,735 | 16,142 | 1  | ,000 | ,000   |                      |          |

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: FIBRINOGENO.

## Variables en la ecuación del modelo 4

|             | B       | E.T.  | Wald   | gl | Sig. | Exp(B) | I.C. 95% para EXP(B) |          |
|-------------|---------|-------|--------|----|------|--------|----------------------|----------|
|             |         |       |        |    |      |        | Inferior             | Superior |
| PCR         | ,470    | ,176  | 7,092  | 1  | ,008 | 1,599  | 1,132                | 2,260    |
| FIBRINOGENO | ,042    | ,013  | 10,785 | 1  | ,001 | 1,043  | 1,017                | 1,069    |
| Constante   | -13,537 | 3,823 | 12,537 | 1  | ,000 | ,000   |                      |          |

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: PCR\_CUANTI, FIBRINOGENO.



## ANEXO F

## RESULTADOS DEL AJUSTE DEL MODELO

## Resumen del modelo 2

| Paso | -2 log de la verosimilitud | R cuadrado de Cox y Snell | R cuadrado de Nagelkerke |
|------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 1    | 57,258 <sup>a</sup>        | ,417                      | ,559                     |

a. La estimación ha finalizado en el número de iteración 6 porque las estimaciones de los parámetros han cambiado en menos de ,001.

## Resumen del modelo 3

| Paso | -2 log de la verosimilitud | R cuadrado de Cox y Snell | R cuadrado de Nagelkerke |
|------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 1    | 44,183 <sup>a</sup>        | ,518                      | ,694                     |

a. La estimación ha finalizado en el número de iteración 7 porque las estimaciones de los parámetros han cambiado en menos de ,001.

## Resumen del modelo 4

| Paso | -2 log de la verosimilitud | R cuadrado de Cox y Snell | R cuadrado de Nagelkerke |
|------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 1    | 35,267 <sup>a</sup>        | ,576                      | ,772                     |

a. La estimación ha finalizado en el número de iteración 8 porque las estimaciones de los parámetros han cambiado en menos de ,001.



## ANEXO G

## RESULTADOS DE LA SIGNIFICANCIA GLOBAL DEL MODELO

## Pruebas omnibus sobre los coeficientes del modelo 2

|        |        | Chi cuadrado | gl | Sig. |
|--------|--------|--------------|----|------|
|        | Paso   | 37,219       | 1  | ,000 |
| Paso 1 | Bloque | 37,219       | 1  | ,000 |
|        | Modelo | 37,219       | 1  | ,000 |

## Pruebas omnibus sobre los coeficientes del modelo 3

|        |        | Chi cuadrado | gl | Sig. |
|--------|--------|--------------|----|------|
|        | Paso   | 50,294       | 1  | ,000 |
| Paso 1 | Bloque | 50,294       | 1  | ,000 |
|        | Modelo | 50,294       | 1  | ,000 |

## Pruebas omnibus sobre los coeficientes del modelo 4

|        |        | Chi cuadrado | gl | Sig. |
|--------|--------|--------------|----|------|
|        | Paso   | 59,210       | 2  | ,000 |
| Paso 1 | Bloque | 59,210       | 2  | ,000 |
|        | Modelo | 59,210       | 2  | ,000 |