



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON OPCIÓN A AGRONÓMICAS O
VETERINARIAS.

TESIS

**DETECCIÓN DE AMILOIDOSIS REACTIVA SECUNDARIA EN
BOVINOS SACRIFICADOS EN EL RASTRO MUNICIPAL DE
AGUASCALIENTES.**

PRESENTA

MVZ. MELISA ESTEFANÍA CEDILLO PADILLA
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS VETERINARIAS

COMITÉ TUTORAL:

DRA. ROSA MARÍA MELÉNDEZ SOTO

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ

DRA. MARÍA CAROLINA DE LUNA LÓPEZ

DRA. ALMA LILIÁN GUERRERO BARRERA.

AGUASCALIENTES, AGUASCALIENTES A 11 DE JUNIO 2019.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS


OF. NO. CCA-D-11-15-066-19

DRA. EN ADMÓN. MARÍA DEL CARMEN MARTÍNEZ SERNA
DIRECTORA GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
P R E S E N T E.

Por medio de la presente me permito comunicarle a usted que la tesis titulada "DETECCIÓN DE AMILOIDOSIS REACTIVA SECUNDARIA EN BOVINOS SACRIFICADOS EN EL RASTRO MUNICIPAL DE AGUASCALIENTES", de la alumna **MELISA ESTEFANÍA CEDILLO PADILLA**, egresada de la Maestría en Ciencias Agronómicas y Veterinarias, respeta las normas y lineamientos establecidos institucionalmente para su elaboración y su autor cuenta con el voto aprobatorio de su tutor y comité tutorial.

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Jesús María, Ags., 11 de junio del 2019
"SE LUMEN PROFÉRRE"


Dr. Raúl Ortiz Martínez
Decano del Centro



c.c.p. Jefa del Departamento de Control Escolar
c.c.p. Sección de Certificados y Títulos
c.c.p. Secretario Técnico
c.c.p. Estudiante
c.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ

DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

P R E S E N T E

Por medio del presente y como (cargo dentro del comité) designada de la estudiante **MELISA ESTEFANÍA CEDILLO PADILLA** con ID 153085 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **DETECCIÓN DE AMILOIDOSIS REACTIVA SECUNDARIA EN BOVINOS SACRIFICADOS EN EL RASTRO MUNICIPAL DE AGUASCALIENTES**, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Aguascalientes, Ags. A 7 de junio del 2019
"SE LUMEN PROFERRE"


Dra. Rosa María Meléndez Soto

Cotutora



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ

DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTE


Por medio del presente y como Cotutor designado de la *estudiante MELISA ESTEFANÍA CEDILLO PADILLA* con ID 153085 quien realizó el trabajo de tesis titulado: "**Detección de Amiloidosis Reactiva Secundaria en Bovinos Sacrificados en el Rastro Municipal de Aguascalientes**", me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que pueda proceder a imprimirla, y continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., de junio del 2019



Dr. Raúl Ortiz Martínez
Profesor Investigador



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PRESENTE

Por medio del presente y como Asesor designada de la estudiante **MELISA ESTEFANÍA CEDILLO PADILLA** con ID 153085 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **DETECCIÓN DE AMILOIDOSIS REACTIVA SECUNDARIA EN BOVINOS SACRIFICADOS EN EL RASTRO MUNICIPAL DE AGUASCALIENTES**, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 7 de junio del 2019

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'M. de Luna López'.

Dra. María Carolina de Luna López
Asesor de Tesis



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ

DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTE

Por medio del presente y como (cargo dentro del comité) designada de la estudiante **MELISA ESTEFANÍA CEDILLO PADILLA** con ID 153085 quien realizó el trabajo de tesis titulado: **DETECCIÓN DE AMILOIDOSIS REACTIVA SECUNDARIA EN BOVINOS SACRIFICADOS EN EL RASTRO MUNICIPAL DE AGUASCALIENTES**, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

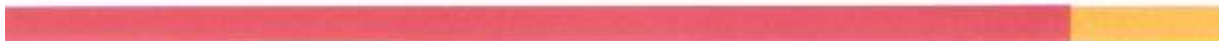
Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., 6 de junio del 2019
"SE LUMEN PROFERRE"

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Alma Lilián Guerrero Barrera'.

Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera
Asesora de Tesis



AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por permitirme cursar el posgrado y brindarme el apoyo para poder concluirlo, CONACYT por el apoyo al otorgarme una beca, al Centenario Hospital Miguel Hidalgo por abrirme las puertas de sus instalaciones y permitirme capacitarme y a los médicos veterinarios del rastro Municipal de Aguascalientes, por permitirme el acceso y realizar la toma de muestras.

Al comité tutorial de mi proyecto, al Dr. Raúl Ortiz Martínez, a la Dra. María Carolina de Luna López, a la Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera y a la Dra. Leticia Esperanza Medina Esparza; por su apoyo incondicional durante todo el proceso, por orientarme y capacitarme para realizar el trabajo de la mejor manera, por motivarme y alentarme a continuar en los momentos difíciles; agradecimiento especial a mi tutora, la Dra. Rosa María Meléndez Soto, a quien le agradezco permitirme hacer de su trabajo mi proyecto de Maestría, por confiar en que yo sería capaz de terminarlo de la mejor manera.

A la Maestra Leticia Chávez González por su tiempo, dedicación y cariño al guiarme y enseñarme todo lo que sabe sobre las técnicas histológicas.

Al Biólogo Higinio Manuel González Reynaga, por su valiosa participación en este proyecto, al apoyarme en la estandarización de técnicas histopatológicas.

DEDICATORIA

Con todo mi amor y respeto a mis padres, Martha Patricia Padilla Rodríguez y José Ascensión Cedillo Atilano que siempre estuvieron junto a mí, apoyándome durante todo el proceso y alentándome a continuar y no desistir, incluso a sufrir conmigo las dificultades que se presentaron durante todo este tiempo, sin ellos nada de esto sería posible y por ellos todo vale la pena.

A mis hermanas, Cynthia y Belén, que siempre me apoyaron.

A mi novio, Rolando, que tuvo que ser paciente durante este tiempo, aguantando mis momentos de estrés y angustia, quien siempre me apoyo para continuar y quien hasta el momento me alienta a seguir estudiando y prepararme.

A mis sobrinos Sofía y Raúl, por ser una fuente diaria de alegría, inspiración y motivación.

A mis abuelos Raúl y Ascensión, por ayudarme a poder ingresar a este posgrado, sin ellos esto no hubiera sido posible, quienes me enseñó que la vida es un pequeño recorrido hecho para disfrutarse, acompañado de grandes personas.

Gracias por siempre confiar en que podría concluir esta etapa de mi vida profesional.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	
ÍNDICE GENERAL.....	1
INDICE DE TABLAS.....	5
INDICE DE FIGURAS.....	7
ACRÓNIMOS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
CAPITULO I	
1.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
CAPITULO II	
MARCO TEÓRICO	
2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	17
2.2 ESTRUCTURA DEL AMILOIDE Y CLASIFICACIÓN.....	18
2.2.1 AMILOIDOSIS PRIMARIA	21
2.2.2 AMILOIDOSIS SECUNDARIA	22
2.2.3 PATOGENIA DE AMILOIDOSIS SECUNDARIA.....	24
2.3 ENFERMEDADES PRIÓNICAS: PATOGENIA ANÁLOGA A LA AMILOIDOSIS.....	26
2.4 DIAGNÓSTICO DE AMILOIDOSIS.....	28
2.4.1 UBICACIÓN DEL AMILOIDE EN ALGUNOS TEJIDOS.....	31
2.5 TRATAMIENTO.....	32

2.6 AMILOIDOSIS EN ANIMALES.....	33
2.6.1 AMILOIDOSIS EN BOVINOS.....	36
2.7 AMILOIDOSIS EN HUMANOS.....	38
CAPITULO III	
DISEÑO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	
3.0 HIPÓTESIS.....	42
3.1 OBJETIVOS.....	42
CAPITULO IV	
MATERIALES Y MÉTODOS	
4. 1 LUGAR DE ESTUDIO.....	44
4.2 TAMAÑO DE MUESTRA.....	44
4.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	45
4.4 ANÁLISIS MORFOLÓGICO.....	47
4.4.1 TÉCNICA HISTOLÓGICA PARA MICROSCOPIA ÓPTICA.....	47
4.4.2 TÉCNICA PARA TINCIÓN CON HEMATOXILINA- EOSINA.....	48
4.4.3 TÉCNICA PARA TINCIÓN CON ROJO CONGO.....	48
4.4.4 TÉCNICA PARA TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON.....	49
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	49
4.5.1 VARIABLES.....	49
4.5.2 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS TOTALES.....	50
4.5.2.1 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS.....	50
4.5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	51
CAPITULO V	
RESULTADOS	
5.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS.	52
5.1.1 DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE HALLAZGOS MORFOLÓGICOS MACROSCÓPICOS SUGESTIVOS DE AMILOIDOSIS.....	52

5.1.2 IDENTIFICACIÓN LOS HALLAZGOS MICROSCÓPICOS A TRAVÉS DE LA TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA EMPLEANDO MICROSCOPIO ÓPTICO.....	54
5.1.3 DETECCIÓN DE AMILOIDOSIS SISTÉMICA REACTIVA A TRAVÉS DE LA TINCIÓN ROJO CONGO Y MICROSCOPIO DE LUZ POLARIZADA.....	58
5.1.4 DESCRIPCIÓN CUALTITATIVA DE LOS DEPÓSITOS DE AMILOIDE EN RELACIÓN A SU LOCALIZACIÓN.....	68
5.1.5 DISCRIMINACIÓN DE LA AMILOIDOSIS LOCALIZADA DE AMILOIDOSIS REACTIVA SECUNDARIA.....	72
5.1.6 ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE SIGNOS CLÍNICOS Y/O HALLAZGOS MACROSCÓPICOS SUGESTIVAS DE AMILOIDOSIS CON EL HALLAZGO CONFIRMADO EN EL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO A TRAVÉS DE LA TINCIÓN ROJO CONGO Y TICROMICA DE MASSON.....	72
5.1.7 ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE PROTEINURIA CON AMILOIDOSIS RENAL.....	76
CAPITULO VI	
DISCUSIÓN	
6.1 DETECCIÓN DE LESIONES MACROSCÓPICOS SUGESTIVOS DE AMILOIDOSIS.....	79
6.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS HALLAZGOS MICROSCÓPICOS A TRAVÉS DE LA TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA EMPLEANDO MICROSCOPIO ÓPTICO.....	81
6.3 DETECCIÓN DE AMILOIDOSIS SISTÉMICA REACTIVA A TRAVÉS DE LA TINCIÓN ROJO CONGO Y MICROSCOPIO DE LUZ POLARIZADA.....	82
6.4 DESCRIPCIÓN CUALTITATIVA DE LOS DEPÓSITOS DE AMILOIDE EN RELACIÓN A SU LOCALIZACIÓN.....	84
6.5 DISCRIMINACIÓN DE LA AMILOIDOSIS LOCALIZADA DE AMILOIDOSIS REACTIVA SECUNDARIA.....	85
6.6 ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE SIGNOS CLÍNICOS Y/O HALLAZGOS MACROSCÓPICOS SUGESTIVAS DE AMILOIDOSIS CON EL	

HALLAZGO CONFIRMADO EN EL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO A TRAVÉS DE LA TINCIÓN ROJO CONGO Y TICROMICA DE MASSON.....	86
6.7 ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE PROTEINURIA CON AMILOIDOSIS RENAL.....	87
CAPITULO VII	
CONCLUSIÓN.....	89
BIBLIOGRAFÍA.....	91
ANEXOS	
ANEXO A. ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA.....	103
ANEXO B. TÉCNICA HISTOLÓGICA PARA MICROSCOPIA ÓPTICA.....	105
ANEXO C. TINCIÓN COMPLETA PARA HEMATOXILINA-EOSINA.....	109
ANEXO D. TÉCNICA COMPLETA PARA LA TINCIÓN ROJO CONGO.....	110
ANEXO E. TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON.....	111
ANEXO F. TÉCNICA EMPLEADA PARA ESPECTROFOTOMETRÍA.....	112
ANEXO G. DESCRIPCIÓN DE LESIONES Y/ O HALLAZGOS MACROSCÓPICOS DURANTE LA TOMA DE MUESTRAS.....	114
ANEXO H. PERMANGANATO DE POTASIO.....	116

INDICE DE TABLAS

Contenido	Página
Tabla 1. Principales acontecimientos históricos con relación a la amiloidosis	17
Tabla 2. Especies animales con reporte de amiloidosis	35
Tabla 3. Principales enfermedades crónicas en humanos asociadas a la edad y a la presencia de cuerpos amiloides.	40
Tabla 4. Distribución de animales positivos y negativos a amiloidosis, de acuerdo a las variables registradas en la encuesta epidemiológica.	61
Tabla 5. <i>Animales positivos a amiloide de acuerdo al tejido.</i>	65
Tabla 6. Distribución en el tejido del amiloide identificado en las muestras positivas	68
Tabla 7. Análisis con prueba exacta de Fisher para el estado sanitario.	73
Tabla 8. Análisis con prueba exacta de Fisher para el sexo.	73
Tabla 9. Análisis con prueba exacta de Fisher para la edad.	74
Tabla 10. Análisis con prueba exacta de Fisher para el fin zootécnico.	74
Tabla 11. Análisis con prueba exacta de Fisher para la condición corporal.	75
Tabla 12. Análisis con prueba exacta de Fisher para la presencia de hallazgos macroscópicos.	75

Tabla 13. Animales positivos a amiloidosis y la concentración de proteínas en orina.	76
Tabla 14. Resultados obtenidos con tiras reactivas y kit comercial	77



INDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
FIGURA No. 1. Ingreso de los datos para la calcular el tamaño de la muestra por medio del programa Win Epi (Working in Epidemiology).	45
FIGURA No. 2. Resultado obtenido del tamaño de muestra mínimo para detectar enfermedad.	45
FIGURA NO. 3. Lesiones observadas en los bovinos muestreados con y sin hallazgos sugestivos de amiloidosis.	52
FIGURA No. 4. Apariencia microscópica de lesiones en riñón de animales positivos a amiloide.	54
FIGURA No. 5. Lesiones hepáticas encontradas en los animales positivos para amiloide.	55
FIGURA No. 6. Alteraciones microscópicas encontradas en riñón, hígado, intestino y nódulo de animales que resultaron ser negativos a la presencia de amiloide.	57
FIGURA No. 7. Material compatible con amiloide en hígado (positivo a birrefringencia verde).	58
FIGURA No. 8. Material sugestivo de amiloide en riñón.	59
FIGURA No. 9. Presencia de material compatible con amiloide en intestino delgado.	
FIGURA No. 10. Material compatible con amiloidosis nodular.	60
FIGURA No. 11. Presencia de material compatible con amiloide en hígado.	62
FIRGURA No.12. Material presuntivo de amiloidosis renal.	63
FIGURA No. 13. Muestras histológicas de intestino delgado.	64
FIGURA No. 14. Muestra histológica de nódulo mesentérico.	65
FIGURA No. 15. Prevalencia real y aparente de amiloidosis IC 95%).	66

FIGURA No. 16. Prevalencia real y aparente de amiloidosis renal (IC 95%).	67
FIGURA No. 17. Prevalencia real y aparente de amiloidosis hepática (IC 95%).	67
FIGURA No. 18. Prevalencia real y aparente de amiloidosis intestinal (IC 95%).	67
FIGURA No. 19. Alteraciones microscópicas sugestivas de amiloidosis renal.	69
FIGURA No. 20. Alteraciones microscópicas sugestivas de amiloidosis intestinal.	69
FIGURA No. 21. Muestras histológicas de hígado con presencia de amiloidosis.	70
FIGURA No. 22. Hallazgo histológico en hígado con material sugestivo de amiloide en estroma.	71
FIGURA No.23. Curva de Calibración con kit de proteínas totales AA Wiener Lab.	78

ACRÓNIMOS

A Amiloide	MM Mieloma múltiple
AA Amiloidosis Secundaria	ml mililitros
AL Amiloidosis Primaria	µm micras
ADN Acido Desoxirribonucleico	µl microlitros
°C Grados Celsius	mg miligramos
COOH Grupo carboxilo	NaH₂PO₄ Fosfato de sodio monobásico
dl decilitros	Na₂HPO₄ Fosfato de sodio dibásico
EEB Encefalopatía Espongiforme Bovina	NH₂ Grupo amino
ELISA Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas	OMS Organización Mundial de la Salud
ELA Esclerosis Lateral Amiotrófica	PrP^{Sc} Patógeno Plegado
FDA Factor Degradante de Amiloide	PrP Proteína Prion
FVA Factor Favorecedor de Amiloide	PrPC Proteína Prion Celular
g gramo	RC Rojo Congo
HDL Apolipoproteína de alta Densidad	SAA Amiloide Sérico A
HE Hematoxilina Eosina	TFN Factor de Necrosis Tumoral
IL-1 Interleucina 1	USDA Departamento de Agricultura de Estados Unidos
IL-6 Interleucina 6	Win Epi Working in Epidemiology
L litro	
mg miligramos	

RESUMEN

Detección de amiloidosis reactiva secundaria en bovinos sacrificados en el rastro municipal de Aguascalientes

Cedillo-Padilla ME, Meléndez-Soto RM, de Luna-López MC, Ortiz-Martínez R, Guerrero-Barrera AL, Medina-Esparza LE.

La amiloidosis es un trastorno poco conocido presente en humanos y animales, resultado del depósito de proteínas fibrilares con plegamiento defectuoso debido a un incremento de hojas β plegadas en su estructura secundaria. Ha sido asociado a enfermedades neurodegenerativas y priónicas. Uno de sus tipos es la amiloidosis sistémica (AA), que puede derivarse de procesos inflamatorios crónicos. La enfermedad comienza con el depósito de amiloide en riñón, pero también puede extenderse a hígado, bazo, nódulos linfáticos, piel e intestinos.

Existe evidencia, tanto natural como experimental, sobre la transmisión de este trastorno entre individuos de la misma especie e inter-especie por diversas vías cuando existe una sobreexpresión de amiloide sérico debido a un estímulo inflamatorio o transgénesis.

En las especies empleadas para consumo humano la amiloidosis es relevante en los bovinos, pues su incidencia puede alcanzar de un 1.2% a un 5.5% en Japón. Con todo lo anterior, y tomando en cuenta que el consumo de proteína animal en México ha aumentado en los últimos años, se presume que existe riesgo por el consumo de los productos procedentes del bovino, por lo que resulta importante conocer la existencia del trastorno en los animales que se sacrifican en la región y favorecer la inocuidad alimentaria.

Se tomaron muestras de tejido de 101 animales para ser procesadas mediante técnicas histológicas (tinción Rojo Congo, hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson) para detectar la presencia de amiloidosis.

Se encontró un 12.9% (13/101) de animales presuntamente positivos a amiloide, por lo que existe riesgo de desarrollar el trastorno si se consumen dichos productos cárnicos de la región y coexiste una enfermedad inflamatoria crónica.

Palabras clave: amiloidosis, proteínas, transmisión, inocuidad alimentaria.



ABSTRACT

Detection of secondary reactive amyloidosis in slaughtered cattle in the municipal trail of Aguascalientes

Cedillo-Padilla ME, Meléndez-Soto RM, de Luna-López MC, Ortiz-Martínez R, Guerrero-Barrera AL, Medina-Esparza LE.

Amyloidosis is a little known disorder present in humans and animals, resulting from the deposition of fibrillar proteins with defective folding due to an increase of folded β sheets in their secondary structure. It has been associated with neurodegenerative and prion diseases. One of its types is systemic amyloidosis (AA), which can be derived from chronic inflammatory processes. The disease begins with the deposition of amyloid in the kidney, but it can also spread to the liver, spleen, lymph nodes, skin and intestines.

There is evidence, both natural and experimental, about the transmission of this disorder between individuals of the same species and inter-species through various routes when there is an overexpression of serum amyloid due to an inflammatory stimulus or transgenesis.

In the species used for human consumption, amyloidosis is relevant in cattle, as its incidence can reach 1.2% to 5.5% in Japan.

With all the above, and taking into account that the consumption of meat protein in Mexico has increased in recent years, it is presumed that there is risk for the consumption of such meat products from cattle, so it is important to know the existence of the disorder in animals that are slaughtered in the region and promote food safety.

Tissue samples were taken from 101 animals to be processed by histological techniques (Congo red stain, hematoxylin-eosin and Masson's trichromic stain) to detect the presence of amyloidosis.

It was found a 12.9% (13/101) of animals presumptively positive to amyloid, so there is a risk to develop the disorder if consumed such meat products in the region and coexists a chronic inflammatory disease

Keywords: amyloidosis, proteins, transmission, food safety

INTRODUCCIÓN

Las proteínas se encuentran en cada célula y tejido de cualquier ser vivo y hay una estrecha relación entre alteraciones patológicas y cambios en su estructura. Varias proteínas estructurales fibrilares se encuentran en las células y espacio extracelular (Torres y Alí, 2014; Raven *et al.*, 2014).

Cada proteína tiene forma y función únicas. Si cambian ciertos factores como la temperatura, el pH o si está expuesta a sustancias químicas, las interacciones moleculares entre los aminoácidos que las componen pueden alterarse, provocando que se pierda su estructura y función características y se convierta en una simple cadena de aminoácidos, a la que se conoce como estructura primaria. Cuando esto ocurre, se ha desnaturalizado y ya no es funcional (Raven *et al.*, 2014).

En algunas proteínas, la desnaturalización puede revertirse (Torres y Alí, 2014), existen estudios en lo que se ha demostrado que algunas proteínas pueden volver a plegarse después la desnaturalización. Puesto que las proteínas pueden pasar por sí mismas de una forma no estructurada a una plegada, sus secuencias de aminoácidos deben contener toda la información necesaria para el plegamiento; sin embargo, no todas las proteínas son capaces de hacerlo y la manera en que se pliegan normalmente en una célula parece ser complicado. Uno de los sistemas de control del plegamiento son las chaperonas moleculares (Macarulla y Goñi, 1994; Lee y Tsai 2005).

Cuando las proteínas comienzan a plegarse de forma defectuosa se desencadenan desórdenes o enfermedades de diferente índole, algunas de ellas se caracterizan por la presencia de agregados de proteínas específicas mal conformadas, en regiones definidas del organismo, que genéricamente se conocen como amiloide (Murakami *et al.*, 2014; Hirschfield 2004; Buxbaum 2006). Ejemplos de lo anterior lo constituyen la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, las enfermedades ocasionadas por priones, la amiloidosis asociada a diálisis renal crónica, la amiloidosis derivada de las cadenas ligeras y la polineuropatía familiar.

Aunque hay muchos factores asociados a ellas, como el envejecimiento, la presencia de ciertos genes y también de enfermedades concomitantes, existe evidencia de que uno de los componentes puede ser de tipo infeccioso, tanto intra como inter- especie, y por dicha razón requieren ser estudiados.

Dado que la amiloidosis AA (amiloidosis sistémica) es una complicación que incrementa el riesgo de mortalidad en personas con enfermedades crónicas inflamatorias como artritis y tuberculosis, estos pacientes en riesgo deben evitar la ingestión de alimentos que pudieran contener amiloide, razón por la cual se realizó el siguiente estudio, ya que para garantizar la inocuidad alimentaria, se requiere información detallada sobre este trastorno en los animales que se utilizan para el consumo humano, como los bovinos.

El siguiente documento presenta los datos más importantes de la amiloidosis, desde sus antecedentes, patogenia, diagnostico, características en animales (bovino) y en el hombre, así como su tratamiento. Además, se muestran los objetivos particulares del proyecto realizado, así como los procedimientos llevados a cabo, los resultados obtenidos y las discusiones correspondientes; todo lo anterior organizado en capítulos.

CAPITULO I

1.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A diferencia de lo que se consideraba hasta hace algunos años y que visualizaba la amiloidosis como un trastorno degenerativo y poco frecuente, hoy en día existe evidencia que indica que no sólo su frecuencia va en aumento, sino que además puede transmitirse entre individuos de una misma especie y de especies distintas (Cui *et al.*, 2002; Puig *et al.*, 2014)

De manera experimental se ha inducido por medio de diferentes vías y en distintas especies (bovinos, aves y algunos roedores), y se ha observado que puede ocurrir de manera espontánea si se mantiene el requisito de una situación inflamatoria crónica y una predisposición genética para el desarrollo de esta condición.

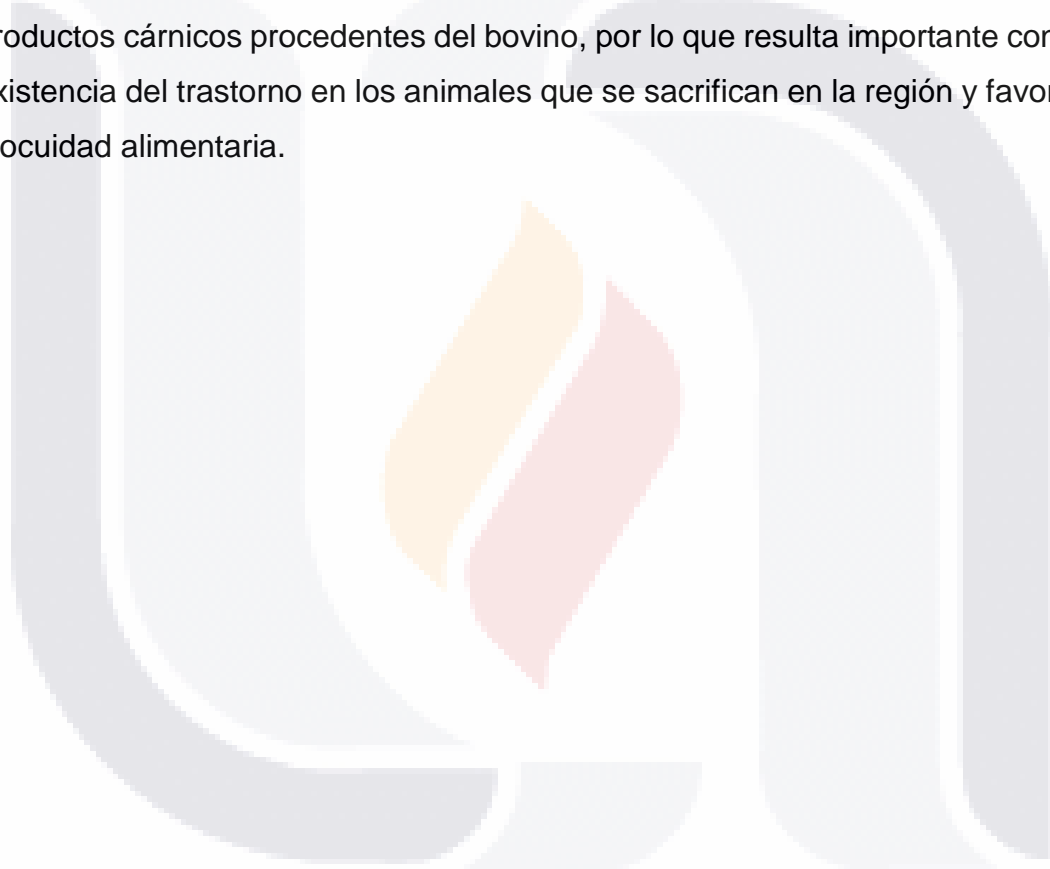
En las especies empleadas para consumo humano la amiloidosis es relevante en los bovinos, ya que su incidencia puede alcanzar de un 1.2% a un 5.5% de los animales que llegan al matadero en otros países como Japón. Afecta órganos comestibles (hígado, sistema digestivo y músculo esquelético) y puede presentarse de manera subclínica (Fujinaga 1990; Tojo *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2009).

Así como en las enfermedades priónicas, la amiloidosis puede transmitirse de diferentes maneras; por vía oral, intravenosa, intraperitoneal y por medio de trasplantes de órganos. El material es muy resistente a tratamientos físicos (altas temperaturas y rayos UV) y químicos (desinfectantes comunes, proteasas y detergentes). Se requiere un tratamiento seco de 5 minutos a una temperatura de entre 600° y 1000° C para poder destruir este tipo de proteínas (López Herrera *et al.*, 2002; Westermark *et al.*, 2009).

Según el diario “El Economista” en su versión del 26 de febrero del 2019 afirma que el consumo de proteína cárnica en México ha aumentado en los últimos años.

El consumo anual de la carne en México, asciende a 65 kilos por persona, señaló la presidenta del Consejo Mexicano de la Carne (Comecarne), Carla Suárez Flores. En el marco de la Expo Carne y Lácteos 2019 que se celebra en Monterrey, Nuevo León, resaltó que en el 2018 se registró un aumento del 3.7% en el consumo de carne en el país, en relación con las cifras del 2017 (El economista, 2019).

Con todo lo anterior, se presume que existe riesgo por el consumo de dichos productos cárnicos procedentes del bovino, por lo que resulta importante conocer la existencia del trastorno en los animales que se sacrifican en la región y favorecer la inocuidad alimentaria.



CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Si bien la amiloidosis se conoce desde hace cientos de años sólo en las últimas décadas ha llegado a estudiarse con más profundidad (Gertz *et al.*, 2013). Virchow acuñó el término de amiloidosis en 1854 debido a su afinidad con la tinción con yodo, muy similar a las de material extracelular vegetal como el almidón. Posteriormente, en 1859 Fiedreich y Kekulé descubrieron su naturaleza proteica y en la segunda mitad del siglo XX se descubrió el papel de los glicosaminoglicanos, el heparán sulfato y/o condroitín sulfato en la composición del amiloide (Macarulla y Goñi, 1994).

A continuación, se muestran acontecimientos importantes referentes a esta enfermedad (Tabla 1).

Tabla 1. Principales acontecimientos históricos con relación a la amiloidosis

Año	Acontecimiento
1639	Se realizó lo que se presume es la primera descripción general de amiloidosis.
1772	Descripción de Scrapie.
1842	Primer reporte anatomopatológico de amiloidosis.
1854	Se acuña el término amiloidosis.
1859	Se conoce la naturaleza proteica del amiloide.
1922	Se describe la tinción Rojo Congo como método diagnóstico.
1959	Descripción del Kuru (Enfermedad priónica)
1959	Descripción del amiloide a través del microscopio óptico por Cohen.
1966	Se describe su morfología estructural, determinando un tamaño de 7.5 a 10 nm con una capa hidrofóbica.

1971	Primera propuesta de la patogenia.
1971	Primera secuencia proteica de amiloide.
1971	Benditt y Eriksen proponen un sistema de nomenclatura para los diferentes tipos de amiloidosis.
1973	Wrighted utiliza el permanganato de potasio como método diagnóstico para diferenciar AA de no AA.
1980	Glenner emplea el término “beta-fibrosis” para describir enfermedades amiloidóticas pero no es aceptado. Se estudian y describen enfermedades cerebrales encontrando las mismas fibras características del Alzheimer humano.
1983	Prusiner confirma la utilidad de la tinción Rojo Congo como método diagnóstico en hamster con Scrapie experimental.
1999	Se aísla amiloide de glándula mamaria y leche bovina.
2001	McDonald aísla fibrillas amiloides de origen bovino, demostrando una sola banda de reacción cruzada correspondiente a amiloide-A3 en suero.

AA= Amiloidosis sistémica.

(Nizhnikov *et al.* 2015; Gruys, 2004).

2.2 ESTRUCTURA DEL AMILOIODE Y CLASIFICACIÓN

La amiloidosis es un grupo de enfermedades caracterizadas por una acumulación focal, sistémica o generalizada de proteínas con plegamiento defectuoso en órganos y tejidos de animales y humanos. La sustancia amiloide está conformada básicamente por la proteína fibrilar amiloide (la que diferencia amiloidosis AA de AL), el componente P (común a todas las variedades de amiloidosis), glicosaminoglicanos, mucopolisacáridos y oligoelementos como el calcio (Panqueva y Rodriguez, 1986; Ménsua *et al.*, 2003; González *et al.* 2009).

El componente P tiene su origen del componente P plasmático que es una glucoproteína de síntesis hepática. Se desconoce su función en la patogenia de la enfermedad, aunque se le atribuye su papel como facilitador de la formación del depósito y acúmulo de las proteínas fibrilares. (González *et al.* 2009; Contreras, 2001).

Independientemente de su naturaleza química, las fibrillas insolubles de amiloide comparten una naturaleza ultraestructural característica rígida, no ramificada, aproximadamente con un diámetro de 7.5 a 10 nm con una longitud no determinada y un núcleo hidrofóbico. La observación al microscopio electrónico reveló un giro superficial y dos protofibrillas. Estudios posteriores de difracción de rayos X y espectroscopía infrarroja describieron patrones acordes con hojas β plegadas antiparalelas como estructura molecular del AA y el AL (Sipe *et al.*, 2014).

Se han identificado variedad de proteínas amiloidogénicas, 28 en humanos y más de 15 en animales, las cuales en condiciones normales son inofensivas y solubles. Éstas tienen secuencias no relacionadas, pero pueden polimerizar en fibras que tienen una apariencia ultraestructural similar, rica en hojas β plegadas (Baker y Race, 2012; Woldesmekel, 2012; Murakami *et al.*, 2014).

Existe evidencia que afirma que alrededor de 30 diferentes especies de mamíferos (incluyendo al humano) son susceptibles a la enfermedad como es el caso de los perros Sharpei y los gatos Abisinios; además de otros animales domésticos y salvajes (Jakob, 1971).

La amiloidosis ha sido asociada a la presencia de procesos inflamatorios crónicos y a la acumulación de proteínas de la fase aguda de la inflamación. Su presentación más común involucra algunas vísceras, tejido conectivo y vasos sanguíneos, siendo el riñón el principal órgano afectado (Woldemeskel, 2012; Boyce *et al.*, 1984).

Existe suficiente evidencia, tanto natural (guepardos, gallináceas y murinos) como experimental, sobre la posibilidad de transmisión de este trastorno entre individuos de la misma especie e inter-especie cuando existe una sobre-expresión de amiloide sérico A (SAA) debido a un estímulo inflamatorio o transgénesis (Jakob, 1971; Boyce *et al.*, 1984; Taniyama *et al.*, 2000; Cui *et al.* 2002; Kim *et al.*, 2005;

Shrasburg *et al.*, 2005; Tojo *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2009; Murakami *et al.*, 2014 Maeda *et al.*, 2016).

Científicos de varios laboratorios en el mundo, han demostrado que los depósitos de proteínas que se observan en la enfermedad del Alzheimer pueden ser inducidos en animales de laboratorio inyectándoles en el cerebro o en el abdomen extracto de tejido cerebral de pacientes que murieron de Alzheimer (Zaunmuktane *et al.*, 2015)

Con el paso del tiempo y el avance en el conocimiento de la estructura amiloide, han ido evolucionando los criterios para la clasificación de la enfermedad, inicialmente se basaba en parámetros eminentemente clínicos, tales como la frecuencia de daño de diversos órganos o la existencia o ausencia de enfermedad asociada (Ignaczak, 1981; Gorevic, 1981). Reimann *et al.*, en el año de 1935 clasificaban 4 formas de amiloidosis: primaria, secundaria, asociada al mieloma múltiple y una forma nodular localizada.

La amiloidosis primaria no presentaba ninguna enfermedad relacionada, afectando principalmente tejidos mesenquimatosos como el corazón, lengua, tracto gastrointestinal, pulmón, túnel carpiano y músculo esquelético (Reimann *et al.*, 1935).

La forma secundaria, se relacionaba con la presencia de enfermedades neoplásicas, inflamatorias o infecciosas crónicas, presentando mayor frecuencia en tejidos parenquimatosos como hígado, riñón, bazo y glándulas suprarrenales (Reimann *et al.*, 1935).

En la forma asociada al mieloma múltiple, la distribución de los depósitos era igual a la de la amiloidosis primaria, pero está asociada a una discrasia de células plasmáticas. Por último, la forma nodular localizada afectaba a un sólo órgano, sin evidencia de afección generalizada (Ignaczak, 1981).

En la actualidad, la amiloidosis se clasifica según dos criterios: la distribución del amiloide y la proteína fibrilar que lo constituye (González A. *et al.*, 2009). Para

nombrarla, se planteó un sistema en el cual se designa con la letra A (amiloide) y una o más letras de acuerdo con la naturaleza química del mismo en forma abreviada.

La amiloidosis que involucra varios tejidos y órganos en el cuerpo se conoce como amiloidosis sistémica y de acuerdo con su naturaleza se puede clasificar en amiloidosis AL, amiloidosis AA o amiloidosis familiar.

La segunda A de AA se deriva de una proteína de la fase aguda de la inflamación, el amiloide sérico A (SAA), que es una lipoproteína de alta densidad. La segunda letra de AL se deriva de las cadenas ligeras de inmunoglobulinas monoclonales (Sipe *et al.*, 2014).

Cuando el amiloide está confinado en un área determinada del cuerpo, se conoce como amiloidosis localizada, cuando se encuentra en más de un tejido se conoce como amiloidosis sistémica (Sipe *et al.*, 2014).

2.2.1 AMILOIDOSIS PRIMARIA

Es la forma de amiloidosis más diagnósticada y representa un 85% de todos los casos en países desarrollados. La mayor prevalencia se presenta en el sexo masculino, en personas mayores de 40 años y se ha observado una supervivencia de 10 años (Álvarez, *et al.*, 2005).

El trastorno comienza en médula ósea, donde las células plasmáticas producen inmunoglobulinas en gran cantidad (Gertz *et al.*, 2013).

En la amiloidosis AL se fabrica un exceso de cadenas ligeras mal plegadas y no ensambladas. Éstas no pueden degradarse, se unen y comienzan a formar fibras amiloides acumulándose en el espacio extracelular de órganos y tejidos, por lo que el funcionamiento de éstos se ve afectado. Se incluye dentro de esta enfermedad a

la amiloidosis asociada al mieloma múltiple (MM) o a otras enfermedades de células plasmáticas como los linfomas (Gertz *et al.*, 2013; González *et al.* 2009).

Se han encontrado y descrito varias alteraciones cromosómicas en células plasmáticas de la médula ósea, incluyendo trisomía de los cromosomas 7, 9, 11, 18 y X asociadas a amiloidosis (Álvarez, *et al.*, 2005).

Los principales órganos afectados son el riñón (en un 50% de los casos), corazón, hígado, bazo, nervios, intestino, piel, lengua y vasos sanguíneos (Gertz *et al.*, 2013).

La hepatomegalia se observa en el 50% de los pacientes y la esplenomegalia en el 10%. También se han encontrado lesiones en conductos auditivos, vulva, pubis y cara palmar de los dedos. Estas alteraciones cutáneo-mucosas y de partes blandas representan del 21 al 40% de los casos y son las que pueden orientar el diagnóstico por ser visibles (Álvarez, *et al.*, 2005).

También en especies animales se han descrito casos de amiloidosis localizada. En los caballos, pueden encontrarse amiloidomas oculares, nasales y cutáneos, entre otros (Kim *et al.*, 2005).

2.2.2 AMILOIDOSIS SECUNDARIA

La amiloidosis AA (secundaria, reactiva o adquirida) es aquella que se produce como complicación de una enfermedad inflamatoria crónica, entre las que destaca las enfermedades de origen reumatológico (artritis reumatoide, espondilitis anquilopoyética, artritis psoriásica), la fiebre mediterránea familiar, la enfermedad inflamatoria intestinal, así como infecciones de tipo crónico (tuberculosis, osteomielitis).

Otras causas responsables de su desarrollo y en muchas ocasiones infravaloradas, son las tumoraciones benignas. Algunas de estas entidades, también tendrán capacidad de actuar como estímulo responsable de la formación de estas proteínas, que finalmente se depositarán en diferentes tejidos del organismo.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Este tipo de amiloidosis ocurre cuando aumenta la concentración en sangre de una proteína denominada amiloide sérico A que es sintetizada en los hepatocitos. Esta proteína aumenta cuando existe una respuesta inflamatoria. Cuando el paciente tiene alguna infección o inflamación por seis meses o más corre mayor riesgo de desarrollar la enfermedad. Se incluye dentro de este grupo a la amiloidosis asociada a la fiebre mediterránea familiar (Gertz *et al.*, 2013; González *et al.* 2009).

La fiebre mediterránea familiar, también llamada poliserositis familiar paroxística es una enfermedad de carácter hereditario con una forma de transmisión autosómica recesiva, caracterizada por episodios recurrentes y breves de fiebre y dolor por inflamación de una o varias serosas (peritoneo, pleura, pericardio, sinovial o túnica vaginal del testículo). La amiloidosis es su complicación más importante y suele ser la principal causa de muerte en los casos en que se presenta (Buades *et al.*, 2001). Por lo general tanto en humanos como en animales la enfermedad comienza con el depósito de amiloide en riñón (en zona medular en el caso de los gatos y glomerular en otras especies), pero el hígado, el bazo, nódulos linfáticos, piel e intestinos también se ven afectados (Gertz *et al.*, 2013; DiBartola, 1992).

Esta forma de amiloidosis tiene mal pronóstico, ya que depende principalmente de la enfermedad subyacente y cursa con una evolución fatal que suele terminar con insuficiencia renal (Álvarez *et al.*, 2005).

En el caso de los animales, ha sido descrita en especies salvajes como los guepardos y domésticas como los bovinos y los caballos (Jakob, 1971; Bouda *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005; Woldesmekel, 2012; Murakami *et al.*, 2014).

2.2.3 PATOGENIA DE AMILOIDOSIS SECUNDARIA.

Existen hasta el momento cinco diferentes propuestas sobre la formación de cuerpos amiloides, sus precursores y la forma en la que éstos se depositan (Martínez y *et al.*, 2001; Blancas y Ramírez, 2013; Woldemeskel, 2012; Boyce *et al.*, 1984).

- Mediante la propagación de cambios conformacionales que ocasionan la agregación de amiloide, sirviendo como una plantilla molecular para el plegado y agregación adicional de otras proteínas normales, donde no se ha observado sobreproducción ni proteólisis (por ejemplo, enfermedades por priones; Prusiner, 1989).
- La falla en los procesos proteolíticos de la proteína mal plegada que conduce a la acumulación del precursor propenso a la agregación sin sobreproducción del precursor, en muchos casos debido a mutaciones en la proteína precursora o la proteasa (por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer; Haass *et al.*, 1991).
- Las mutaciones que hacen que la proteína sea cinética y/o termodinámicamente inestable aumentando así la cantidad de proteínas mal plegadas; favoreciendo su agregación en un proceso energéticamente favorable (Serag *et al.*, 2001; Laidman *et al.*, 2006).
- La sobreproducción del precursor de la proteína amiloide (SAA) por la cantidad anormal de la población de células secretoras da como resultado altos niveles de proteína circulante en torrente sanguíneo que puede superar el control de la calidad de la proteína extracelular y el sistema de degradación (Gass *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2008).

- La última propuesta aceptada por los investigadores habla de la pérdida de la interacción que estabiliza a una proteína por un mecanismo mediado por chaperonas, haciendo imposible la reparación o destrucción; o bien cuando las chaperonas son deficientes trayendo consecuencias variadas sobre la homeostasis proteica (Martínez *et al.*, 2001; Macario, 2005; Blancas y Ramírez, 2013).

Además, el sistema ubiquitina-proteosoma es fundamental para mantener el recambio proteico en los diferentes órganos y, en la amiloidosis, se produce una falla en este nivel (Rodríguez y Méndez, 2018).

Se postula una fase llamada pre-amiloide (formación de cuerpos amiloides y de sus precursores), donde se desencadena un proceso llamado respuesta de la fase aguda de la inflamación. Ésta es una reacción que se produce tanto en animales como en humanos ante una respuesta a daños o cambios en la homeostasis causada por infección, daño tisular, crecimiento neoplásico o desórdenes inmunológicos (Kushner *et al.*, 1981).

Inicia con la liberación de citocinas como la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral (TFN- α). Éstas son liberadas por monocitos y macrófagos en el sitio de daño (Martínez *et al.*, 2001). Su aumento en el torrente sanguíneo comenzará con el estímulo de la respuesta de la fase aguda en el hígado (Martínez *et al.*, 2001). Esta fase se caracteriza por fiebre, incremento de la permeabilidad vascular y en general un aumento de los procesos metabólicos (Loos, 2005).

Las principales causas que pueden provocar una respuesta de fase aguda tanto en animales como en humanos son: inflamación aguda y crónica, infecciones bacterianas, víricas y problemas parasitarios, endotoxemia, intervenciones quirúrgicas, traumatismos, quemaduras, procesos tumorales, infecciones neonatales, gestación y estrés.

Durante esta fase de respuesta se produce una variación en la concentración de diferentes proteínas presentes en el plasma sanguíneo, denominadas proteínas de fase aguda, como la haptoglobina, proteína C reactiva, amiloide A sérico (aumenta aproximadamente 8 horas tras el inicio de la respuesta de fase aguda), ceruloplasmina, alfa 1-glicoproteína ácida y el fibrinógeno (Guibarra y Lliulli, 2011). Actualmente existen diversos estudios que comprueban que la cuantificación de la concentración de éstas puede proporcionar una valiosa información para el diagnóstico de diversas enfermedades (Eckersall, 2000). Adicionalmente, SAA es más sensible a inflamaciones leves, y por lo tanto sirve para distinguir infecciones virales de bacterianas. El análisis de SAA está disponible en caballo, perro, gato y ganado vacuno.

Esta respuesta tiene diferentes funciones, entre las que destacan: a) proporcionar energía y sustratos al organismo, b) evitar transferir metabolitos necesarios para los patógenos y c) limitar el daño que causan éstos y así poder eliminar el tejido dañado y restaurar el tejido sano.

Se conocen también, otros dos factores implicados en la formación del cuerpo amiloide, el factor favorecedor de la amiloidosis (FVA), glucoproteína capaz de inducir amiloidosis experimental de manera rápida, y el factor degradante de amiloide (FDA), capaz de degradar la proteína AA en agar, cuya traducción fisiológica es la elastasa leucocitaria (González *et al.*, 2009).

2.3 ENFERMEDADES PRIÓNICAS: PATOGENIA ANÁLOGA A LA AMILOIDOSIS

Las enfermedades priónicas son de carácter neurodegenerativo, con curso fatal, tanto en animales como humanos. Los signos clínicos incluyen la pérdida de la

coordinación motora y demencia en etapas avanzadas. Su transmisión ocurre de manera horizontal y vertical, pero se ha observado también predisposición genética (Pacífico y Galotta, 2002; Barashi *et al.*, 2013).

Los priones están compuestos solamente por proteínas y no contienen material genético propio. De la misma forma que el amiloide, se producen por el plegamiento erróneo de una proteína prion codificada por el huésped (PrP) y su acumulación. La PrP puede existir como una proteína prion celular normal designada como PrPC y un conformador plegado patógeno designado como PrPSc (Pacífico y Galotta, 2002; Fernández-Borges *et al.*, 2015).

Las PrPSc son infecciosas mas no contagiosas, son proteínas neurotóxicas, transmisibles entre individuos y causantes de enfermedades neurológicas en los seres humanos y en una amplia gama de especies animales. Se conoce que pueden ser transferidas de manera accidental mediante procesos quirúrgicos y médicos (Pacífico y Galotta, 2002; Centro de Investigación Unidad de Priones del MRC y UCL, 2014).

Existen actualmente 16 variantes de la enfermedad, como Scrapie en los ovinos y caprinos, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) del visón, felina, del ungulado, de los primates, enfermedad crónica desgastante del venado, kuru, insomnio fatal y Creutzfeldt Jakob en los humanos, entre otras (Woldesmekel *et al.*, 2012).

El descubrimiento de la EEB, su transmisión hacia los humanos (variante de Creutzfeldt Jakob) y la evidencia de 109 fallecimientos por esta causa han estimulado la investigación de este tipo de enfermedades, con resultados inesperados (Pacífico y Galotta, 2002).

En histopatología se muestra astrogliosis y vacuolización o espongirosis del citoplasma de las neuronas afectadas acompañadas por depósitos de amiloide, razón por la que se consideran las enfermedades priónicas como enfermedades análogas a las amiloidosis (Pacífico y Galotta, 2002; Fernández-Borges *et al.*, 2015).

Según las hipótesis establecidas, la infección comienza con la ingestión o inoculación de la proteína defectuosa (PrP), que promueve la transformación de

proteínas normales en proteínas anormales, disparando reacciones en cadena (Pacífico y Galotta, 2002; Barashi *et al.*, 2013; Fernández-Borges *et al.*, 2015).

Se conoce como neuroinvasión a la migración desde el sitio de inoculación, desde el sistema digestivo hasta el sistema nervioso central. Esto es posible porque estas proteínas, al igual que el amiloide, son resistentes a las proteasas. La interrupción de este proceso constituye la principal medida terapéutica (Pacífico y Galotta, 2002).

La proteína anormal atraviesa intestino por medio de las placas de Peyer, en donde las células linfáticas fagocitan al prion, y lo transportan a otros órganos, donde se replicará la isoforma anormal de proteína. En seguida avanza por flujo axoplásmico retrógrado hasta alcanzar la médula espinal y finalmente el encéfalo.

Este proceso dependerá de los linfocitos B, cuya principal función es el mantenimiento de las células dendríticas del bazo y los linfonodos (Pacífico y Galotta, 2002).

Se conoce a su vez, la transmisión por medio de transfusiones sanguíneas, en las que la isoforma anormal ya no tiene que pasar por sistema digestivo, si no que migra directamente al sistema nervioso central (Pacífico y Galotta, 2002; Barashi *et al.*, 2013; Fernández-Borges *et al.*, 2015).

2.4 DIAGNÓSTICO DE AMILOIDOSIS

El diagnóstico se basa principalmente en la sospecha clínica y la identificación de cuerpo amiloide en cualquier tejido. En la actualidad la histopatología es la prueba más utilizada por su sensibilidad y especificidad. El amiloide puede observarse con hematoxilina-eosina (HE), e identificarse por ser un material amorfo, eosinofílico, con apariencia hialina y homogénea.

La tinción con Rojo Congo (RC) se considera la técnica estándar para la detección de amiloide, tiene una sensibilidad de entre el 54% y el 82% y una especificidad del 100% para la detección de amiloide, produciendo una coloración rojo ladrillo; esta

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

técnica adquiere un color verde manzana llamado birrefringencia verde (la presencia de birrefringencia verde manzana es obligatoria para este diagnóstico en algunos estudios) al observarse con microscopio de luz polarizada (Sen y Başdemir, 2003; Hazenberg *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2005; Herrera y Piken, 2006; Piken, 2007; Mora, 2011; Bowen *et al.*, 2012; Woldemeskel *et al.*, 2012).

La sensibilidad varía según el tejido, la médula ósea tiene una sensibilidad del 63%, riñón, hígado y corazón del 87% al 98% y el recto del 69% al 97% (Bowen *et al.*, 2012).

En la actualidad, se han encontrado limitaciones en el uso de esta técnica, pues se ha demostrado que no es confiable en todos los casos, en particular con una cantidad mínima de amiloide (Cooper, 1969; Linke, 2000; Sen y Basdemir, 2003)

También se ha observado que para que el colorante Rojo Congo se una al amiloide se necesita que el tejido tenga un espesor de 8 μm (micras) para demostrar la birrefringencia (Elghetany *et al.*, 1989). Por lo que, si solo se basa en la birrefringencia para el diagnóstico de esta condición, algunos casos podrían tomarse como falsos negativos.

Klatskin, hace ya más de 40 años, dudó de la especificidad de la tinción Rojo Congo; encontrando que existían focos de birrefringencia verde en los tejidos conectivos del hígado y otros órganos en condiciones normales tanto en el hombre como en la rata, por lo que se aconseja emplear técnicas de tinción complementarias como la mancha de Verhoff para tejido elástico, la tinción tricrómica de Masson para el tejido conectivo y la fibrina, o la tinción con ácido de Schiff periódica para uromodulina. En cada caso, las secciones de tejido de 4 a 10 μm de espesor son indispensables para una correcta pigmentación.

La tinción tricrómica de Masson fue descrita en 1929 en un reporte titulado Some histological methods. Trichrome stainings and their preliminary technique, en el que realizó tinciones de tejido conectivo, resaltando la coloración azul del colágeno y la coloración roja de la fibra muscular del músculo esquelético. Es una tinción especial que permite observar definitivamente fibras de colágeno tipo I que forman fibras gruesas o haces, diseñados para dar resistencia los tejidos (Greenwald *et al.*, 2004).

Para aumentar la detección de amiloide, se han utilizado métodos alternativos, incluida la tinción inmunohistoquímica utilizando anticuerpos contra componentes amiloides variables o el examen de cortes de tejido teñidos con rojo de congo mediante microscopía fluorescente.

Se ha demostrado que la tinción Rojo Congo combinada con la inmunohistoquímica es más sensible que solo emplear la técnica de Rojo Congo (Linke *et al.*, 1995).

Algunas de las limitaciones del método inmunohistoquímico pueden incluir la disponibilidad de anticuerpos y la posibilidad de resultados negativos en casos con cantidades muy pequeñas de amiloide (Linke *et al.*, 1995).

Existe una técnica alternativa llamada método del permanganato de potasio para diferenciar amiloidosis localizada de amiloidosis sistémica, en la que se somete al tejido colocado en la laminilla a una solución de permanganato de potasio al 5% previo a la tinción con Rojo Congo, siendo los depósitos de amiloide AA sensibles a esta técnica, provocando así que pierdan la capacidad de teñirse (Rijswijk y Heusden, 1979; Álvarez *et al.*, 2005; Matsuura *et al.*, 2017).

En la actualidad el empleo de inmunoperoxidasa suele ser lo más específico para distinguir entre los diferentes tipos de amiloidosis utilizando antisueros marcados contra los distintos tipos de proteínas: anti-AA, anti-cadenas ligeras, anti-pre albúmina, anti-beta-2-microglobulina, etc. Medina *et al.*, (2015), obtuvieron que este método diagnóstico tiene una sensibilidad del 75% para distinguir el tipo de amiloide.

Además de lo anterior mencionado, se han empleado otros métodos complementarios para el diagnóstico. Algunos de ellos no tan específicos ni sensibles, pudiendo dar falsos positivos. Estos métodos son los siguientes:

- Medición por método enzimático de la creatinina C en orina
- Medición de proteínas totales en orina
- Medición de la proteína sérica A utilizando la técnica ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
- Espectrofotometría de masas con el 88% de sensibilidad y el 96% de especificidad (Medina *et al.*, 2015).
- Resonancia magnética nuclear; que permite estudiar la estructura, las interacciones y la dinámica de las proteínas (Amero, 2014).

2.4.1 UBICACIÓN DEL AMILOIDE EN ALGUNOS TEJIDOS

En el riñón se observan depósitos amiloides principalmente en el glomérulo (mayormente en zona mesangial y paredes capilares), aunque existe evidencia sobre la existencia de amiloidosis renal principalmente en zona medular. La distribución de las lesiones puede ser irregular en el glomérulo y entre glomérulos, pero, en enfermedad avanzada, de larga evolución, suelen estar más homogéneas, la afectación renal puede oscilar entre proteinuria leve y nefrosis (Sen y Sarsik, 2010; Gaffney *et al.*, 2016).

Los túbulos suelen mostrar cambios inespecíficos, aunque en algunos casos hay engrosamiento de las membranas basales por depósitos, más en túbulos distales y asa de Henle. Excepcionalmente los depósitos pueden ser predominantes en túbulos. En algunos casos hay cilindros intratubulares que pueden mostrar las propiedades tintoriales del Rojo Congo. En intersticio suelen detectarse depósitos irregulares, focales, que a veces forman masas en la médula.

Los vasos sanguíneos también pueden tener depósitos de variable intensidad y extensión, pueden comprometer arterias de todos los tamaños y venas; más frecuentemente afectan arciformes y lobulillares. En algunos casos, principalmente en amiloidosis AL, los depósitos arteriales pueden ser predominantes, con escasez

o ausencia de depósitos glomerulares. La insuficiencia renal progresiva con o sin proteinuria debería considerarse siempre dentro del diagnóstico diferencial (Esteve *et al.*, 2006; Sen y Sarsik, 2010).

En el hígado, los depósitos de amiloide pueden observarse entre las columnas de hepatocitos y en la pared sinusoidal del espacio de Disse, aquellos sufren un grado variable de compresión. Las más afectadas son las áreas portales y medio zonales (Gamarra *et al.*, 1999).

En el intestino delgado, los depósitos suelen ubicarse alrededor de los vasos sanguíneos, lámina propia, submucosa y capa muscular, presentando una distribución difusa (Sen y Sarsik, 2010; Jungienger *et al.*, 2015; Woldemeskel, 2012; Boyce *et al.*, 1984).

En los nódulos linfáticos, los depósitos suelen ser escasos y difusos, así como irregulares, afectando la mayor parte del parénquima (Cruz, 2009).

2.5 TRATAMIENTO

Los tratamientos disponibles dependen del tipo de amiloidosis y los órganos que se vean involucrados, además del proceso infeccioso y la edad del individuo (Gertz *et al.*, 2013).

Por lo general se lleva como proceso de dos partes: controlar los síntomas para mejorar la calidad de vida y eliminar la causa del suministro elevado de proteínas para mejorar la función de los órganos (Gertz *et al.*, 2013).

Existen a su vez tres enfoques para interrumpir la formación y el depósito de proteínas. El más común se centra en interferir con los precursores que producen su síntesis; el segundo utiliza farmacoterapia para estabilizar la estructura de las células precursoras y el tercero se basa en atacar los depósitos amiloides.

En la actualidad, se ha descrito el uso de propóleo, vitamina E y curcumina en roedores como tratamiento preventivo del depósito de amiloide, teniendo resultados

positivos, ayudando también a reducir el estrés oxidativo y la deposición de transtirretina (Harata *et al.*, 2018).

Para la amiloidosis AL, el tratamiento se centra en interrumpir el crecimiento de los plasmocitos, por lo que se utiliza el melfalán en combinación con dexametasona y el uso de quimioterapia con trasplante de células madre, aunque no todos los pacientes pueden tolerar este tratamiento intensivo por los efectos secundarios que produce (Gertz *et al.*, 2013).

Para la amiloidosis AA se busca tratar la afección inflamatoria o infecciosa crónica. Actualmente se estudia un fármaco llamado Eprodisato (Kiacta ®) que inhibe la formación de fibras amiloides, ya que evita que el amiloide sérico interactúe y se una a otras moléculas que faciliten el mal plegamiento y el depósito. Se espera se pueda llegar a utilizar al comprobar su eficacia (Gertz *et al.*, 2013).

Amero (2014), encontró que la molécula activa del té verde llamada epigalato reduce la formación de las fibras amiloides *in vitro*, lo cual podría ser un punto de partida para el desarrollo de nuevos fármacos.

A su vez, Gutiérrez *et al.*, (2014), están estudiando biomateriales que tengan la capacidad de favorecer la recuperación tanto funcional como estructural de los tejidos dañados a partir de cóndilos de bovino, de los que se extrae una matriz colagénica que permiten la proliferación de las células dañadas.

En el caso de las enfermedades priónicas, se ha descrito la capacidad del Rojo Congo como un agente capaz de interferir con la finalización de la conversión de las proteínas normales en patógenas (Caspi *et al.*, 1997).

2.6 AMILOIDOSIS EN ANIMALES

La amiloidosis AA es la forma más común en los animales domésticos. Está asociada con procesos inflamatorios crónicos o enfermedades neoplásicas (discrasia no inmunocítica), o puede considerarse idiopática cuando no se

encuentra una enfermedad subyacente. Esta forma de amiloidosis se produce por más de 15 proteínas amiloidogénicas y más de 8 diferentes precursores, aunque el amiloide A sérico es el más común (Ménsua *et al.*, 2003).

Se deriva de una proteína de la fase aguda de la inflamación, que es una apolipoproteína de alta densidad (HDL), clases 2 y 3 (Ménsua *et al.*, 2003).

Se forma principalmente en el hígado mediante la estimulación de las interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6) citoquinas proinflamatorias que actúan como precursor para inducir y estabilizar la conversión de las proteínas monoméricas nativas en las formas patógenas (Ménsua *et al.*, 2003).

Existe evidencia tanto espontánea, natural, experimental y clínica de la transmisión de esta enfermedad, conocidas hasta el momento la vía oral, incluyendo *foie gras*, intravenosa e intraperitoneal en más de 30 mamíferos y en todos los animales vertebrados e invertebrados en los que se ha estudiado (Jakob, 1971; Gewurz *et al.*, 1995; Cui *et al.*, 2002; Puig *et al.*, 2014).

La mayor parte de los reportes han sido en caballos, ganado vacuno y en perros Shrpaei y con menor frecuencia en gatos Abisinios, ovejas, roedores, hámsters, guepardos, aves, monos, cerdos, tigres siberianos, gacela dorca, gacela de montaña, zorro y anátides (Jakob, 1971; Sipe *et al.*, 1976; Lowell *et al.*, 1986; Cui *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2007; Puig *et al.*, 2014; Gaffney, 2016).

Gaffney *et al.*, (2016), estudiaron un grupo de 321 zorros y detectaron distintos factores de riesgo para la existencia de amiloidosis AA, de los cuales los más importantes fueron la edad, el lugar en el que vivieron (libertad o cautiverio) y la presencia de enfermedad renal.3333

Cabe señalar que la evidencia existente no sólo demuestra la transmisión entre animales de la misma especie, sino también inter-especie (Jakob, 1971; Cui *et al.*, 2002; Puig *et al.*, 2014).

Se presenta con anormalidades hematológicas como trombocitopenia, incremento en la hemoglobina, leucocitosis, neutrofilia, linfopenia, hiperglicemia, hipocalcemia, hipoproteinemia, hipoalbuminemia e hipoglobulinemia (Kim *et al.*, 2005).

En la siguiente tabla (Tabla 2) se pueden observar algunas de las especies animales con reporte de amiloidosis hasta el momento.

Tabla 2. Especies animales con reporte de amiloidosis

Especie	Tipo de evidencia	Origen
Gato abisinio	Natural	Genético e infeccioso (pielonefritis)
Bovino	Natural	Infeccioso-inflamatorio (mastitis, endocarditis, artritis, bronconeumonía, abscesos pulmonares, gastroenteritis, colitis, perihepatitis, metritis, pielonefritis, reticulitis traumática, pericarditis, sinusitis purulenta), leucosis y tuberculosis. Deficiencia de adhesión de leucocitos
Caballo	Natural	Neoplasia
Roedores	Natural y experimental	Infeccioso (<i>Mycobacterium butyricum</i>) y metabólico (diabetes mellitus tipo 2.
Cerdo de guinea	Experimental	Infeccioso
Perro	Natural	Infeccioso-inflamatorio (cistitis, nefritis, piometra, osteomielitis, gingivitis, gastroenteritis) y leucosis.
Cheetah	Natural	Infeccioso-inflamatorio (gastroenteritis linfoplasmocítica, pielonefritis) Insuficiencia renal
Pato	Natural	Genético
Ganso	Natural	Infeccioso (hepatitis crónica, pielonefritis)
Gallina	Natural	Infeccioso e Inflamatorio (artropatía)
Borrego y cabra	Natural	Infeccioso-inflamatorio (abscesos, mastitis, metritis, pielonefritis,

		reticulitis traumática, pericarditis, sinusitis purulenta) y tuberculosis.
Mono	Natural	Infeccioso e inflamatorio (osteomielitis purulenta)
Nutria	Natural	Genético
Lobo	Natural	Genético, infeccioso (otodectes)
Zorro	Natural	Genético
Hiena	Natural	Genético
Tigre	Natural	Genético
León	Natural	Genético
Conejo	Experimental	Infeccioso
Gacela	Natural	Genético y ambiental

(Jakob, 1971; Sipe *et al.*, 1976; Boyce *et al.*, 1984; Linke *et al.*, 1986; Seifi *et al.*, 1997; Taniyama *et al.*, 2000; Cui *et al.* 2002; Kim *et al.*, 2005; Tojo *et al.*, 2005; Shrasburg *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Tatalovi, 2008; Yoshida *et al.*, 2009; Murakami *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2014; Maeda *et al.*, 2016; Gaffney, 2016).

2.6.1 AMILOIDOSIS EN BOVINOS

Existen estudios en bovinos que demuestran que las proteínas de la fase aguda se comportan de manera diferente ante estímulos inflamatorios, ya que no se producen en la misma cantidad. Su síntesis se da entre 6 y 8 horas después de la reacción inflamatoria, alcanzando un pico después de 2 a 5 días (Jain, 1989).

En el bovino las proteínas con mayor incremento son el amiloide A sérico y la haptoglobina, al igual que en los equinos (Martínez *et al.*, 2001).

El amiloide A sérico es una apolipoproteína de alta densidad y con gran sensibilidad frente a los cambios inflamatorios. Se han encontrado niveles altos de esta proteína

en leche de animales con mastitis permitiendo determinar la gravedad de la misma con una especificidad del 100% (Martínez *et al.*, 2001).

Algunas de las causas del aumento de amiloide A sérico en bovinos son: infecciones por *Pasteurella haemolytica*, virus respiratorio sincitial bovino, estrés físico, cirugías, mastitis y metritis. (Horadagoda *et al.*, 1994).

La amiloidosis bovina es una enfermedad relativamente rara caracterizada por la presencia de diarrea, edema generalizado, caquexia, nefromegalia, hipoproteinemia y proteinuria. Aunque la mayoría de las ocasiones se presenta como enfermedad subclínica, disminuye de un 10% a un 25% la producción (Bouda *et al.*, 1997; Woldesmekel, 2012).

Algunos datos epidemiológicos muestran una mayor prevalencia en vacas viejas con procesos inflamatorios crónicos ya mencionados anteriormente, y todo proceso que genere un estrés; sin embargo, la etiología no es clara. Sólo puede ser diagnosticada como síndrome nefrótico en etapa terminal (Martínez *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 2014; Jakob, 1971).

La histopatología revela severos depósitos de amiloide principalmente en riñón, pulmón, bazo, nódulos linfáticos, glándulas adrenales e hígado, siendo los principales órganos afectados, aunque existe evidencia de amiloide en tracto gastrointestinal, músculo y con menor incidencia en corazón (Woldesmekel, 2012).

El diagnóstico se lleva a cabo mediante histopatología con tinción Rojo Congo y hematoxilina eosina; así como con el examen *post mortem* y con la medición de la concentración de amiloide A sérico (rango normal de 0.3 a 13.5 µg/ml) y la cantidad de proteína excretada en orina (rango normal de 0 a 1 mg/dl; Bouda *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 2009; Murakami *et al.*, 2012).

En las especies empleadas para consumo humano la amiloidosis es relevante en bovinos y aves ya que su incidencia en los primeros puede alcanzar de un 1.2% a un 5.5% de los animales que llegan al matadero en países como Japón (Tojo *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2009).

Se sabe que la amiloidosis bovina se puede transmitir a distintas especies, si se consumen tejidos con acúmulos, constituye un riesgo para la salud pública (Tojo *et al.*, 2005; Murakami *et al.*, 2014).

2.7 AMILOIDOSIS EN HUMANOS

De la misma manera que en los bovinos, cuando aumenta la concentración de amiloide sérico A, puede desarrollarse la amiloidosis en los humanos. Su concentración plasmática media en personas sanas es de 3 mg/L; pudiendo aumentar a más de 2,000 mg/L durante la respuesta de la fase aguda de la inflamación. Cuando el paciente tiene alguna infección o inflamación por seis meses o más corre mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (Laiko *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 2007; Lachmann *et al.*, 2007).

La acumulación de proteínas puede resultar en desórdenes importantes, algunos degenerativos y asociados al envejecimiento, como es el caso de la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y la polineuropatía amiloidótica familiar (Cruz *et al.*, 2009; Troiteiro *et al.*, 2010).

Los principales signos clínicos son edema generalizado (principalmente en las piernas), disnea, fatiga, adelgazamiento (40% a 70% de los casos), astenia, adinamia, dolor abdominal, orina con espuma (proteinuria marcada), hormigueo en manos y pies. En el 80% a 90% de los pacientes, el riñón es el principal órgano afectado, aunque también el corazón, el hígado y el sistema nervioso periférico, de tal manera que las principales manifestaciones clínicas son síndrome nefrótico,

insuficiencia cardíaca y/o parestesia (Troiteiro *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2009; Gertz *et al.*, 2013).

Por otra parte, no todo paciente con amiloidosis y hepatomegalia tiene amiloidosis hepática (solo en el 70% de los casos), puede ser cardíaca y generar el crecimiento del hígado por la congestión pasiva crónica cuando hay insuficiencia cardíaca (Troiteiro *et al.*, 2010).

En países subdesarrollados existe un claro predominio en el sexo femenino (61% mujeres vs. 39% hombres) y una elevada incidencia de amiloidosis secundaria en relación con amiloidosis primaria (69% AA vs. 24% de AL). El envejecimiento progresivo de la población y el aumento en el número de casos de enfermedades reumatológicas pudiera estar relacionado con estos datos (González *et al.*, 2009).

Afecta a personas de diversas edades y orígenes étnicos, y el riesgo de desarrollarla es mayor en personas mayores de 50 años, que sufran enfermedades inflamatorias crónicas, y tengan antecedentes familiares de amiloidosis, mieloma múltiple o bien enfermedad renal que requiere de diálisis durante varios años (Gertz *et al.*, 2013).

Aunque para la amiloidosis AL existe evidencia de un caso en donde el paciente fue un niño de 9 meses de edad que desarrolló rápidamente la enfermedad y murió a los dos meses de su diagnóstico (Ochoa-Nava *et al.*, 2017).

Es más común en países en desarrollo, donde se presenta el 45% de todas las amiloidosis sistémicas. Cada año aproximadamente 50,000 personas se ven afectadas en todo el mundo, sólo en Estados Unidos se diagnostican alrededor de 3,000 personas, una quinta parte de la incidencia del mieloma múltiple y similar al linfoma de Hodgkin o la leucemia mieloide crónica (Herrera y Picken, 2006; Picken, 2007; Gertz *et al.*, 2013).

Se ha observado una incidencia de amiloidosis por millón de habitantes, de 8.6 casos en Francia, 2.1 en Italia, 4.6 de AL y 12.2 de AA en España (González *et al.*, 2009).

En Japón, la amiloidosis renal supone un 0.5% de los pacientes que inician con tratamiento de diálisis al año (González *et al.*, 2009).

Como ya se había mencionado, por su cuadro clínico, puede confundirse con enfermedades renales, cardiovasculares y pulmonares, por lo que es muy probable que la enfermedad esté subdiagnosticada (Gertz *et al.*, 2013).

Se ha registrado una supervivencia media de 12 a 40 meses con cuadro clínico de fallo renal e insuficiencia cardiaca (Troiteiro *et al.*, 2010; Blancas y Ramírez, 2013). Debido a que las enfermedades crónicas pueden generar amiloidosis en humanos, se muestra la siguiente tabla (Tabla 3) con algunos datos epidemiológicos más importantes, para hacer énfasis en la situación actual a nivel mundial.

Tabla 3. Principales enfermedades crónicas en humanos asociadas a la edad y a la presencia de cuerpos amiloides.

Enfermedad	Millones de personas	Prevalencia	Población susceptible
Alzheimer	18 a 22	8%	> de 65 años
		30%	> de 80 años
Parkinson	10	3%	Más hombres que mujeres
Esclerosis lateral amiotrófica	15	0.005%	Personas entre los 50 y 60 años de edad.
Polineuropatía amiloidótica familiar	15	0.005%	Personas de entre 25 y 35 años de edad.
Diabetes mellitus tipo ii	422	8.5%	Personas con sobrepeso sin actividad física.
Tuberculosis	10.4	10.4%	Adultos y consumo de tabaco
Artritis reumatoide	46	1.2%	Entre 45 y 60 años de edad

(Rodríguez y Hernández, 2002; Pérez *et al.*, 2007; González *et al.*, 2009; Maeda *et al.*, 2016; Organización Mundial de la Salud, 2017; Ministerio de sanidad, consumo y bienestar social, 2018).



CAPITULO III

DISEÑO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

3.0 HIPÓTESIS

En los bovinos sacrificados en el rastro municipal de San Francisco de los Romo existe presencia de amiloidosis sistémica reactiva.

3.1 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Detectar presencia de amiloidosis reactiva secundaria en bovinos sacrificados en el rastro Municipal de Aguascalientes, a través de cortes histológicos de hígado, nódulo mesentérico, riñones e intestino delgado, teñidos con Rojo Congo, hematoxilina-eosina y tinción tricrómica de Masson.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Detectar hallazgos morfológicos macroscópicos sugestivos de amiloidosis.
2. Identificar hallazgos microscópicos a través de la tinción hematoxilina-eosina empleando microscopio óptico.
3. Detectar la presencia de amiloidosis sistémica reactiva a través de la tinción Rojo Congo empleando microscopio de luz polarizada.
4. Describir los depósitos de amiloide en relación con su localización y de manera cualitativa.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
5. Confirmar los hallazgos sugestivos de amiloidosis AA al someter las tinciones de Rojo Congo con solución de permanganato de potasio al 5%.
 6. Asociar la presencia de signos clínicos y/o de hallazgos macroscópicos sugestivos de amiloidosis con el hallazgo confirmado en el estudio histopatológico a través de la tinción Rojo Congo.
 7. Asociar la presencia de proteinuria con amiloidosis renal



CAPITULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 LUGAR DE ESTUDIO

El presente estudio se llevó a cabo en la Posta Zootécnica de la Universidad Autónoma del estado de Aguascalientes ubicada en el municipio de Jesús María, cuyas coordenadas son 21°48´ y 22°04´ de latitud norte, los meridianos 102°15´ y 102°36´ de longitud oeste, con una altitud de entre 1900 y 2600 msnm, la temperatura media anual es de 17° centígrados. La época de lluvias marca una precipitación media anual de 531 milímetros, y los vientos dominantes van con dirección suroeste-noroeste en la época de verano, mientras que en el otoño los vientos son de noreste a sureste. Cabe señalar que este tipo de clima significa que el municipio generalmente es caluroso mientras que en invierno tiende a ser frío y debido a esto, las lluvias se presentan en dos periodos al año.

La toma de muestras se realizó en el rastro Municipal de Aguascalientes, ubicado en la calle Benito Juárez #21 en el municipio de San Francisco de los Romo. (<http://www.municipios.mx/aguascalientes/jesus-maria/>).

4.2 TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Para detectar la presencia de dicha enfermedad se obtuvo un tamaño de muestra utilizando el programa estadístico Win Epi (Working in Epidemiology), empleando un nivel de confianza del 99%, un tamaño poblacional de 14,400 animales (información proporcionada por el Médico Veterinario a cargo) y una prevalencia mínima del 5% (Figura. No. 1).

Nivel de confianza % :

Tamaño de población :

Prevalencia mínima esperada (%) :

Nota: Utilice el punto (.) como separador decimal

[← Volver](#) [Seguir →](#)

FIGURA No. 1. Ingreso de los datos para la calcular el tamaño de la muestra por medio del programa Win Epi (Working in Epidemiology).

Con los datos anteriores se obtuvo un tamaño de muestra de 90 animales como mínimo, por lo que se procedió a tomar muestras de un total de 101 bovinos (Figura No. 2).

Nº de infectados a detectar : 720

Tamaño de muestra necesario : 90

Fracción de muestreo : 0.63%

[← Volver](#)

FIGURA No. 2. Resultado obtenido del tamaño de muestra mínimo para detectar enfermedad.

4.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Se muestrearon animales sanos y enfermos en proporción 1:1, en la medida de lo posible, debido a que el sacrificio de animales sanos y/o enfermos varía día a día y en distintas épocas del año (Cuaresma y época de Feria de San Marcos), el muestreo que se utilizó fue no estadístico, por conveniencia.

Los tejidos obtenidos fueron: riñón, nódulo mesentérico, hígado e intestino delgado de bovino. Los animales fueron sacrificados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995.

Las muestras obtenidas tenían un tamaño no mayor de 3 a 4 cm³, dichos tejidos fueron colocados en recipientes de plástico debidamente identificados, conservados en formalina buferada (100 ml de formaldehído al 37%, 900 ml de agua destilada, 4.0 g/L de NaH₂PO₄, 6.5 g/L de Na₂HPO₄) en proporción 10:1 y transportados al laboratorio de Patología diagnóstica de la Posta Zootécnica en una hielera a temperatura ambiente.

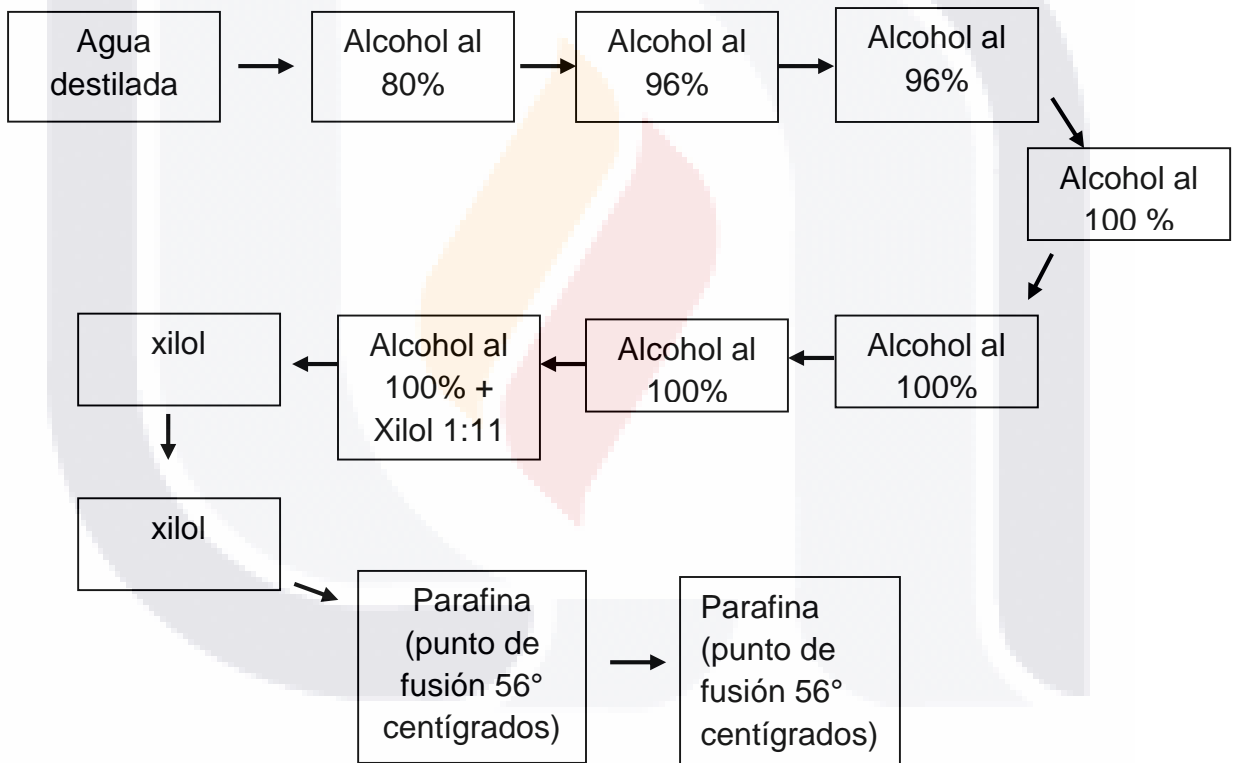
Al momento de la obtención de muestras se realizó a su vez una exploración *postmortem* para registrar los hallazgos macroscópicos; éstos fueron registrados en una encuesta epidemiológica (Anexo A).

Además de las muestras de tejido, se obtuvieron muestras de orina de cada bovino directamente de la vejiga (no todos los animales contaban con orina al momento de su faenado), se colocaron en recipientes de plástico debidamente identificadas. A dichas muestras se le midió la cantidad de proteínas totales a los 5 minutos de su recolección utilizando tiras reactivas de la marca DFI Cybow, multiespecie, Eurovet. Las lecturas de las tiras reactivas fueron registradas en la encuesta epidemiológica mencionada anteriormente.

4.4 ANÁLISIS MORFOLÓGICO

4.4.1 TÉCNICA HISTOLÓGICA PARA MICROSCOPIA ÓPTICA.

Las muestras fijadas en formalina buferada fueron lavadas en agua destilada, deshidratada en diferentes concentraciones de alcohol (80%, 96% y 100%), aclaradas en xilol e infiltradas en parafina líquida en un procesador automático de tejidos (Histoquinet, Leica TP 1020). El histoquinet cuenta con 12 soluciones en las que las muestras permanecieron 1 hora en cada una de ellas.



Terminado el proceso anteriormente mencionado, se realizaron los bloques de parafina con la muestra incluida en ellos, utilizando un centro de embebido de parafina (Leica EG 1150 H) y una placa fría a 33° centígrados (Leica EG 1150 C). Con los bloques de parafina ya endurecidos se realizaron cortes histológicos de 3

µm de grosor usando un microtomo (Leica RM 2125 RT); posterior a este paso fueron extendidos en un baño de flotación (agua caliente a 49° centígrados), tomados en un portaobjetos y se dejaron secar durante 24 horas a temperatura ambiente, la técnica anterior se describe a mayor profundidad en el Anexo B.

4.4.2 TÉCNICA PARA TINCIÓN CON HEMATOXILINA- EOSINA.

Es uno de los principales métodos de tinción en histología. Está basada en dos etapas, la primera una tinción con un colorante básico (hematoxilina) y la segunda, una tinción citoplasmática por un colorante xantenico ácido (eosina).

Las características de los compuestos que la componen hacen posible observar al microscopio óptico las células individualizadas y sus núcleos, que se tiñen de forma diferenciada (Anexo C, Prophet *et al.*, 1994).

4.4.3 TÉCNICA PARA TINCIÓN CON ROJO CONGO.

Esta tinción cuenta con dos teorías aceptadas explicadas a continuación: La molécula de Rojo Congo, dado a su tamaño de 21 amstrong, tiene un tamaño similar al de la proteína amiloide, el cual es de 19 amstrong, el componente glúcido (asociado a la sustancia P), por lo tanto, ambas estructuras se unirán a través de puentes de hidrógeno, entre los grupos carboxilos (COOH) de la proteína amiloide y el grupo Amino (NH₂) que se encuentra en el colorante. La segunda teoría estudiada, nos dice que la molécula de Rojo Congo se intercala entre proteínas adyacentes, las cuales normalmente estarían unidas por puentes de hidrógeno. La molécula decolorante interrumpiría estas uniones, creando nuevas uniones de puente de hidrógeno entre el colorante y la proteína, estabilizándose de esta forma. La distancia aparente entre proteínas adyacentes sería de 4,8 amstrong (Anexo D).

4.4.4 TÉCNICA PARA TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON

La tinción tricrómica de Masson permite visualizar claramente las fibras de colágeno tipo I que son diseñadas para dar resistencia. Emplea tres colorantes: la hematoxilina, la fucsina y el azul de anilina. Se emplea mucho en la diagnosis de procesos tumorales. Hay muchas variantes de esta tinción adaptadas a las necesidades particulares de cada laboratorio (Anexo E, Prophet *et al.*, 1994).

Después de la elaboración de las laminillas de cada uno de los tejidos y de haber sido teñidas con su respectiva técnica, se procedió a su revisión utilizando microscopio óptico (Leica DM LS2) y microscopio de luz polarizada para identificar lesiones microscópicas relacionadas a la presencia de amiloidosis.

Se tomaron fotografías de las lesiones a través de un procesador de imágenes (Leica DFC 320); todas las fotografías fueron obtenidas utilizando el objetivo 10x.

4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.5.1 VARIABLES

Las variables empleadas para la realización de este estudio son las siguientes:

- Reseña de los animales (raza, sexo, edad, identificación, procedencia)
- Presencia de signos clínicos en la inspección *antemortem*: caquexia, edema, diarrea, etc.
- Presencia de lesiones macroscópicas asociadas a la amiloidosis: hepatomegalia, esplenomegalia, nefromegalia, palidez de los órganos, edema.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Presencia de lesiones macroscópicas características de procesos crónicos: degeneración serosa de la grasa pericárdica, visibilidad de los vasos linfáticos cardiacos, lesiones granulomatosas, etc.
 - Presencia de proteinuria.
 - Presencia de sustancia eosinofílica, hialina y amorfa compatible con amiloide en la tinción de hematoxilina y eosina.
 - Presencia de material compatible con amiloide después de su tinción con Rojo Congo.
 - Presencia de birrefringencia verde en tejidos teñidos con Rojo Congo al observarse con microscopio de luz polarizada.
 - Pérdida de la congofilia para amiloidosis AA después de someter los tejidos teñidos con Rojo Congo al permanganato de potasio al 5%.

4.5.2 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS TOTALES

Se empleó un kit para la determinación de proteínas totales en orina por método colorimétrico del laboratorio Wiener lab. Se utilizó espectrofotómetro de la marca Caray 100 Bio con una longitud de onda de 540 nm y se siguieron las indicaciones de uso del kit (Anexo F)

4.5.2.1 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Empleando el suero patrón tal como se indica en el procedimiento, los cálculos se realizaron empleando las siguientes formulas.

Proteínas totales (g/ dl) = D x f

f= $\frac{\text{P.T. (g/dl)} *}{s}$

s

Donde:

D= valor obtenido por el espectrofotómetro

S= concentración de proteínas en g/ dl en 20 μ l de suero patrón.

Para constatar que el fotocolorímetro tenga una respuesta lineal en la longitud de onda fijada para la reacción, se realizó una curva de calibración con cantidades crecientes de suero patrón (ej.: 20 y 40 μ l) con un volumen de reactivo A de 2,0 ml en todos los casos.

4.5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizaron los resultados de las variables obtenidas durante la encuesta epidemiológica y de los resultados de la cantidad de animales positivos a amiloidosis para asociar la presencia ambos.

La asociación entre ambos se realizó por medio de la prueba exacta de Fisher, empleando el programa estadístico Minitab (Minitab18.1.0.0setu). Se aceptó la asociación entre variables si $p < 0.1$.

Los resultados obtenidos se presentan más adelante.

CAPITULO V

RESULTADOS

5.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS.

5.1.1 DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE HALLAZGOS MORFOLÓGICOS MACROSCÓPICOS SUGESTIVOS DE AMILOIDOSIS.

Durante la toma de muestras de los bovinos, se realizó exploración *antemortem* (cuando fue posible) y *postmortem* para registrar lesiones macroscópicas.

En el siguiente gráfico se presentan los principales hallazgos encontrados en los animales, separados de acuerdo con el resultado de la tinción con Rojo Congo.

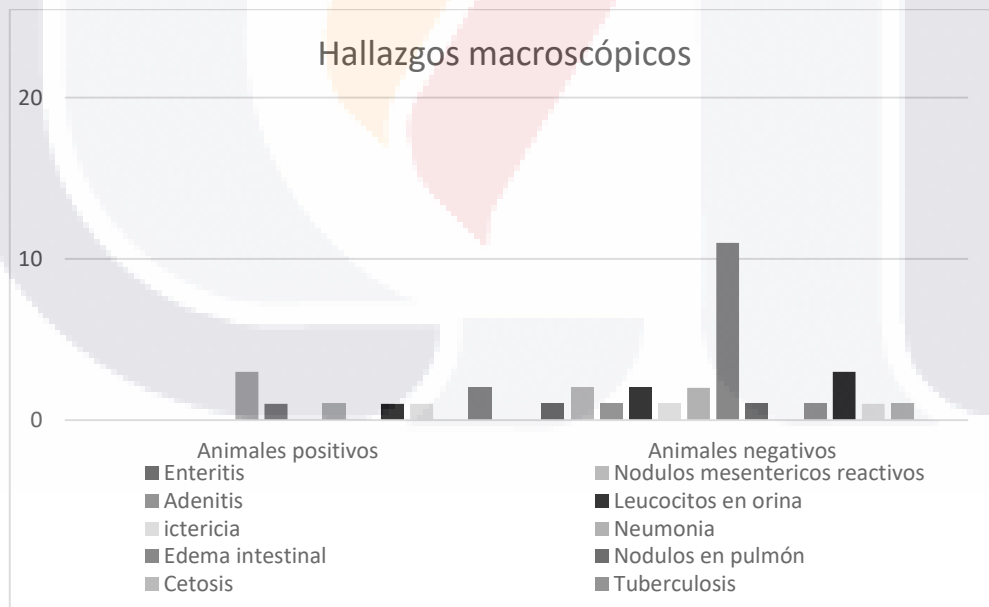


FIGURA No. 3. Lesiones observadas en los bovinos muestreados con y sin hallazgos sugestivos de amiloidosis.

Como se puede observar, el mayor porcentaje de lesiones se encontró en el grupo de animales negativos a amiloide.

Las lesiones que se presentaron con mayor frecuencia en los animales positivos fueron neumonía, linfadenomegalia, edema visceral y degeneración serosa de la grasa. Todos estos hallazgos son frecuentes en los bovinos. La neumonía y la linfadenomegalia son lesiones de carácter inflamatorio y la degeneración serosa de la grasa corresponde con atrofia y edema de los adipocitos, proceso que ocurre durante condiciones crónicas y consuntivas.



5.1.2 IDENTIFICACIÓN DE LESIONES MICROSCÓPICAS A TRAVÉS DE LA TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA.

Después de la revisión al microscopio de las laminillas elaboradas, se obtuvieron los siguientes resultados.

En los animales con hallazgos sugestivos de amiloide, se pudieron observar en los riñones, edema en zona medular (Figura No. 4), fibrosis extra tubular y presencia de focos de infiltración linfocitaria como principales lesiones.

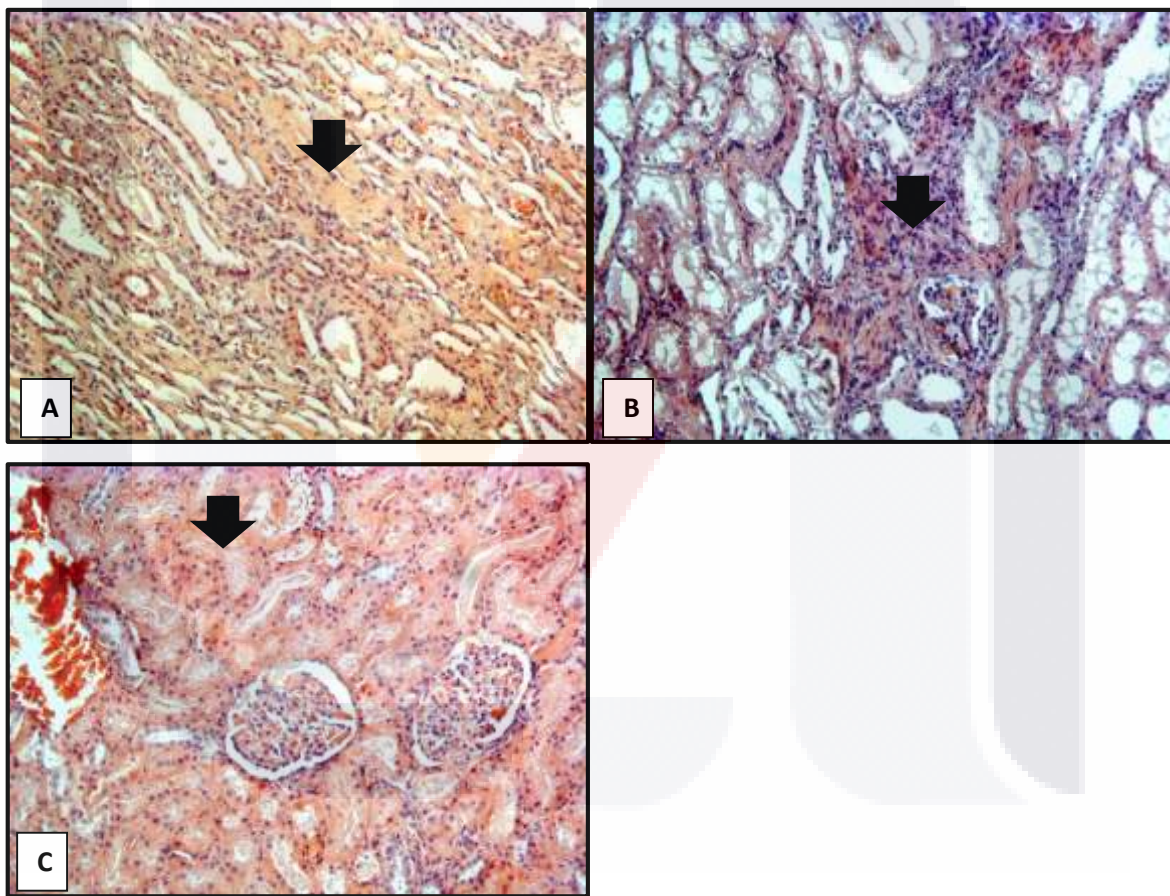


FIGURA No. 4. Apariencia microscópica de lesiones en riñón de animales positivos a amiloide. A) Zona medular con presencia de material eosinofílico sugestivo de edema con pérdida de la estructura celular. B) Corteza del riñón con material fibroso y células inflamatorias en zona extra tubular. C) Foco de infiltración linfocitaria con acúmulo de fibrina. Tinción HE, 10x.

En el hígado, los hallazgos comunes en animales con amiloidosis fueron la degeneración grasa (Figura No. 5) y necrosis.

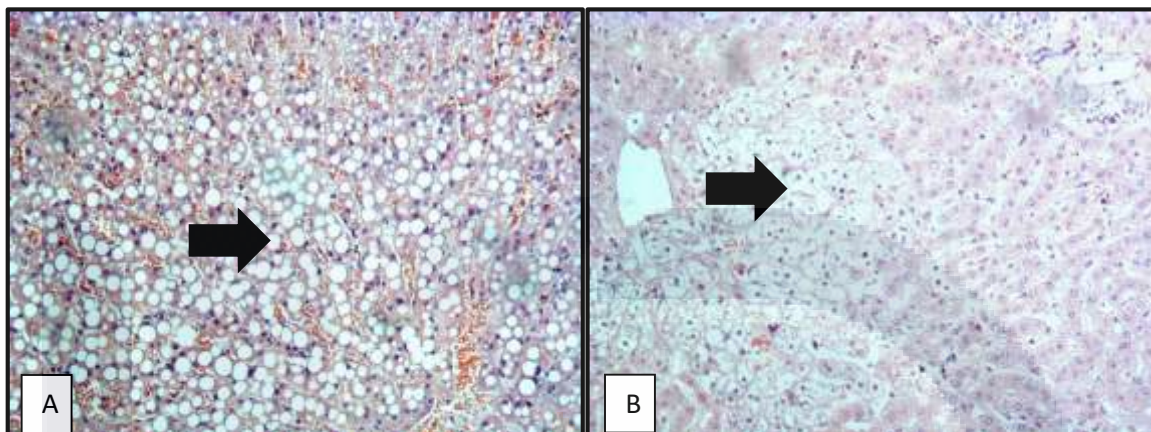


FIGURA No. 5. Lesiones hepáticas encontradas en los animales positivos para amiloide. A) Degeneración grasa macro vesicular con pérdida de la estructura característica del hígado. B) Esteatosis y necrosis hepática con daño en la estructura celular. Tinción HE, 10x.

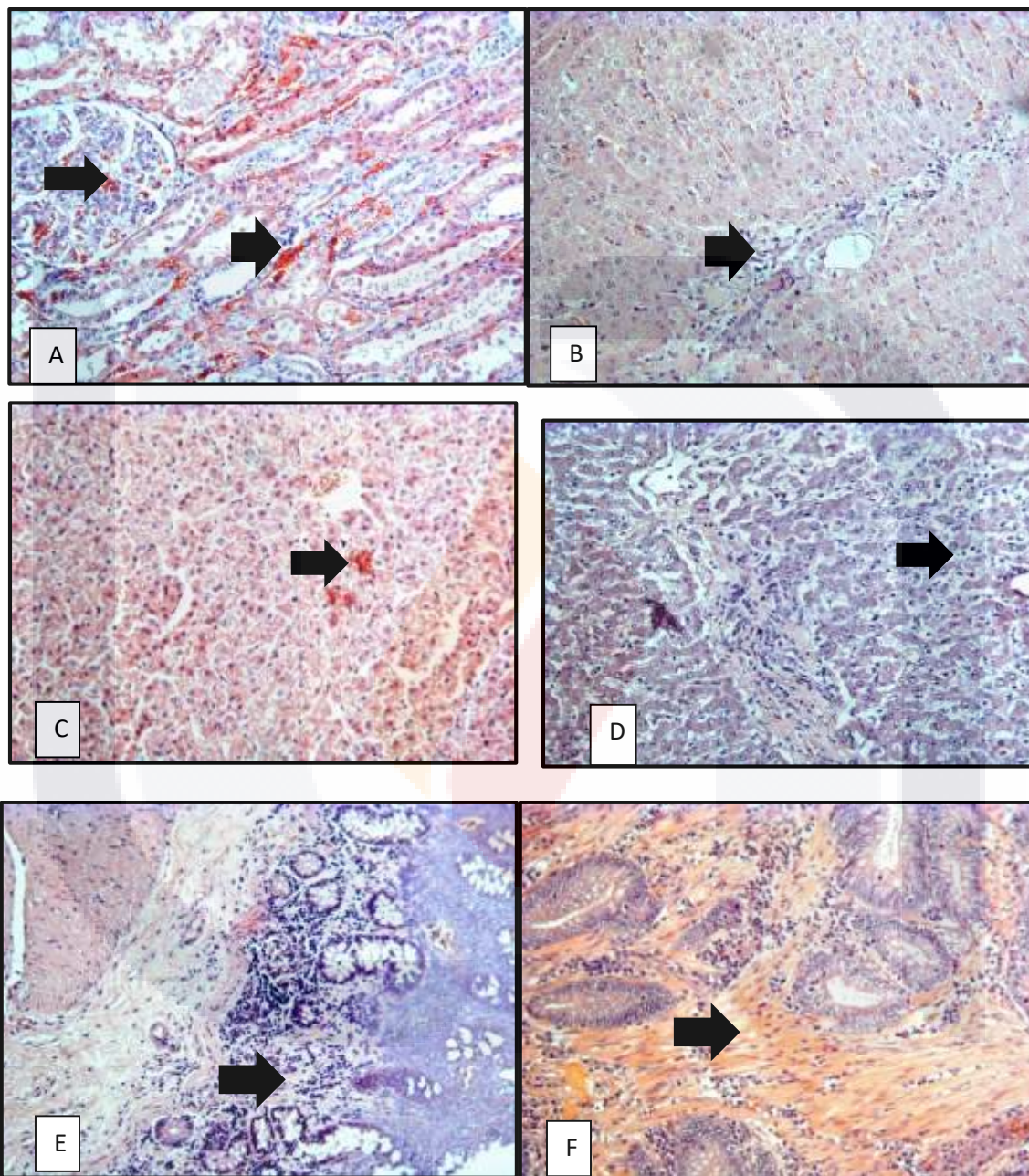
En ningún animal se observaron acúmulos compatibles con amiloide en nódulos mesentéricos y tampoco lesiones microscópicas. En intestino, solamente en dos, pero sin la presencia de otros hallazgos.

En los animales sin hallazgos sugestivos de amiloidosis, también se encontraron lesiones de carácter inflamatorio. A continuación, se muestran las más comunes, así como sus respectivas fotografías.

En el riñón se identificaron lesiones y/o cambios como lo fueron la presencia de hemorragias intra glomerulares y extra tubulares (Figura No. 6A). En el hígado zonas con acúmulo de fibrosis (Figura No. 6B), hemorragias intersticiales (Figura No. 6C) y presencia de células inflamatorias (Figura No. 6D)

En el intestino se observó la presencia de infiltrado inflamatorio (Figura No. 6), fibrosis y hemorragia en zona de la submucosa; y para el caso del nódulo mesentérico se logró identificar calcificación, compatible con el infiltrado de

mononucleares, hemorragias en distintas zonas del parénquima, así como degeneración serosa acompañada de zonas necróticas con acúmulo de fibrina.



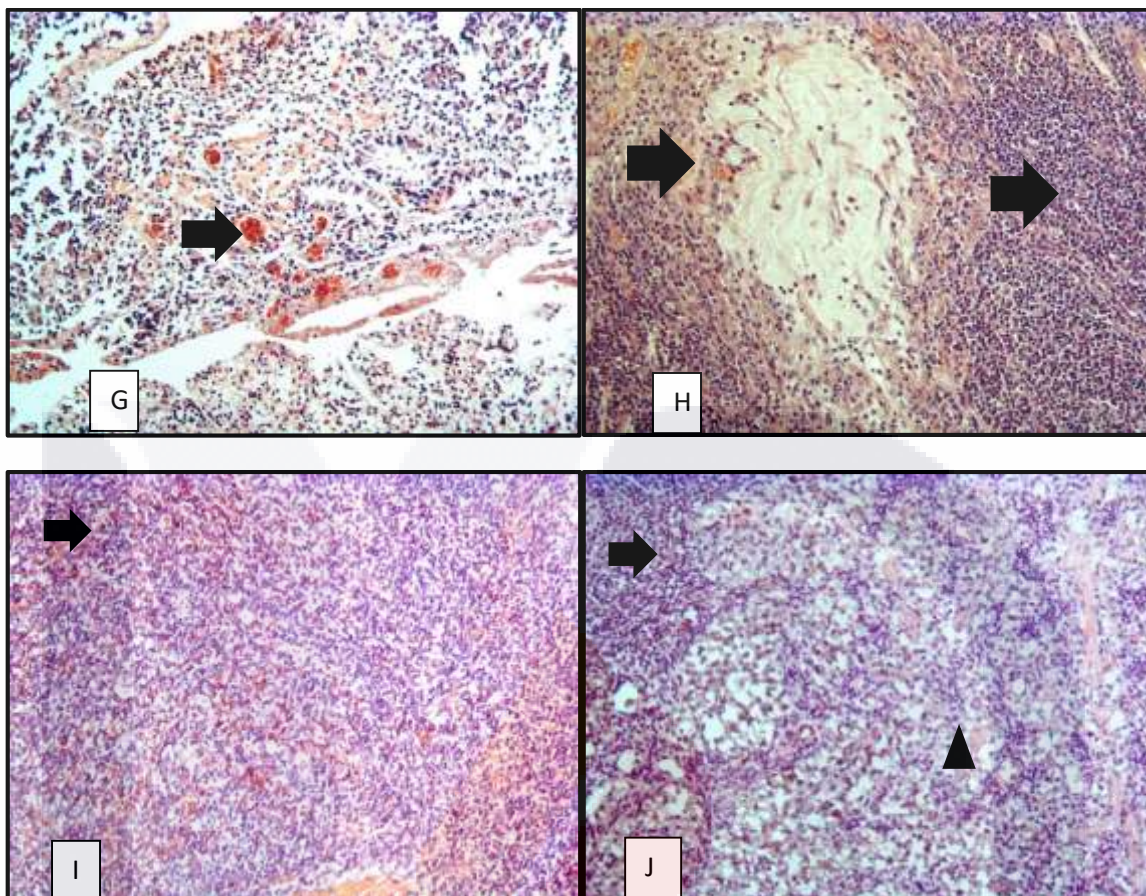


FIGURA No. 6. Alteraciones microscópicas encontradas en riñón, hígado, intestino y nódulo de animales que resultaron ser negativos a la presencia de amiloide. A) Riñón con presencia de hemorragias (eritrocitos) en zona glomerular y extra tubular. B) Infiltrado característico con apariencia de fibrosis y células inflamatorias en hígado. C) Hemorragias intersticiales entre columnas de hepatocitos. D) Focos de infiltración linfocitaria. E) Infiltrado inflamatorio en intestino en zona de la submucosa intestinal. F) Focos de infiltración de fibrina con presencia de células inflamatorias. G) Hemorragia capilar en zona de la submucosa intestinal. H) Calcificación con infiltrado de mononucleares, pérdida de la estructura celular. I) Hemorragias en parénquima nodular. J) Degeneración serosa micro vesicular con presencia de infiltrado infamatorio (flecha), zonas con acumulo de fibrina (triángulo) y perdida de la estructura celular. Tinción HE, 10x.

5.1.3 DETECCIÓN DE AMILOIDOSIS SISTÉMICA REACTIVA A TRAVÉS DE LA TINCIÓN ROJO CONGO Y MICROSCOPIO DE LUZ POLARIZADA.

Se realizó una primera revisión, resultaron presuntivamente positivos a la presencia de amiloide 86 de los 101 animales muestreados debido a que se observó birrefringencia.

Cabe mencionar que, de estos 86 animales positivos, 22 tenían presencia de amiloide en los 4 tejidos muestreados, 24 solo en tres tejidos, 24 animales con 2 tejidos y 16 animales con solo 1 tejido positivo.

A continuación, se muestran algunas de las imágenes obtenidas durante dicha revisión, empleando filtros de luz polarizada.

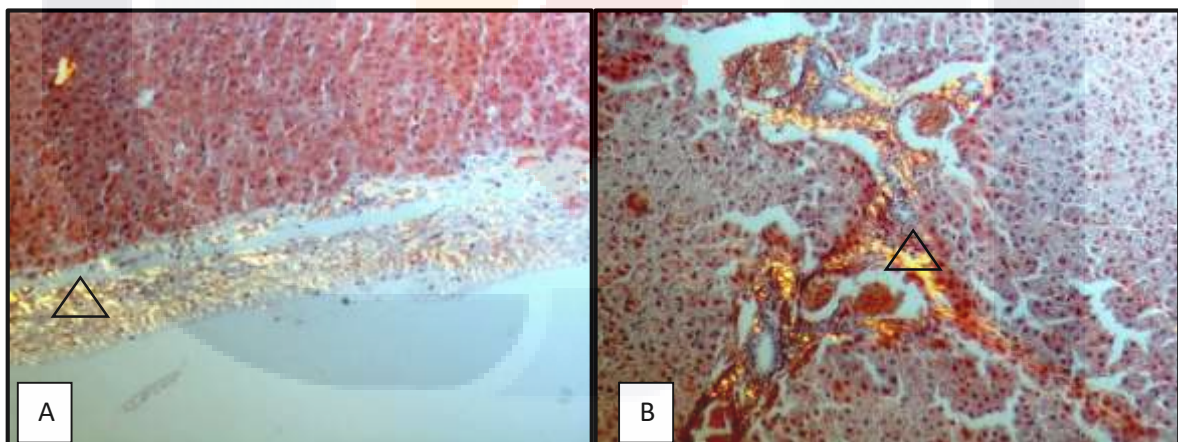


FIGURA No. 7. Material compatible con amiloide en hígado (positivo a birrefringencia verde). A) Amiloidosis hepática en Cápsula de Glisson, B) Amiloidosis perivascular. Tinción Rojo Congo, 10x.

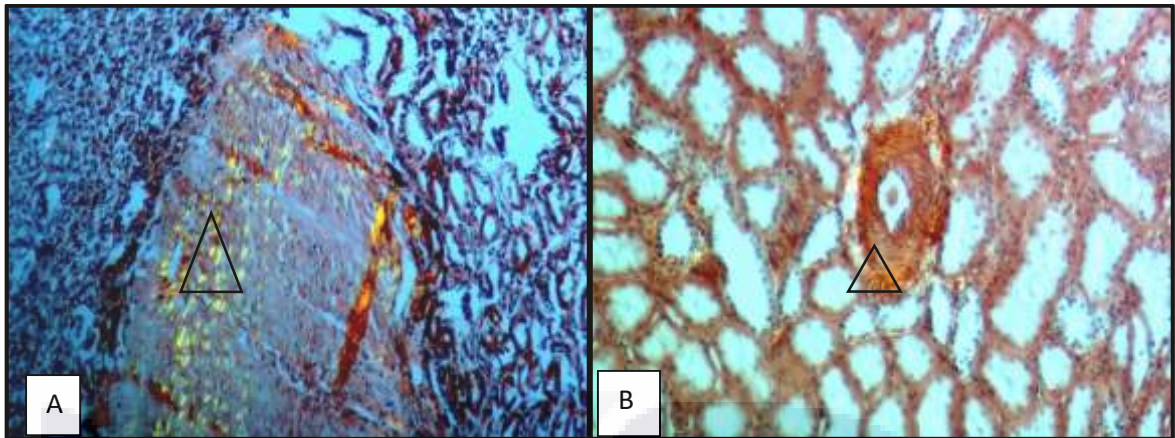


FIGURA No. 8. Material sugestivo de amiloide en riñón. A) Amiloidosis en zona de arterias y venas arcuatas. B) Amiloidosis perivascular en corteza renal. Tinción Rojo Congo, 10x.

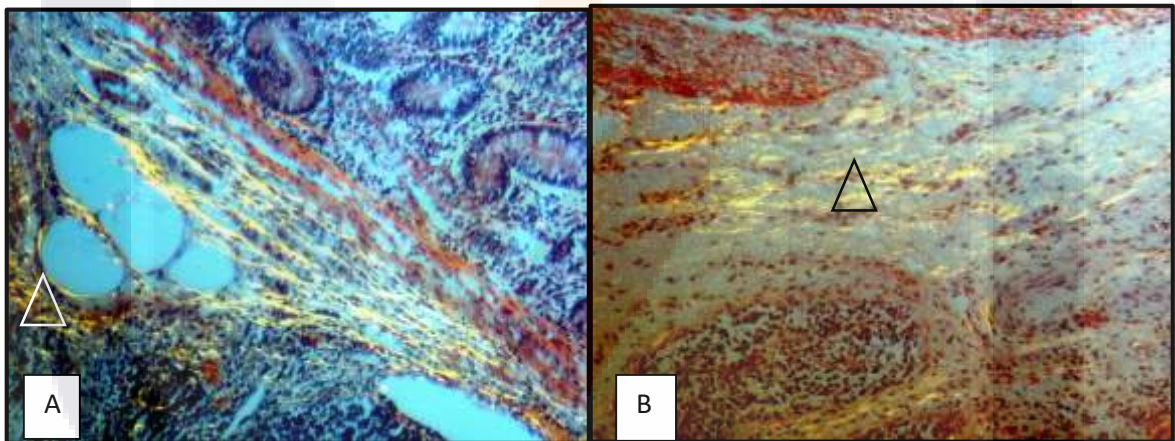


FIGURA No. 9. Presencia de material compatible con amiloide en intestino delgado. A y B) Amiloidosis en submucosa intestinal. Tinción Rojo Congo, 10x.

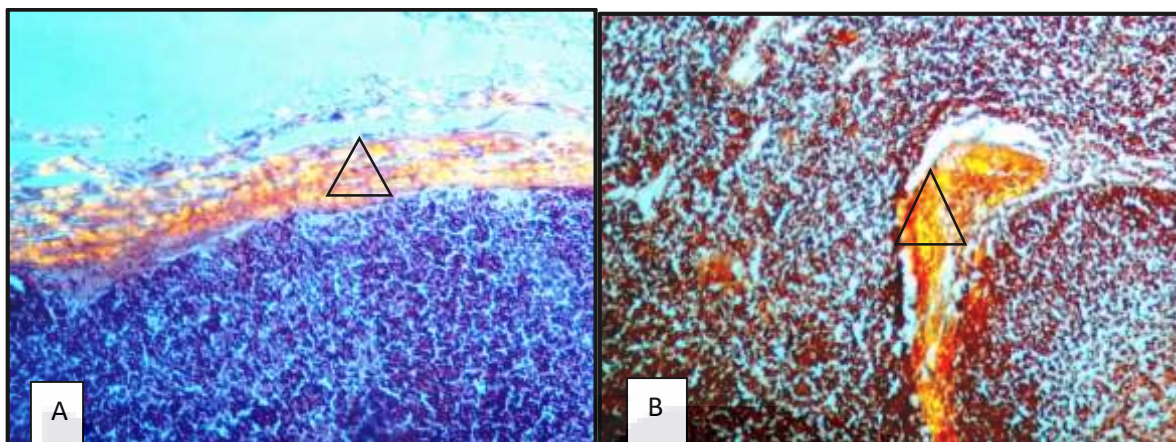


FIGURA No. 10. Material compatible con amiloidosis nodular. A) Amiloidosis en cápsula. B) Amiloidosis en seno trabecular. Tinción Rojo Congo, 10x.

Para confirmar el hallazgo obtenido de la gran cantidad de animales que resultaron ser positivos, se empleó la tinción tricrómica de Masson (sugerencia hecha por el Dr. Tomoaki Murakami), pues se conoce que el colágeno al igual que el amiloide puede presentar birrefringencia verde al ser teñido con tinción Rojo Congo, cuando ésta no tiene la alcalinidad adecuada (Klatskin, 1969; Murakami y López Mayagoitia, 2019), razón por la cual se procesaron laminillas de 18 animales positivos.

Después de realizarla se observaron utilizando microscopio óptico (Leica DM LS2), empleando el mismo procesador de imágenes antes mencionado. Se hizo la comparación de las muestras positivas teñidas con ambas técnicas y se observó que varias de las muestras que se consideraban positivas realmente eran negativas, pues no presentaban el mismo patrón de distribución. Efectivamente la mayor parte del material que produjo la birrefringencia constituía parte del tejido conectivo, específicamente fibras colágenas.

Después de discriminar, se terminó con un total de 13 animales positivos de los 86 que se consideraron en un inicio.

En la siguiente tabla, se resumen los resultados, considerando las variables registradas con la encuesta epidemiológica (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de animales positivos y negativos a amiloidosis, de acuerdo a las variables registradas en la encuesta epidemiológica.

Variable		Positivos a amiloide	Negativos a amiloide
Estado del animal	Sana	5	49
	Muerta /Enferma	8	39
Sexo	Hembra	9	52
	Macho	4	36
Edad	Adulto (a)	12	78
	Becerro (a)	1	10
Fin zootécnico	Leche	3	17
	Otros	8	62
Condición corporal	<2.5	4	20
	>2.5	7	51

Cabe señalar que no se presenta la información completa de todos los animales muestreados, puesto que las condiciones bajo las que se realizó el trabajo de campo no siempre permitieron obtenerla.

A continuación, se muestran algunas de las fotografías obtenidas durante la revisión al microscopio óptico, todas las imágenes capturadas se tomaron utilizando el procesador anteriormente mencionado. Se presenta la comparación de algunas de las muestras consideradas positivas y que posteriormente fueron recategorizadas como negativas después de la tinción tricrómica de Masson.

En el caso del hígado, cuando se observó birrefringencia en la cápsula de Glisson (Figura No. 11A) y de forma perivascular (Figura No. 11C), se consideró que la muestra era positiva. La distribución en estas zonas abarcaba completamente la cápsula y toda la zona perivascular del tejido con una distribución difusa; Sin

embargo, después de realizar la tricrómica, se observó la tinción azul que corresponde a la presencia de colágeno (Figura No. 11B y C).

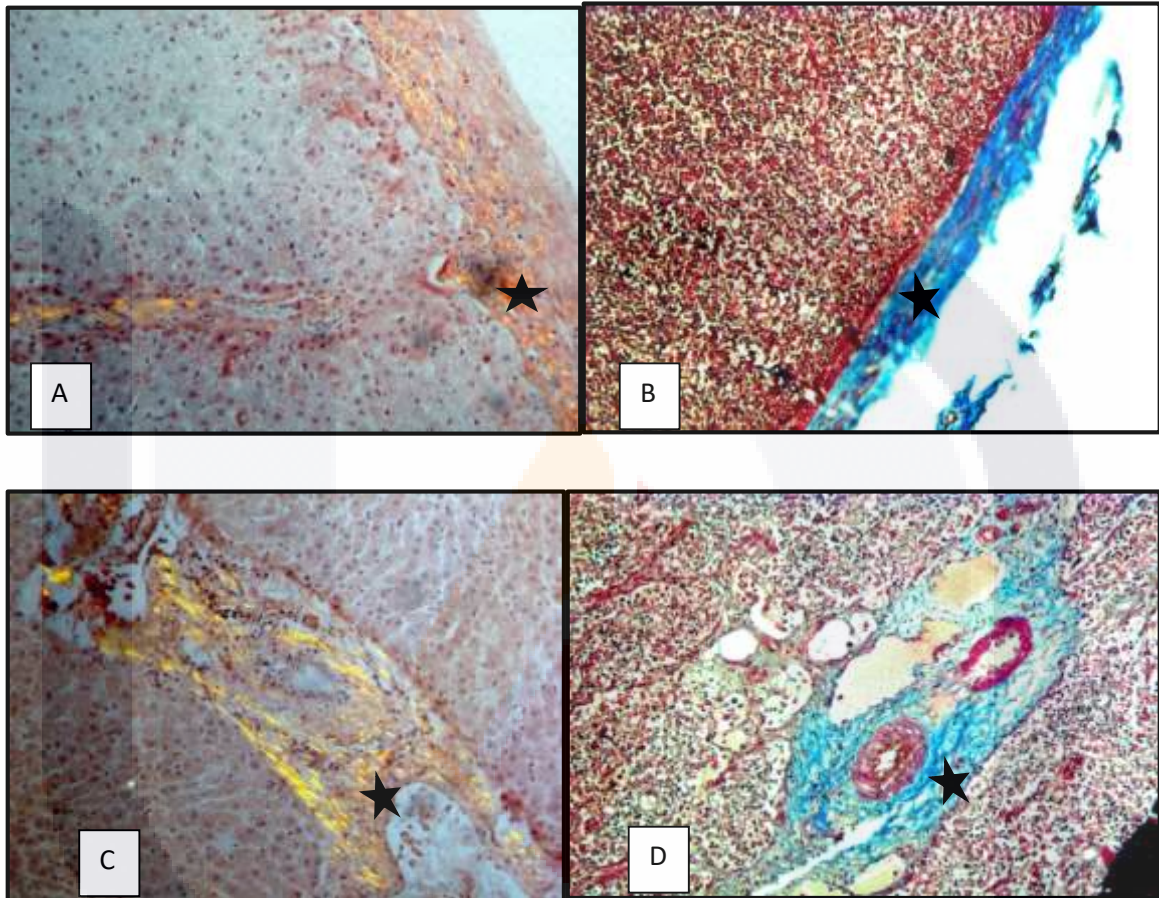
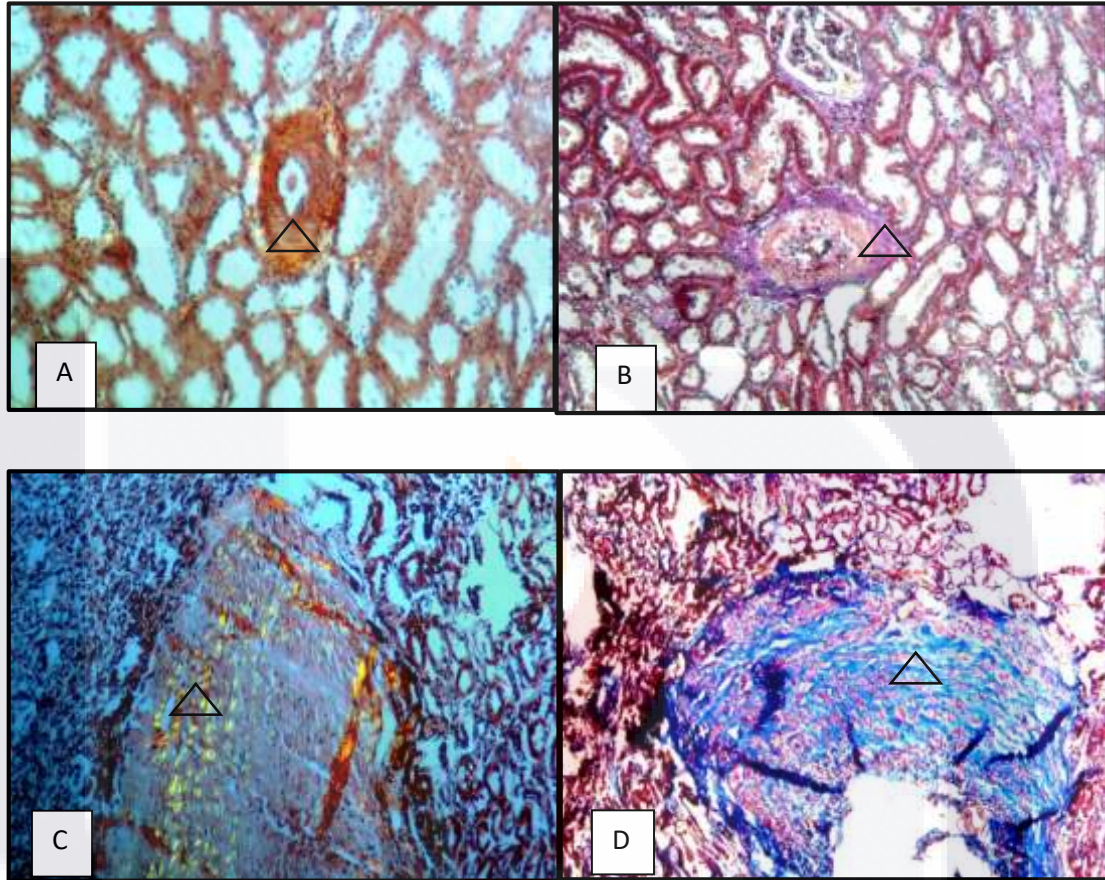


FIGURA No. 11. Presencia de material compatible con amiloide en hígado. A) Cápsula de Glisson con zonas positivas a birrefringencia verde, tinción Rojo Congo. B) Cápsula de Glisson con presencia de colágeno, tinción tricrómica de Masson. C) Material presuntivo de amiloide en zona perivascular, tinción Rojo Congo. D) Zona perivascular con presencia de colágeno. Tinción tricrómica de Masson. 10x

En el caso del riñón se consideraron positivas aquellas muestras con localización de birrefringencia en zonas perivasculares (Figura No. 12) y en arterias y venas

arcuatas específicamente, después de realizar la tricrómica de Masson, se descartó la presencia de amiloide.



FIRGURA No.12. Material presuntivo de amiloidosis renal. A) Amiloidosis perivascular en corteza renal, tinción Rojo Congo. B) Colágeno presente en zona perivascular de la corteza renal, tinción tricrómica de Masson. C) Zona de arteria y venas arcuatas con material presuntivo de amiloide (birrefringencia verde), tinción Rojo Congo. D) Arterias y venas arcuatas con presencia de fibras de colágena. Tinción tricrómica de Masson. 10x

Para las muestras de intestino, se calificaron como positivas aquellas con presencia de birrefringencia verde en la capa submucosa (Figura No.13).

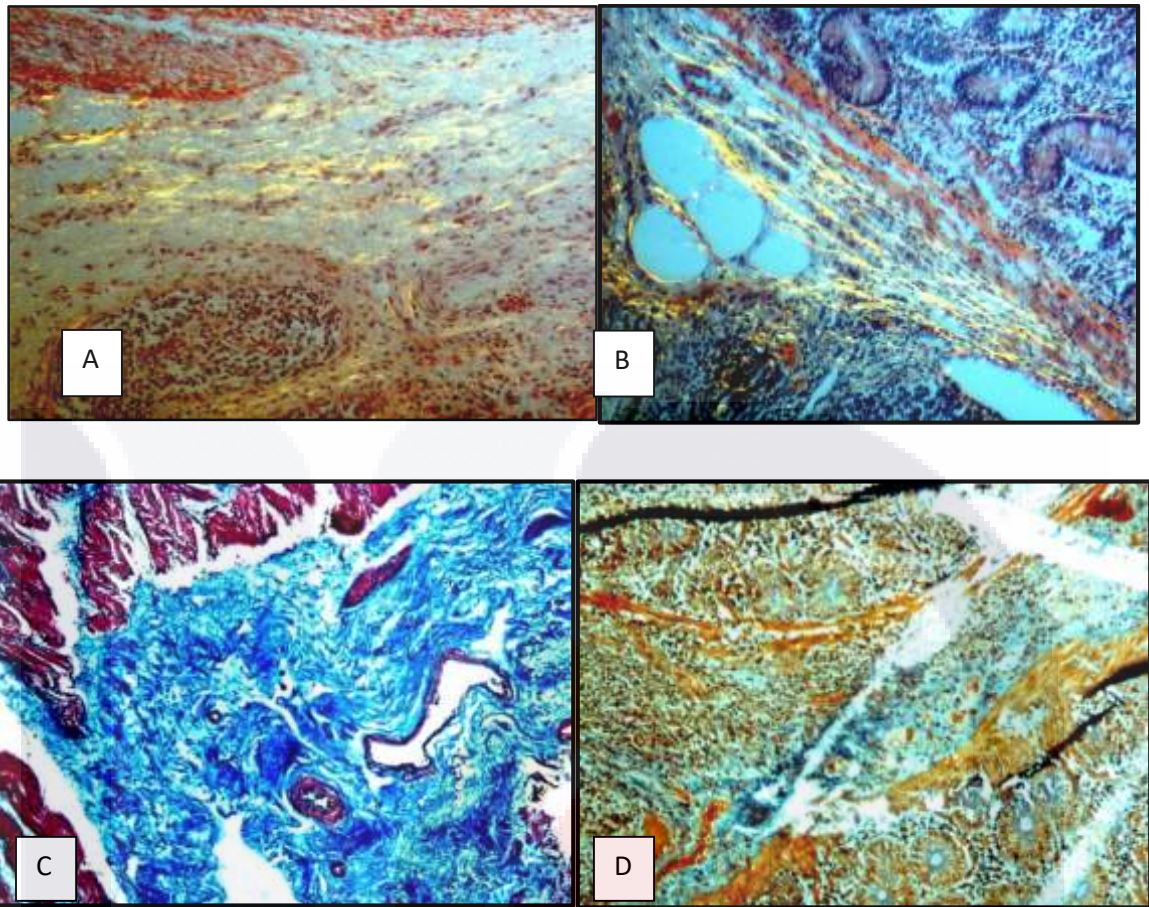


FIGURA No. 13. Muestras histológicas de intestino delgado. A y B) Amiloidosis en con distribución difusa en zona de la capa submucosa, tinción Rojo Congo. C y D) Presencia de colágena en zona submucosa y perivascular. Tinción tricrómica de Masson. 10x.

En el caso del nódulo mesentérico se observó existencia de material presuntivo de amiloide en la cápsula y trabécula (Figura No. 14).

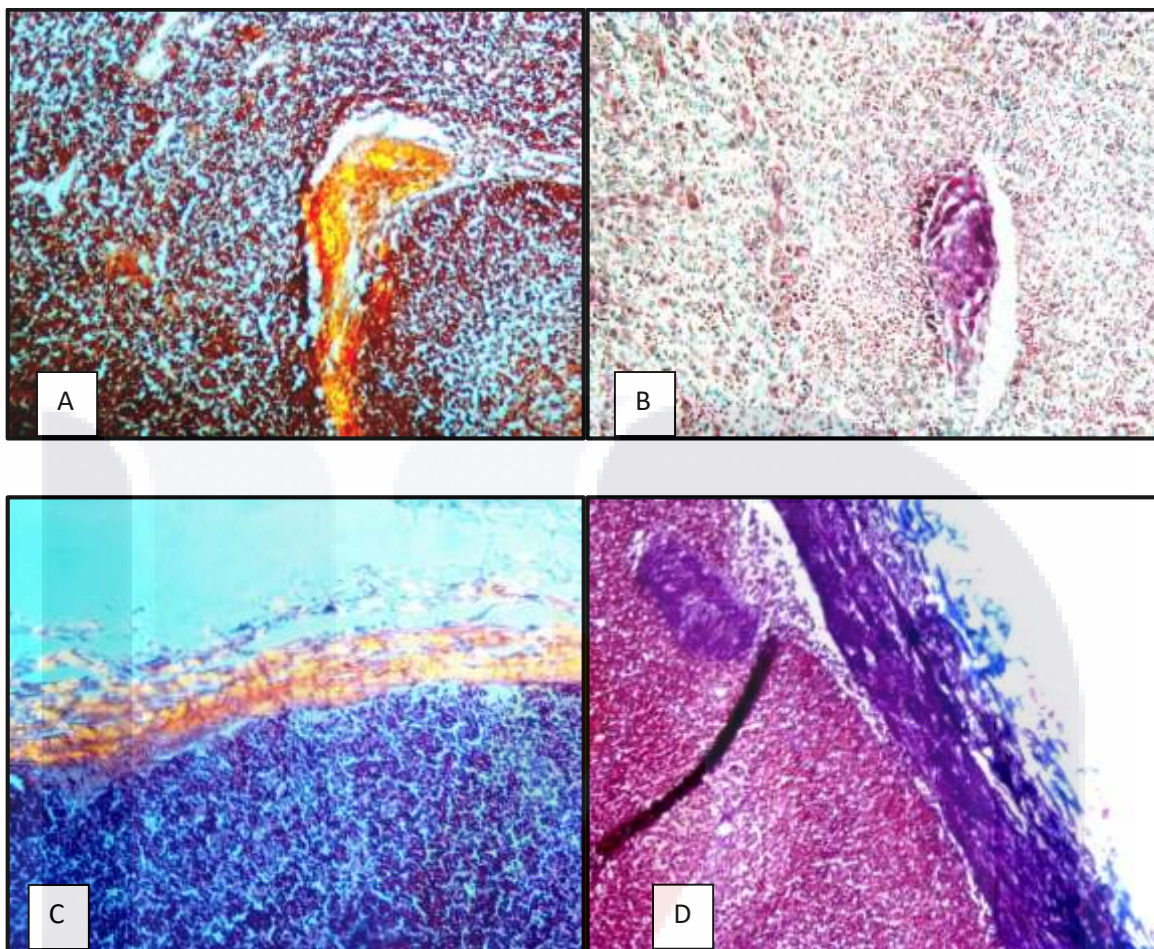


FIGURA No. 14. Muestra histológica de nódulo mesentérico. A) Amiloidosis en trabécula nodular, con distribución difusa, tinción Rojo Congo. B) Presencia de colágeno en trabéculas, tinción tricrómica de Masson. C) Amiloidosis presente en cápsula nodular. D) Colágeno con distribución difusa en cápsula nodular. Tinción tricrómica de Masson. 10x.

5.1.3.1PREVALENCIA

Con la revisión de las laminillas y el resultado de 13 animales positivos (Tabla 5), se realizó el cálculo para obtener la prevalencia encontrada de amiloidosis según la sensibilidad de la técnica Rojo Congo para cada tipo de tejido muestreado.

Tabla 5. Animales positivos a amiloide de acuerdo al tejido.

Número de animales positivos a amiloide	Tejido
5	Riñón
2	Intestino
6	Hígado

A continuación, se presentan los resultados obtenidos, estos fueron analizados por el programa Win Epi en donde:

Nivel de confianza: 95%

Tamaño de la población: 14, 400 bovinos

Tamaño de la muestra: 101 animales

Especificidad de la tinción Rojo Congo: 99% (Bowen *et al.*, 2004).

- **Prevalencia total de amiloidosis (13 animales positivos)**

La prevalencia real de amiloidosis en los animales muestreados fue de 17.72%, se empleó una sensibilidad del 68% (promedio reportado por Bowen *et al.*, en el 2004) y 13 animales positivos de la muestra.

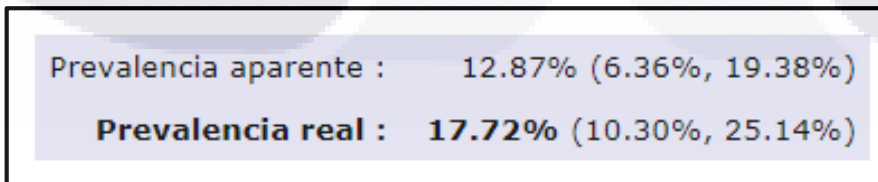


FIGURA No. 15. Prevalencia real y aparente de amiloidosis (IC 95%)

- **Prevalencia de amiloidosis renal.**

La prevalencia real de amiloidosis en los animales positivos a amiloide en riñón fue de 4.29%, empleando una sensibilidad de 93% (promedio reportado por Bowen *et al.*, en el 2004) y 5 animales positivos a amiloidosis renal.



FIGURA No. 16. Prevalencia real y aparente de amiloidosis renal (IC 95%).

- **Prevalencia de amiloidosis hepática.**

La prevalencia real hepática de amiloidosis en los animales positivos fue de 5.37%, empleando una sensibilidad de 93% (promedio reportado por Bowen *et al.*, en el 2004) y 6 animales positivos a amiloidosis hepática.

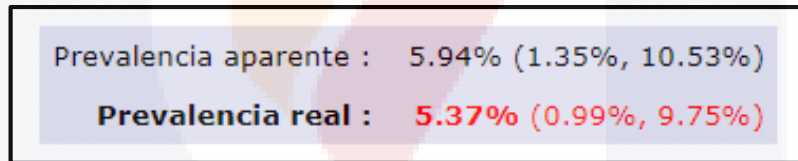


FIGURA No. 17. Prevalencia real y aparente de amiloidosis hepática (IC 95%).

- **Prevalencia de amiloidosis intestinal.**

La prevalencia real de amiloidosis en los animales positivos a amiloidosis intestinal es de 1.20%, empleando una sensibilidad del 83% (promedio reportado por Bowen *et al.*, en el 2004) y 2 animales positivos a amiloidosis intestinal.

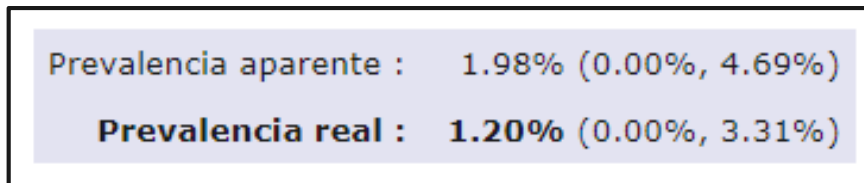


FIGURA No. 18. Prevalencia real y aparente de amiloidosis intestinal (IC 95%).

5.1.4 DESCRIPCIÓN CUALITATIVA DE LOS DEPÓSITOS DE AMILOIDE EN RELACIÓN A SU LOCALIZACIÓN.

Con la revisión al microscopio de las muestras histológicas se observó que en el riñón el amiloide se localizó únicamente perivascular y en túbulos proximales y distales, en el intestino en la submucosa y capa muscular y en el hígado de forma perivascular y en el estroma del mismo.

A continuación, se muestra una tabla (Tabla No.5) con la distribución del número de animales según la localización encontrada.

Tabla 6. Distribución en el tejido del amiloide identificado en las muestras positivas

Número de animales positivos a amiloide	Tejido	Localización
3	Riñón	Perivascular
2	Riñón	Túbulos proximales y distales
1	Intestino	Submucosa/ Muscular
1	Intestino	Submucosa
5	Hígado	Perivascular
1	Hígado	Estroma

En seguida se muestran algunas de las imágenes obtenidas con el procesador antes mencionado para ejemplificar cada una de las localizaciones del amiloide según el tejido.

En el caso del riñón la localización fue en zonas perivasculares (Figura. No. 19) y en túbulos tanto proximales como distales.

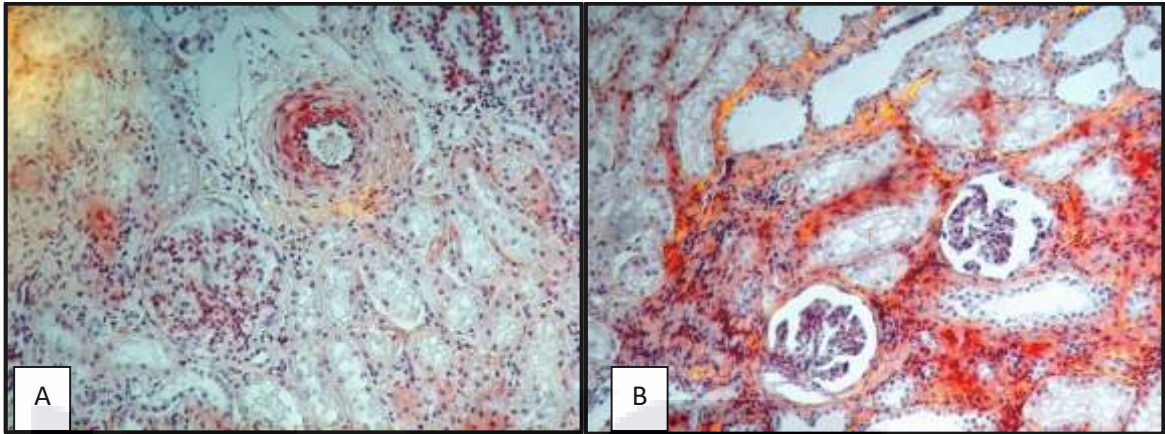


FIGURA No. 19. Alteraciones microscópicas sugestivas de amiloidosis renal. A) Amiloidosis perivascular en corteza renal. B) Amiloidosis tubular. Tinción Rojo Congo, 10x.

Para el intestino se observó material compatible con amiloidosis en capa muscular (Figura No. 20) y de la submucosa.

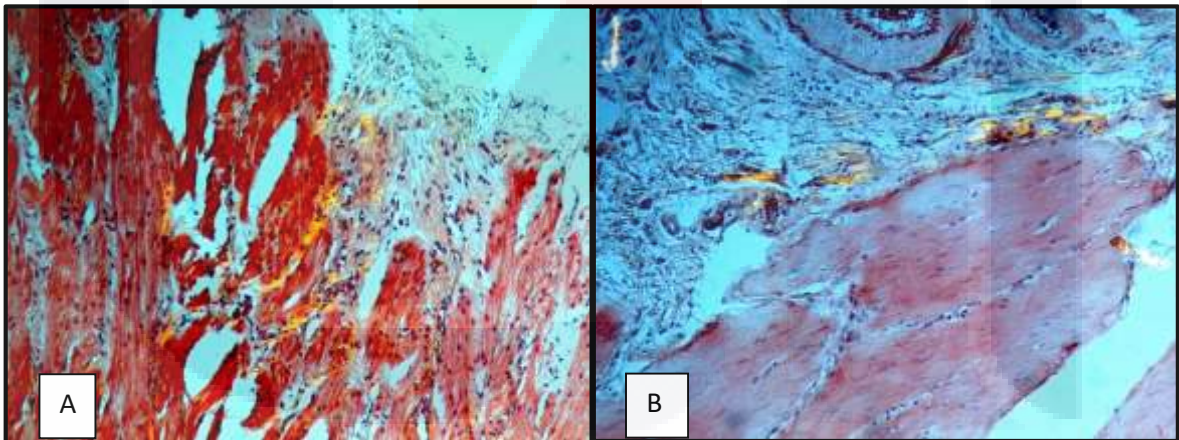


FIGURA No. 20. Alteraciones microscópicas sugestivas de amiloidosis intestinal. A) Amiloidosis en zona muscular del intestino delgado. B) Amiloidosis en submucosa intestinal. Tinción Rojo Congo, 10x.

La amiloidosis hepática se presentó en zonas perivasculares (Figura. No. 21) y en el estroma hepático.

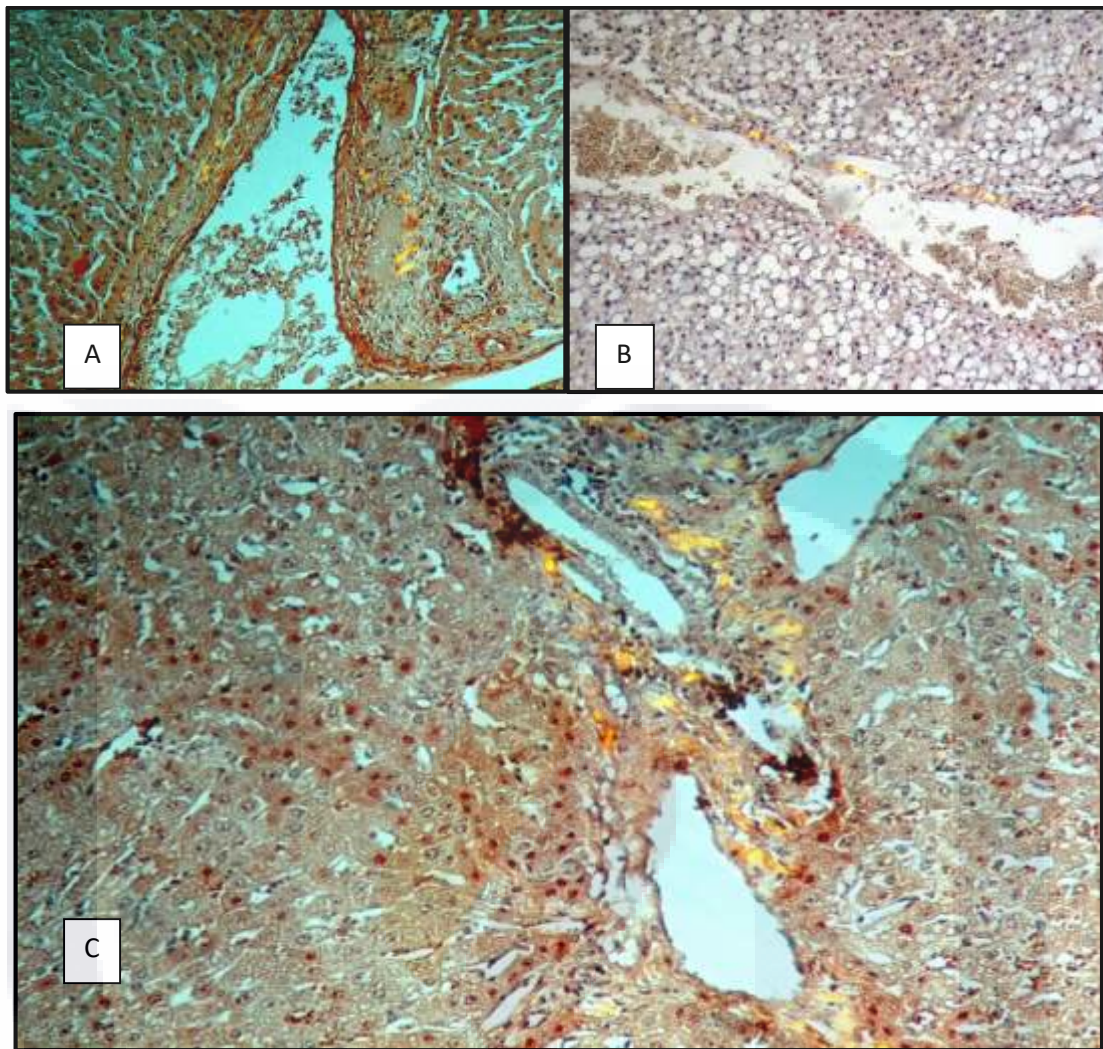


FIGURA No. 21. Muestras histológicas de hígado con presencia de amiloidosis. A) Amiloidosis perivascular con distribución difusa e irregular. B) Presencia de material amiloide perivascular con degeneración serosa macro vesicular. C) Amiloidosis hepática perivascular en área portal. Tinción Rojo Congo, 10x.

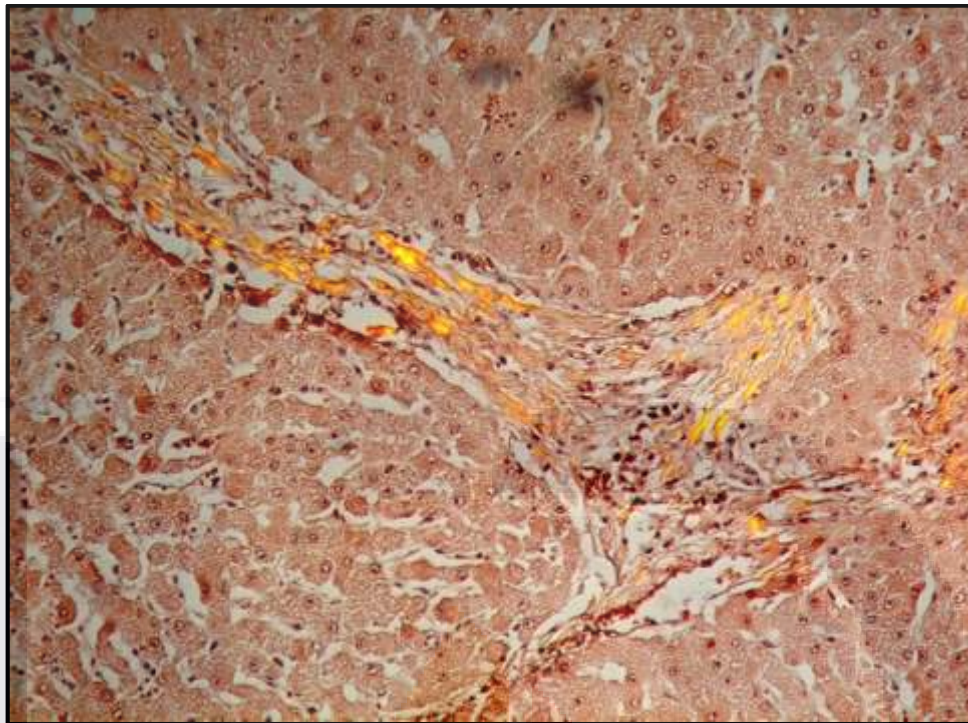


FIGURA No. 22. Hallazgo histológico en hígado con material sugestivo de amiloide en estroma.

En el caso de las muestras histológicas de nódulo mesentérico, no se encontró ninguna muestra positiva a amiloidosis después de haber empleado la tinción tricrómica de Masson.

5.1.5 DISCRIMINACIÓN DE LA AMILOIDOSIS LOCALIZADA DE AMILOIDOSIS REACTIVA SECUNDARIA.

Para este objetivo particular se comenzó a estandarizar la técnica empleada por Rijswijk y Heusden en 1979 para diferenciar el tipo de amiloide en donde se clasificarían como positivos aquellos depósitos amiloides que pierdan afinidad por el colorante Rojo Congo (AA), y como negativos aquellos que sigan presentando congofilia (AL).

Debido al tiempo empleado para la estandarización de la técnica de la tinción de Rojo Congo no se pudo concluir con dicho objetivo.

Se comenzó a estandarizar dicha técnica elaborando solo algunas de las laminillas con la técnica estipulada en el Anexo H, pero hasta el momento no se ha tenido éxito.

5.1.6 ASOCIACIÓN DE SIGNOS CLÍNICOS Y/O HALLAZGOS MACROSCÓPICOS SUGESTIVAS DE AMILOIDOSIS CON EL HALLAZGO EN EL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO.

Se analizaron los resultados obtenidos durante la toma de muestras (encuesta epidemiológica) y los resultados de la revisión de laminillas con tinción Rojo Congo y tricrómica de Masson (animales que resultaron ser tanto positivos como negativos a amiloidosis; 13 animales positivos y 88 negativos a amiloide).

Se utilizó la prueba exacta de Fisher para poder observar los factores de riesgo asociados a amiloidosis. Se empleó un nivel de significancia del 0.01 y se utilizó el programa Minitab (Minitab 18 Statistical Software) para la realización de los cálculos.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos al realizar la prueba exacta de Fisher.

- **Estado sanitario.**

Tabla 7. Análisis con prueba exacta de Fisher para el estado sanitario.

ESTADO SANITARIO	NEGATIVO A AMILOIDE	POSITIVO A AMILOIDE	TOTAL
SANA	49	5	54
MUERTA/ENFERMA	39	8	47
TOTAL	88	13	101

Valor p= 0.3723

Como se puede observar en la Tabla 7 y con el valor obtenido de p, el estado sanitario en el que llegan los bovinos al rastro no influye en la presencia o ausencia de amiloide, por lo que se descarta como factor asociado (Tabla 6).

- **Sexo**

Tabla 8. Análisis con prueba exacta de Fisher para el sexo.

SEXO	NEGATIVO A AMILOIDE	POSITIVO A AMILOIDE	TOTAL
HEMBRAS	50	9	59
MACHOS	38	4	42
TOTAL	88	13	101

Valor p= 0.5495

Como se observa con el valor de p, no existe tendencia a que el sexo del animal tenga una mayor prevalencia para presentar amiloidosis (Tabla 8).

- **Edad**

Tabla 9. Análisis con prueba exacta de Fisher para la edad.

EDAD	NEGATIVO A AMILOIDE	POSITIVO A AMILOIDE	TOTAL
ADULTOS	78	12	90
BECERROS	10	1	11
TOTAL	88	13	101

Valor p= 1

En base al valor p obtenido, podemos observar que la edad de los bovinos no es un factor asociado a la presencia de amiloidosis (Tabla 9).

- **Fin Zootécnico**

Tabla 10. Análisis con prueba exacta de Fisher para el fin zootécnico.

FIN ZOOTÉCNICO	NEGATIVO A AMILOIDE	POSITIVO A AMILOIDE	TOTAL
LECHE	17	3	20
OTRAS	62	8	70
TOTAL	79	11	90

Valor p= 0.7030

Con base en el valor p, no existe tendencia a que el fin zootécnico de los bovinos tenga una mayor prevalencia de amiloidosis.

Cabe mencionar que no se obtuvieron los datos de los 101 animales, pues el proceso sacrificio y manejo de la canal no siempre lo permitían.

- **Condición Corporal**

Tabla 11. Análisis con prueba exacta de Fisher para la condición corporal.

CONDICIÓN CORPORAL	NEGATIVO A AMILOIDE	POSITIVO A AMILOIDE	TOTAL
<2.5	20	4	24
≥2.5	51	7	58
TOTAL	71	11	82

Valor p= 0.7229

Como se puede observar en la Tabla 11 y con el valor p obtenido, la condición corporal no es un factor asociado a la presencia o ausencia de amiloidosis en bovinos.

Cabe mencionar que no se obtuvieron los datos de los 101 animales, pues el proceso sacrificio y manejo de la canal no siempre lo permitían.

- **Presencia de hallazgos macroscópicos**

Tabla 12. Análisis con prueba exacta de Fisher para la presencia de hallazgos macroscópicos.

HALLAZGO MACROSCÓPICO	NEGATIVO A AMILOIDE	POSITIVO A AMILOIDE	TOTAL
CON HALLAZGO MACROSCÓPICO	25	7	32
SIN HALLAZGO MACROSCÓPICO	63	6	69
TOTAL	88	13	101

Valor p= 0.1066

En referencia la tabla y el valor p, se observa que la presencia o ausencia de algún hallazgo macroscópico en los bovinos, no es factor asociado a amiloidosis.

5.1.7 ASOCIAR LA PRESENCIA DE PROTEINURIA CON AMILOIDOSIS RENAL

Para la realización de este objetivo se tomaron muestras de orina al momento de la toma de muestra de los tejidos, se utilizaron tiras reactivas DFI Cybow, multiespecie, Eurovet para medir la concentración de proteínas totales en orina. La tira reactiva se introdujo en la muestra durante 5 minutos y posteriormente se realizó la lectura de la misma; obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 13. Animales positivos a amiloidosis y la concentración de proteínas en orina.

Proteínas totales en miligramos/decilitro (mg/dl)	Número de animales positivos a amiloide	Número de animales negativos a amiloide
15	4	18
30	0	15
≥100	4	27
SIN MUESTRA	5	28

Como se aprecia en la tabla anterior (Tabla 13), los valores referentes a la cantidad de proteínas en orina fueron demasiado variado, encontrándose valores desde 15 a 100 mg/ dl en los animales positivos a amiloide.

Para rectificar las lecturas tomadas por las tiras reactivas, se procedió a analizar 10 muestras adicionales de orina provenientes de equinos, bovinos y humanos con tiras reactivas DFI Cybow, multiespecie, Eurovet y por medio de espectrofotometría empleando método colorimétrico (espectrofotómetro de la marca Caray 100 Bio)

con una longitud de onda de 540 nm. Para la realización se siguieron las indicaciones de uso del kit.

Los resultados fueron los siguientes:

Tabla 14. Resultados obtenidos con tiras reactivas y kit comercial

MUESTRA	TIRAS REACTIVAS DFI CYBOW, MULTIESPECIE, EUROVET (mg/dl)	KIT PROTEINAS TOTALES AA WIENNER LAB. (mg/dl).
2	15	0.1821
3	15	0.1778
4	15	0.1682
5	15	0.1384
7	30	0.2236
1E	15	1.2982
2B	30	0.0862
3B	100	1.8381
1R	15	1.7647
6M	15	1.9990

Se realizó la curva de calibración con las diferentes concentraciones del calibrador para asegurar la correcta realización de la prueba. (Figura No.23)

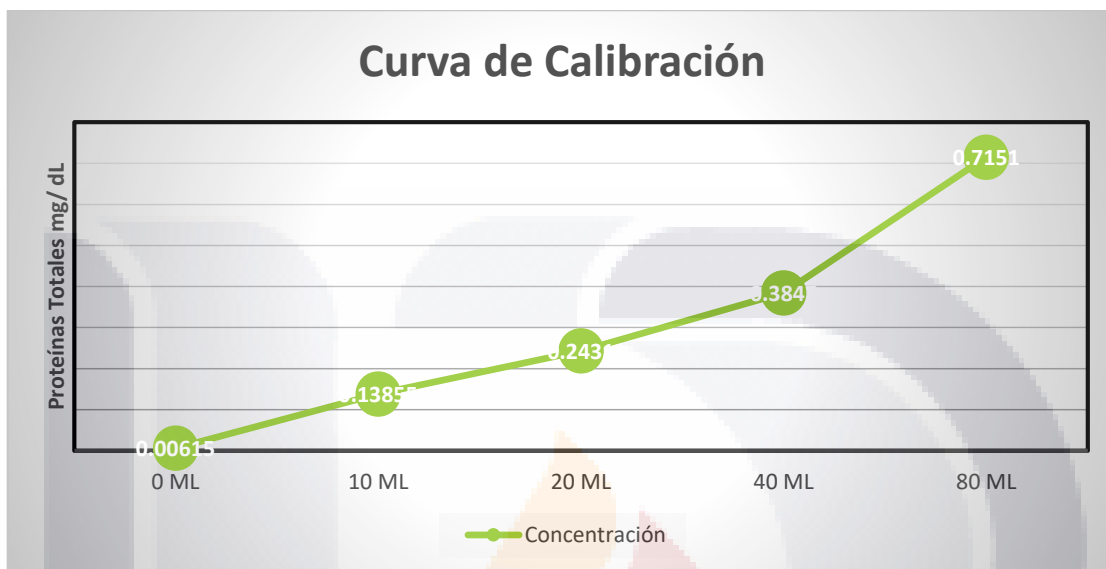


FIGURA No.23. Curva de Calibración con kit de proteínas totales AA Wiener Lab.

CAPITULO VI

DISCUSIÓN

6.1 DETECCIÓN DE LESIONES MACROSCÓPICOS SUGESTIVOS DE AMILOIDOSIS.

Del registro realizado con la encuesta epidemiológica, se observó que la mayoría de los hallazgos patológicos encontrados se realizaron en animales que fueron faenados en el anfiteatro, como era de esperarse puesto que presentaban enfermedad clínica. También fueron de animales negativos a amiloidosis. La presencia de lesiones inflamatorias u otras que puedan sugerir enfermedades crónicas y consuntivas, como la degeneración serosa de la grasa, no es *per se* sugestiva de amiloidosis, sino más bien una condición necesaria para que se desarrolle (Jakob, 1971; Boyce *et al.*, 1984; Taniyama *et al.*, 2000; Cui *et al.* 2002; Kim *et al.*, 2005; Shrasburg *et al.*, 2005; Tojo *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2009; Murakami *et al.*, 2014 Maeda *et al.*, 2016).

Como mencionan algunos autores la amiloidosis la mayoría de las ocasiones se presenta como enfermedad subclínica, sin cambios morfológicos y sólo puede ser diagnosticada como síndrome nefrótico en etapa terminal (Jakob, 1971; Bouda *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2001; Woldesmekel, 2012; Murakami *et al.*, 2014).

Los hallazgos encontrados en los animales positivos a amiloide fueron neumonías, degeneración serosa de la grasa, linfadenomegalia y edema visceral; todos estos compatibles con múltiples enfermedades en los bovinos, en los que está implicada la inflamación crónica como una característica principal; Sin embargo, las lesiones encontradas en los riñones no fueron tan severas y la medición de la proteinuria no fue concluyente para tener mayor indicio de síndrome nefrótico.

Como ya se mencionó en la introducción de este documento, la presencia de amiloidosis reactiva secundaria está ligada a enfermedades que impliquen una inflamación crónica y a la liberación de ciertos precursores como el amiloide sérico a (SAA) en el torrente sanguíneo como lo mencionan Guibarra y Lliulli (2011).

Horadagoda *et al.*, en 1994 mencionan que algunas de las principales causas del aumento de amiloide A sérico en bovinos son infecciones por *Pasteurella haemolytica* y virus respiratorio sincitial bovino que pueden estar estrechamente relacionadas con las neumonías y la linfadenomegalia encontradas (Horadagoda *et al.*, 1994); Sin embargo cabe la posibilidad de que la mayoría de los animales muestreados no hubieran ingerido proteínas amiloides o bien que no hubiera pasado el tiempo suficiente para encontrar daños renales significativos.

En la degeneración serosa y el edema visceral, los principales factores de riesgo identificados son nutricionales y de manejo (Jiménez A., 2016). El manejo inadecuado y el estrés causado por éste favorecen la aparición de distintas patologías que generan un balance energético negativo y propician la movilización de tejido adiposo, particularmente el desplazamiento de abomaso, la hipocalcemia, la retención de placenta, las mastitis y metritis. Sucede rápidamente en casos de anorexia, inanición o caquexia. La caquexia se observa como uno de los principales signos clínicos asociados a la presencia de amiloidosis (Bouda *et al.*, 1997 y Woldesmekel, 2012); Sin embargo, la mala condición corporal es una característica común en los animales Holstein que son enviados al rastro, muy frecuentemente en el periodo posparto en que se agudiza el balance energético negativo por el incremento en la producción de leche y de la misma manera la degeneración serosa de la grasa. En este estudio más de la mitad de las muestras provinieron de animales con estas características.

Además, está asociada a la edad y un intervalo entre partos largo, coincidiendo con algunos datos epidemiológicos en donde se muestra una mayor prevalencia de amiloidosis en vacas viejas con procesos inflamatorios crónicos (Martínez *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 2014; Jakob, 1971).

6.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS HALLAZGOS MICROSCÓPICOS A TRAVÉS DE LA TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA EMPLEANDO MICROSCOPIO ÓPTICO.

Después de la revisión de las laminillas teñidas con hematoxilina eosina, se pudo observar en los animales positivos a amiloidosis algunos hallazgos microscópicos. Para el riñón se pudo identificar la presencia de fibrosis y focos de infiltración linfocitaria. Estos hallazgos son compatibles con múltiples patologías renales crónicas, que por lo general se presentan en bovinos de edad avanzada en donde el cuadro clínico que presentan es muy variable, lo cual dificulta el diagnóstico clínico de estas patologías.

La presencia de fibrosis y células inflamatorias podemos encontrarlas no sólo asociados a amiloidosis, sino también en cuadros de enfermedad renal membranoproliferativa, membranosa, mesangioproliferativa, glomeruloesclerosis, nefritis hereditaria, glomerulonefritis, entre otros (Cortadellas, 2010; Vaden y Brown, 2009).

En el caso del hígado, se logró identificar la presencia de necrosis y esteatosis hepática, tanto macro vesicular como micro vesicular. Un mal manejo de las explotaciones bovinas genera estrés (aumento de precursor amiloidogénicos), favoreciendo la aparición de estos cambios en el hígado, pues una mala dieta (baja o alta en proteínas), la falta de espacio, una limpieza insuficiente, humedad elevada, calor o mala ventilación favorecen la movilización de tejido graso al hígado. Algunas de las patologías relacionadas con estos procesos y por lo tanto con el depósito de amiloide en hígado son la endometritis, retención de placenta, hipocalcemia comatosa, mastitis y desplazamiento abomasal, las mastitis y las metritis (Gerloff y Herdt; 1995; De Luca, 2005). Todos estos padecimientos tienen una prevalencia mayor justo en el periodo posparto, donde se suceden una gran parte de las muertes y desechos involuntarios en el ganado lechero (Rogel y Tamayo, 2007; Vitela *et al.*, 2004).

Se ha reportado la identificación de depósitos amiloides empleando la tinción hematoxilina eosina, observándose el amiloide como un material amorfo, eosinofílico, con apariencia hialina y homogénea, más se requiere experiencia para clasificar como positivo los tejidos observados, puesto que es posible confundirlo con edema, hialinosis y degeneración fibrinoide. Por esta razón, su utilidad principal en este estudio fue la identificación de lesiones microscópicas para asociarlas con la presencia de amiloide (Sen y Başdemir, 2003; Hazenberg *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2005; Herrera y Piken, 2006; Piken, 2007; Mora, 2011; Bowen *et al.*, 2012; Woldemeskel *et al.*, 2012).

6.3 DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE AMILOIDOSIS SISTÉMICA REACTIVA A TRAVÉS DE LA TINCIÓN ROJO CONGO EMPLEANDO MICROSCOPIO DE LUZ POLARIZADA.

En la actualidad, son muchos los investigadores que hacen referencia al uso de las técnicas histopatológicas y más específicamente de la tinción Rojo Congo; describiéndolas como las más adecuadas para la detección de cuerpos amiloides. Hasta el momento rojo rongo se considera la técnica de referencia para la detección de amiloide, tiene una sensibilidad de entre el 54% y el 82% y una especificidad del 100%; razón por la cual se seleccionó esta tinción para realizar este proyecto. (Sen y Başdemir, 2003; Hazenberg *et al.*, 2004; Álvarez *et al.*, 2005; Herrera y Piken, 2006; Piken, 2007; Mora, 2011; Bowen *et al.*, 2012; Woldemeskel *et al.*, 2012). Incluso se ha descrito que la inmunohistoquímica y el rojo congo presentan especificidades similares (Cecilia G. *et al.*, 2014).

Cooper en 1969, Linke en el 2000 y Sen y Basdemir en el 2003 encontraron limitaciones en el uso de esta técnica, en particular con una cantidad mínima de amiloide; además de esto, para su realización se requieren diversos reactivos químicos que suelen ser difíciles de conseguir en la zona en la que se realizó este proyecto. Pese a contar con una metodología estandarizada, se tuvieron que realizar pruebas y modificaciones hasta alcanzar los resultados requeridos.

También se ha observado que para que el colorante Rojo Congo se una al amiloide se necesita que el tejido tenga un espesor de 8 μm (micras) para demostrar la birrefringencia (Elghetany *et al.*, 1989).

Además de lo anterior, Klatskin hace más de 40 años descubrió que existían focos de birrefringencia verde en los tejidos conectivos del hígado y otros órganos en condiciones normales tanto en el hombre como en la rata, por lo que se aconseja el emplear técnicas adicionales como la tinción tricrómica de Masson para el tejido conectivo (fibras colágenas), ya que puede existir una confusión al momento de la observación al microscopio, dada la producción de birrefringencia verde con luz polarizada.

Se recomienda también realizar pruebas alternativas como la inmunohistoquímica para aumentar la sensibilidad de la detección de amiloide, aunque algunas de las limitaciones del método inmunohistoquímico pueden incluir la disponibilidad de anticuerpos (al menos en México) y la posibilidad de resultados negativos en casos con cantidades muy pequeñas de amiloide (Linke *et al.*, 1995).

Todas las técnicas anteriormente mencionadas pueden tener múltiples variaciones en cuanto a la forma de realización, y más cuando el recurso humano no es el mismo durante todo el proceso. En general se recomienda aumentar la sensibilidad con técnicas alternativas, aumentar el grosor de los cortes al microtomo para que el amiloide aun en pequeñas cantidades pueda ser identificado, estandarizar las técnicas a emplearse según las condiciones del estudio y tener experiencia al momento de la interpretación al microscopio óptico.

La prevalencia encontrada tanto de amiloidosis renal (4.29%), como hepática (5.37%) e intestinal (1.20%), concuerda con los hallazgos encontrados por Tojo *et al.*, (2005) y Yoshida *et al.*, (2009), quienes reportaron una prevalencia que va desde un 1.2% a un 5.5% de los animales que llegan al matadero en Japón; Sin embargo, es necesario realizar la prueba de permanganato de potasio para determinar si dichos hallazgos corresponden a amiloidosis reactiva secundaria, pues es notable que no haya habido evidencia de amiloidosis más que en uno o dos tejidos por animal y no de manera generalizada (Gertz *et al.*, 2013; DiBartola, 1992).

6.4 DESCRIPCIÓN DE LOS DEPÓSITOS DE AMILOIDE EN RELACIÓN CON SU LOCALIZACIÓN Y DE MANERA CUALITATIVA.

Como ya se mostró en los resultados, la localización de los depósitos amiloides en riñón fueron principalmente en zonas perivasculares y tubulares, concordando con los hallazgos encontrados por Esteve *et al.*, en el 2006 y Sen y Sarsik en el 2010, pues ellos mencionan que los depósitos son predominantes en túbulos, con depósitos irregulares y focales.

Los mismos autores hacen énfasis en que los vasos sanguíneos pueden tener depósitos de variable intensidad y extensión, pudiendo comprometer arterias y venas de todos los tamaños; pero a su vez, mencionan que estos hallazgos son característicos de amiloidosis AL, aunque no son excluyentes de amiloidosis AA. También encontraron que los depósitos glomerulares pueden ser escasos o ausentes como fue el caso de nuestro proyecto; por estas razones es que se recomienda la realización de otras técnicas como la inmunohistoquímica o permanganato de potasio para la diferenciación del tipo de amiloide identificado (Esteve *et al.*, 2006; Sen y Sarsik, 2010).

La localización de los depósitos amiloides en hígado fueron predominantemente en zonas perivasculares, concordando con los hallazgos mencionados por Gamarra *et al.*, en 1999, quienes mencionan que las áreas portales son las más afectadas. Estos hallazgos se ven asociados al proceso inflamatorio, en específico a la fase aguda de la inflamación, pues su acontecimiento desencadena la liberación de interleucinas y del factor de necrosis tumoral, que al ser liberados al torrente sanguíneo provocan un incremento de la permeabilidad vascular, haciéndolos susceptibles a un depósito amiloide (Martínez *et al.*, 2001; Loos, 2005).

Para el caso del intestino la localización fue en capa muscular y zona de la submucosa, concordando con varios autores que describen que los depósitos suelen ubicarse alrededor de los vasos sanguíneos, lámina propia, submucosa y capa muscular, presentando una distribución difusa (Sen y Sarsik, 2010; Jungienger *et al.*, 2015; Woldemeskel, 2012; Boyce *et al.*, 1984).

6.5 CONFIRMACIÓN DE LOS HALLAZGOS SUGESTIVOS DE AMILOIDOSIS AA AL SOMETER LAS TINCIONES DE ROJO CONGO CON SOLUCIÓN DE PERMANGANATO DE POTASIO.

Para poder diferenciar sobre el tipo de amiloidosis que se logró identificar, se pretendía realizar la técnica de permanganato de potasio al 5% reportado por Rijswijk y Heusden en 1979; debido al tiempo empleado para la estandarización de la técnica de la tinción de Rojo Congo no se pudo concluir con dicho objetivo. Se comenzó a estandarizar dicha técnica elaborando solo algunas de las laminillas con la técnica estipulada en el Anexo H, pero hasta el momento no se ha tenido éxito.

Como se mencionó anteriormente, se sugiere realizar la técnica de inmunohistoquímica para diferenciar el tipo de amiloidosis, esto por ser más sensible y específica (Cecilia G. et al., 2014).

6.6 ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE SIGNOS CLÍNICOS Y/O DE HALLAZGOS MACROSCÓPICOS SUGESTIVOS DE AMILOIDOSIS CON EL HALLAZGO CONFIRMADO EN EL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO A TRAVÉS DE LA TINCIÓN ROJO CONGO.

Después de la realización de la prueba exacta de Fisher para asociar la presencia de amiloidosis con los datos obtenidos durante la toma de muestras se pudo observar que ninguna de las variables representa un factor de riesgo para la presencia de amiloidosis.

En cuanto al sexo y edad se refiere, se menciona que los animales con mayor riesgo son las vacas viejas, encontrando en nuestro estudio que ninguno de estos dos factores tienen una relación directa con la presencia de amiloide (Martínez *et al.*, 2001; Murakami *et al.*, 2014; Jakob, 1971). Cabe señalar que, en México, en el 2004, según datos de la Asociación Holstein, los bovinos lecheros eran desechados después de 2.4 lactancias, es decir 5 o 6 años de edad, que coincide con lo reportado por Rogel y Tamayo (2007) lo que en realidad no corresponde realmente a animales viejos.

Autores como Bouda *et al.*, en 1997 y Woldesmekel en el 2012 aseguran que la amiloidosis bovina es una enfermedad relativamente rara caracterizada por la caquexia además de otros signos clínicos, por lo que se esperaba encontrar relación en cuanto a la condición corporal de los animales muestreados con la existencia de amiloidosis, pero el resultado obtenido no permite confirmarlo. Es probable que parte del problema fuera por bajo número de observaciones que se tuvieron en el caso de algunas condiciones. Es probable que esta situación haya estado

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

influenciada por el tipo de muestreo que se realizó. El muestreo por conveniencia consiste en seleccionar una muestra de la población por el hecho de que es accesible, esto facilita la operación y disminuye los costos; Sin embargo, tiene como consecuencia la imposibilidad de hacer afirmaciones generales sobre la población (Taherdoost H., 2016).

En términos generales, el ganado sacrificado en el rastro municipal en la línea 1, corresponde con animales clínicamente sanos, predominantemente machos jóvenes, destinados a la producción de carne. Fue muy infrecuente observar lesiones macroscópicas en estos individuos. Kakagun *et al.*, (2019) observaron durante 5 años en Hokkaido, Japón, las lesiones macro y microscópicas de 54 cetáceos que incluyeron 11 especies de ballenas. Diagnosticaron amiloidosis sistémica en dos de ellas a través de Rojo Congo e inmunohistoquímica. Los órganos más afectados fueron el riñón y el tracto gastrointestinal pero las únicas lesiones macroscópicas observadas fueron ligeras hepatomegalia y esplenomegalia.

Contrariamente, en el caso de los animales que ingresan por el anfiteatro, muertos o caídos, la mayoría de las veces son hembras de desecho provenientes de granjas lecheras. Lo anterior de alguna manera sesga la información, pero no les resta valor a los resultados obtenidos puesto que es un estudio exploratorio.

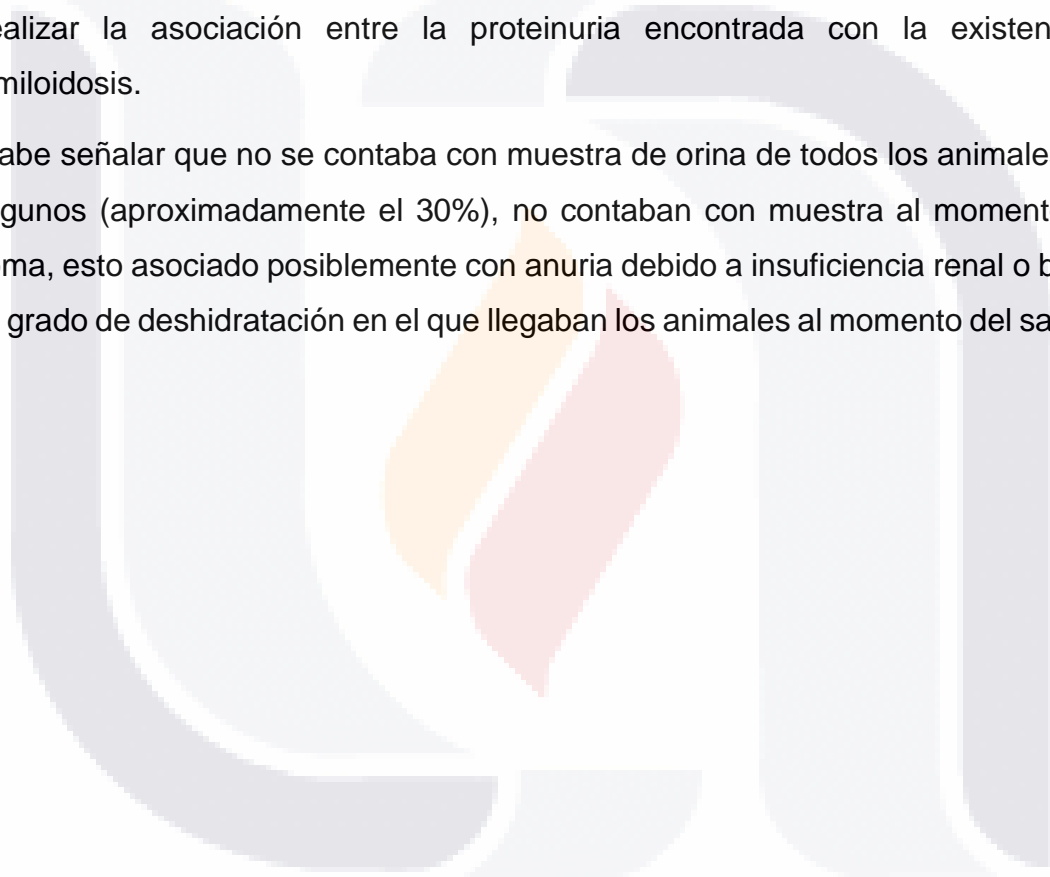
6.7 ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE PROTEINURIA CON AMILOIDOSIS RENAL.

Para poder diagnosticar insuficiencia o daño renal es necesario medir la cantidad de proteínas totales excretadas en orina; se conoce que el rango normal es de 0 a 1 mg/dl, por lo que todos los animales con valores superiores a éste se categorizan como positivos a proceso patológico con proteinuria (Bouda *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 2009; Murakami *et al.*, 2012).

Con los resultados obtenidos de la medición de las proteínas totales en orina con las tiras reactivas de los animales positivos a amiloidosis, se observó que todos los animales presentaban proteinuria marcada, pues los valores iban de 15 a 100 mg/dl de proteínas excretadas.

Para garantizar la confiabilidad de los datos obtenidos, se realizó la cuantificación de proteínas totales por medio de espectrofotometría, encontrando que la medición de las tiras reactivas no concordaba con los datos obtenidos, por lo que no se pudo realizar la asociación entre la proteinuria encontrada con la existencia de amiloidosis.

Cabe señalar que no se contaba con muestra de orina de todos los animales, pues algunos (aproximadamente el 30%), no contaban con muestra al momento de la toma, esto asociado posiblemente con anuria debido a insuficiencia renal o bien por el grado de deshidratación en el que llegaban los animales al momento del sacrificio.



CAPITULO VII

CONCLUSIÓN

Con la realización de este proyecto, se pudo demostrar la existencia de amiloidosis en bovinos sacrificados en el rastro municipal de Aguascalientes.

La realización de las técnicas histopatológicas para la identificación del amiloide tiene sus limitaciones, por lo que se recomienda emplear un grosor de 8 μm de grosor para su fácil identificación al asegurar la tinción del amiloide, emplear la técnica de tinción Rojo Congo con ciertas adecuaciones, realizar la técnica tricrómica de Masson para descartar la confusión de amiloide con colágena y en su caso, emplear técnicas más específicas y sensibles para su correcta identificación

Los factores de riesgo que se asocian a la presencia de enfermedad (amiloidosis), no son determinantes para que esta se encuentre presente en la muestra estudiada; Sin embargo, la presencia de amiloidosis también pudiese estar relacionada con algunos otros factores como mutaciones en los precursores amiloidogénicos, la susceptibilidad de la raza animal para desarrollar la enfermedad, así como las condiciones de vida del individuo.

Como ya se mencionó anteriormente, la población humana y el aumento de las enfermedades neurodegenerativas en personas de edad avanzada representan un factor de riesgo para la población, aunque en la actualidad se descarte la edad como un condicionante para la generación de la enfermedad, ya que en la actualidad se ha demostrado que incluso infantes de corta edad pueden poseerla y morir por la misma.

Se recomienda profundizar más en relación al estatus sanitario de los animales que llegan al consumo humano para favorecer la inocuidad alimentaria y disminuir el

riesgo latente en el que se encuentra la población que consume dichos productos cárnicos provenientes del bovino.



BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez R, García R, Daudén E. 2005. Amiloidosis Sistémicas. *Hospital Universitario de La Princesa*. España, 96 (2): 69-82.
2. Amero C. 2014. Investigación para entender la amiloidosis primaria. *Ciencia y Desarrollo*. <http://www.cienciaydesarrollo.mx/?p=articulo&id=185>.
3. Baker K, Rice L. 2012. The Amyloidoses: Clinical Features, Diagnosis and Treatment. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*, 8(3), 3–7.
4. Barashi N, Vargas C, Zarco L. 2013. Enfermedades priónicas humanas. *Universitas Médica*, 54 (4): 495-516.
5. Benditt EP, Hoffman JS, Eriksen N, Parmelee DC, Walsh KA. 1982. SAA, an apoprotein of HDL: its structure and function. *Ann N Y Acad Sci*. 389:183–189.
6. Blancas LM, Ramírez M. 2013. Systemic Amyloidoses. *Annu Rev Biochem*. 82: 45-774.doi: 10.1146/annurev-biochem-072611-130030
7. Born M, Wolf E. 1999. Principles of Optics, 7th Ed. (Cambridge University Press), 15.3.3.
8. Bouda J, Paasch ML, Yabuta OA. 1997. Desarrollo y empleo del método de diagnóstico preventivo de los trastornos ruminales y metabólicos en bovinos. *Vet Mex*, 28 (3): 189-195.
9. Bowen K, Shah N, Lewin M. 2012. AL-Amyloidosis Presenting with Negative Congo Red Staining in the Setting of High Clinical Suspicion: A Case Report. *Case Reports in Nephrology*, Article ID 593460. <https://doi.org/10.1155/2012/593460>.
10. Boyce J, Dibartola S, Chew D, Gasper P. 1984. Familial Renal Amyloidosis in Abyssinian Cats. *Vet. Pathol*, 21: 33-38.
11. Buades J, Aguirre C. 2001. Fiebre Mediterránea Familiar. *Med Clin*. 117: 142-146.

12. Caspi S, Halimi M, Yanai A, Sasson S, Taraboulos A, Gabizon R. 1997. The Anti-prion Activity of Congo Red. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 3484-3489. doi: 10.1074/jbc.273.6.3484.
13. Cecilia G, Clement MDa, Luan D, Truong MD. 2014. An evaluation of Congo red fluorescence for the diagnosis of amyloidosis. *Human Pathology*. 45, 1766–1772
14. Clínica Universidad de Navarra, <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/edemas>.
15. Contreras S. 2001. Identificación inmunohistológica de la sustancia amiloide AA en biopsias de glándulas saliva les labiales. TM-UPCH.
16. Cooper JH. 1969. An evaluation of current methods for the diagnostic histochemistry of amyloid. *J Clin Pathol*, 22:410-3.
17. Cortadellas O. 2010. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad glomerular en el perro. Barcelona, España.
18. Cruz M, Aguilar T, Díaz L. 2009. Amiloidosis Hepática. Dolor, Clínica y Terapia. Vol. 6.
19. Cui D, Kawano H, Takahashi M, Hoshi Y, Setoguchi M, Gondo T, Ishihara T. 2002. Acceleration of murine AA amyloidosis by oral administration of amyloid fibrils extracted from different species. Vol. 52, pp 40-45.
20. De Luca L. 2005. Fisiopatología del Hígado de las Vacas de Alta Producción. Laboratorios Burnet. <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/fisiopatologia-higado-vacas-alta-t26020.htm>
21. DiBartola SP. 1992. Renal amyloidosis in dogs and cats. *WB Saunders Co*, 8: 23.
22. Dirección de investigación y evaluación económica y sectorial. 2017. Panorama Agroalimentario. Carne de Bovino 2017. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200639/Panorama_Agroalimentario_Carne_de_bovino_2017__1_.pdf
23. Eckersall PD. 2000. Acute phase proteins as markers of infection and inflammation: monitoring animal health, animal welfare and food safety. *Irish Vet.J*. 53: 307-31

24. El Economista, (26 de febrero del 2019), Consumo de carne aumenta 3.7% en México durante 2018: Comarcane. <https://www.eleconomista.com.mx/empresas/Consumo-de-carne-aumenta-3.7-en-Mexico-durante-2018-Comarcane-20190226-0101.html>.
25. Elghetany MT, Saleem A, Barr K. 1989. The Congo red stain revisited. *Ann Clin Lab Sci*, 19:190-5.
26. Esteve J, Almirall E, Ponz N, García L, Ribera M, Larrosa X, Andreu M, García. 2006. Afectación renal en la amiloidosis. Características clínicas, evolución y supervivencia. *Nefrología*. Vol. 26. Número 2.
27. Fernández BN, Eraña H, Venegas V, Elezgarai SR, Harrathi C, Castilla J. 2015. Animal models for prion-like diseases. *Virus Res*, 2:207:5-24.
28. Fujinaga Y. 1990. Incidence of amyloid desposits in varios organs in senile cows and heir pathological characteristics. *Yamaguchi Med. J*, 39, 293-303.
29. Gamarra J, Vargas G, Kemper R, Chávez M, Valdivia M. 1999. Amiloidosis hepática como diagnóstico en la amiloidosis sistémica. Reporte de un caso. *Revista de Gastroenterología del Perú*. Vol 19, N°2.
30. Gass JN, Gunn KE, Sriburi R, Brewer JW. 2004. Stressed-out B cells? Plasma-cell differentiation and the unfolded protein response. *Trends in Immunology*. 25:17–24.
31. Gerloff BJ, Herdt TH. 1995. Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in Dairy Cattle. *J.A. Vet M: A* 188:845.
32. Gertz M, Dispenzieri A, Grogan M, Kumar S, Leung N, Maurer M, Picken M, Wiesman J, Sanchorawala V. 2013. Concientización sobre la amiloidosis. *Fairman Studios, LLC*. pp: 1-38
33. Gewurz H, Zhang X, FranklinLint T. 1995. Structure and function of the pentraxins. Vol. 7, Issue 1: 54-64. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(95\)80029-8](https://doi.org/10.1016/0952-7915(95)80029-8).
34. GNM. Cifras sobre el Parkinson en el Mundo. <https://tratamientoparkinson.com/noticias/274-los-pacientes-en-las-primeras-etapas-de-parkinson-exhiben-somnolencia-y-alucinaciones>

35. Gobierno del estado de Aguascalientes.
<http://www.aguascalientes.gob.mx/estado/ubicacion.html>.
36. González A, Corcuera O, Julen. 2009. Amiloidosis Renal. *Hospital Txagorritxu Ospitalea*, 10; 7-17.
37. González K. 2017. Neumonías en becerras. Zootecnia y Veterinaria.
<https://zoovetespasion.com/ganaderia/enfermedades-bovinas/neumonia-en-becerras/#etiologia>.
38. Gorevic PD. 1981. The amyloid diseases: clinicopathologic and biochemical correlations. *Clinical Immunology Update*. Edinburgo, Churchill Livingstone, 1.
39. Gruys E. 2004. Protein folding pathology in domestic animals. *J. Zhejiang Univ SCI*, 5 (10):1226-1238.
40. Guibarra V, Lliulli Y. 2011. Proteínas de fase aguda. *Revista de Actualización Clínica Investiga*. v.13 La Paz ISSN 2304-3768.
41. Gutiérrez G. 2014. Investigación para entender la amiloidosis primaria. *Ciencia y Desarrollo*. <http://www.cienciaydesarrollo.mx/?p=articulo&id=185>
42. Harata D, Tsuchiya Y, Miyoshi T, Yanai T, Suzuki K, Murakami T. 2018. Inhibitory effect of propolis on the development of AA amyloidosis. *J Toxicol Pathol*. 31(2):89-93. doi: 10.1293/tox.2017-0044.
43. Hazenberg BP, Gameraen II, Bijzet J, Jager PL, Rijswijk MH. 2004. Diagnostic and therapeutic approach of systemic amyloidosis. *Neth J Med*. 62(4):121-8.
44. Herrera GA, Picken MM. 2006. Renal Diseases associated with plasma cell dyscrasias, amyloidoses, Waldenstrom macroglobulinemia and cryoglobulinemic nephropathies. *Heptinstall's Pathology of the Kidney*, 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; pp. 853–910.
45. Hirschfield G. 2004. *Sem. Cell & Develop. Biol.* 15. 39-44
46. Horadagoda A, Eckersall PD, Hodgson JC, Gibbs HA, Moon GM. 1994. Immediate responses in serum TNF α and acute phase protein concentrations to infection with *Pasteurella haemolytica* A1 in calves. *Res. Vet. Sci.* 57: 129-132.

47. Ignaczak TF: Amyloidosis. En Kelley WN, Harris ED Jr, Ruddy S, Siedge CB: Textbook of Rheumatology. Filadelfia, WBSaunder 1981; 1511.
48. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP) Washington DC.
49. Jain N. 1989. Acute phase proteins. *Current veterinary Therapy X: Small animal practice*, pp 468-471. Eds: Kirk R.W., W B Saunders, Philadelphia
50. Jakob W. 1971. Spontaneous Amyloidosis of mammals. *J. of Path.* 8: 292-306.
51. Jaunmuktane Z, Mead S, Ellis M, Wadsworth J, Nicoll A, Kenny J, Launchbury F, Linehan J, Richard A, Walker, Rudge P, Collinge J, Brandner S. 2015. Evidence for human transmission of amyloid-b pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature*. Vol. 525. doi:10.1038/nature15369.
52. Jiménez A. 2016. http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/criaysalud/27/cys_27_56-58.pdf
53. Jungienger J, Hansmann, Herder V, Lehmbecker, Peters M, Beyerbach, Wohlsein P, Baumgartner W, 2015. Pathology in Captive Wild Felids German Zoological Gardens, *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130573>
54. Klatskin G. 1969. Nonspecific green birefringence in Congo red-stained tissues. *Am J Pathol*, 56:1-13.
55. Kim D, Taylor H, Eades S, Cho D, 2005. Systemic AL Amyloidosis Associated With Multiple Myeloma in a Horse. *Vet Pathol*, 42:81-84.
56. Kushner I, Gewurz H, Benson MD. 1981. C-reactive protein and the acute. *Jun*; 97(6):739-49.
57. Lachmann HJ, Goodman HJ, Gilbertson JA, Gallimore JR, Sabin CA, Gillmore JD, Hawkins PN. 2007. Natural history and outcome in systemic AA amyloidosis. *The New England Journal of Medicine*. *N Engl J Med*; 356:2361-2371 DOI: 10.1056/NEJMoa070265.

58. Laiho K, Tiitinen S, Kaarela K, Helin H, Isomaki H. 1999. Secondary amyloidosis has decreased in patients with inflammatory joint disease in Finland. *Clin Rheumatol*. 18:122-123.
59. Laidman J, Forse GJ, Yeates TO. 2006. Conformational change and assembly through edge beta strands in transthyretin and other amyloid proteins. *Acc Chem Res*. 39:576–83.
60. Lee S, Tsai F. 2005. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38, 258-265.
61. Liu Y, Cui D, Hoshii Y. 2007. Induction of murine AA amyloidosis by various homogeneous amyloid fibrils and amyloid-like synthetic peptides. *Scand J Immunol*, 66(5):495–500.
62. Linke RP, Hol PR, Geisel O. 1986. Immunohistochemical identification of generalized AA-amyloidosis in a mountain gazelle (*Gazella gazella*). *Vet Pathol*. 23(1):63-7. DOI:10.1177/030098588602300110
63. Linke RP. 2000. Highly sensitive diagnosis of amyloid and various amyloid syndromes using Congo red fluorescence. *Virchows Arch*, 436: 439-48.
64. Liu Y, Cui D, Hoshii Y. 2007. Induction of murine AA amyloidosis by various homogeneous amyloid fibrils and amyloid-like synthetic peptides. *Scand J Immunol*, 66(5):495–500.
65. López H, Lise H, Urcuqui S. 2002. El desafío de las enfermedades priónicas. Una emergencia en humanos y bovinos. *Veterinaria México*; 33(4): 421-42
66. Lowell CA, Potter DA, Stearman RS, Morrow JF. 1986. Structure of the murine serum amyloid A gene family. Gene conversion. *J Biol Chem*, 261(18):8442–8452.
67. Macario A, Conway de Macario E. 2005. Sick chaperones, cellular stress and disease. *New Eng J Med*; 353: 1489-501.
68. Macarulla J, Goñi F. 1994. *Bioquímica Humana*. 2da Edición, Editorial Reverté, Barcelona. ISBN-84-291-5553-8.
69. Maeda M, Murakami T, Muhammad N, Inoshima Y, Ishiguro N. 2016. Experimental transmission of systemic AA amyloidosis in autoimmune disease and type 2 diabetes mellitus model mice. *Exp. Anim.* 65849, 427-436.

70. Martinez S, Tecles F, Parra M, Cerón J, 2001. Proteínas de fase Aguda: Conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. *Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia*. 17:97-114.
71. Matsuura M, Abe H, Tominaga T, Sakurai A, Murakami T, Kishi S, Bando Y, Minakuchi J, Nagal K, Doi T. 2017. A Novel Method of DAPI Staining for Differential Diagnosis of Renal Amyloidosis. *J Med Invest.*; 64(3.4):217-221. doi: 10.2152/jmi.64.217.
72. Medina D, Quiroz R, Carrera C, Paredes O, Aranda Edith, Barrios J, Cortez S. *Dermatol Revista Mexicana*. Artículo de revisión; 59:208-218.
73. Ménsua C, Carrasco L, Bautista M, Biescas E, Fernandez C, Murphy D. 2003. Pathology of AA Amyloidosis in Domestic Sheep and Goats. *J. Vet. Pathol.* 40: 71-80.
74. Ministerio de sanidad, consumo y bienestar social. 2018. Abordaje de la Esclerosis Lateral Amiotrófica Estrategia en Enfermedades Neurodegenerativas del Sistema Nacional de Salud.
75. Mora E. 2011. Amiloidosis. Sistema inmunológico, importancia y principales enfermedades. Universidad Internacional de la Americas. <http://todosobretusistemainmunologico.blogspot.mx/2011/08/algunas-enfermedades-del-sistema.html>
76. Murakami T, Inoshima Y, Kobayashi Y, Matsui T, Inokuma H, Ishiguro N. 2012. Atypical AA amyloid deposits in Bovine AA Amyloidosis. *Amyloid*. 19 (1): 15-20.
77. Murakami T, Ishiguro N, Higuchi K. 2014. Transmission of Systemic AA Amyloidosis in Animals. *Veterinary Pathology* Vol 51(2) 363-371.
78. Nakagun S., Watanabe K., Matsuishi T., Kobayashi M., Kobayashi Y. 2019. Surveillance of amyloidosis in stranded and bycaught cetaceans of Hokkaido, Japan. *J. Vet Med. Sci*. Doi:10.1292/jvms.18-0706 (Epub antes de imprimir).
79. Nizhnikov A, Antonets K, Inge-Vechtomov S, 2015. Amyloids: from Pathogenesis to Function. Vol. 80, No. 9, pp. 1127-1144.

80. Ochoa R, Ballesteros P, Espinoza G. 2017. Amiloidosis de cadenas ligeras en pediatría. A propósito de un caso. *Revista Mexicana de Pediatría*. Vol. 84, No. 1, pp 25-29.
81. Organización Mundial de la Salud. 2016. Diabetes. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>.
82. Osoreo F, Maguiña C, Bustamante B. 2004. Micosis ganglionar: reporte de 7 casos en el Hospital Nacional Cayetano Heredia Lima-Perú y revisión de la literatura. *Rev. Med Herediana*, 15(4): 211-217.
83. Pacifico C, Galotta J. 2002. Enfermedades por priones. *Revista de ciencias agrarias y Tecnología de los Alimentos*. Vol. 20 pp. 29-36. Phase response. *J. Lab. Clin. Med.* 97:739-749.
84. Panciera RJ, Confer AW. 2010. Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. *Vet. Clin. Food. Anim.* 26(2): 191-214. Doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.001.
85. Panqueva C, Rodríguez G. 1986. Amiloidosis sistémica en autopsias. Revisión de la casuística del Hospital San Juan de Dios de Bogotá. *Acta Med Colombia*; 11:87-91.
86. Pérez L, Milián F, Arriaga C, Romero C, Escartín M. 2007. Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. *Salud pública Méx* vol.50 n.4. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-36342008000400006>.
87. Picken MM. 2007. New insights into systemic amyloidosis: the importance of diagnosis of specific type. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 16:196–203.
88. Picken MM. 2007. Immunoglobulin light and heavy chain amyloidosis AL/AH: renal pathology and differential diagnosis. *Contrib Nephrol*; 153:135–155.
89. Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L. 1995. Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América. Washington, D.C.
90. Prusiner S. 1989. Scrapie prions. *Annual review of microbiology*; 43:345–74.

91. Puig KL, Manoca GD, Combs CK. 2015. Amyloid precursor protein mediated changes in intestinal epithelial phenotype in vitro. *PLoS ONE*, 10(3): e0119534, doi: 10.1371/journal.pone. 0119534..
92. Raven PH, Johnson G, Mason K, Losos J, Singer S. 2014. Proteins: Molecules with diverse structures and functions. *Biology*. 10° edición, AP ed., págs. 44-53. Nueva York, NY: McGraw-Hill.
93. Radostits, O, Gay C, Blood, D, Hinchcliff, K. 2002. Medicina Veterinaria: Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino, 9ª ed, *McGraw Hill Interamericana*, España pág. 576-577.
94. Reimann HA, Koucky RF, Eklund CM. 1935. Primary amyloidosis limited to tissue of mesodermal origin. *Am J Pathol*, 11:977.
95. Rijswijk M, Heusden C. 1979. The Potassium Permanganate Method. *Am J Pathol*. 97(1): 43–58.
96. Rodríguez F. 2019. Determinación cuantitativa de proteínas totales. Blog de Laboratorio clínico y biomedico. <https://www.franzmn.com/determinacion-cuantitativa-de-proteinas-totales/>
97. Rodríguez J, Hernández M. 2002. Actualización sobre la enfermedad de Alzheimer. *Revista Cubana de Medicina General Integral*.
98. Rodríguez M, Méndez M. 2018. El Proteosoma, sus Inhibidores y Toxicidad Cardíaca. *Rev Clín Esc Med*, 8(2):11-21.
99. Rogel L. y Tamayo R. 2007. Mortalidad en tres rebaños lecheros: estudio preliminar (1994-2004). *Arch. Med. Vet.* 39, No. 3, 255-260.
100. Seifi H, Karimi K, Movasseghi A. 1997. Renal Amyloidosis in Cattle: A Case Report in Iran. *J. Vet. Med. B* 44, 631-633. ISSN 0931-1793.
101. Sen S, Basdemir G. 2003. Diagnosis of renal amyloidosis using Congo redfluorescence. *Pathol Int*, 53:534-8.
102. Sen S, Sarsik B. 2010. Proposed histopathologic classification, scoring, and grading system for renal amyloidosis: standardization of renal amyloid biopsy report. *Arch Pathol Lab Med*. 134(4):532-44.

103. Serag AA, Altenbach C, Gingery M, Hubbell WL, Yeates TO. 2001. Identification of a subunit interface in transthyretin amyloid fibrils: evidence for self-assembly from oligomeric building blocks. *Biochemistry*. 40:9089–96.
104. Shrasburg S, Gal R, Gruys E, Perl S, Martin B, Kaplan B, Koren R, Nyska A, Pras M, Livneh A. 2005. An Ancillary Tool for the diagnosis of amyloid A amyloidosis in a variety of domestic and wild animals. *Vet. Pathol.* 42:132-139.
105. Singh G, Kumari N, Aggarwal A, Krishnani N, Misra R. 2007. Prevalence of subclinical amyloidosis in ankylosing spondylitis. *J Rheumatol.* 34:371-373
106. Sipe J, Benson M, Buxbaum J, Ikeda S, Merlini G, Saraiva M, Westermark P. 2014. Nomenclature 2014: Amyloid fibril proteins and clinical classification of the amyloidosis. 21 (4): 221-224.
107. Sipe JD, Ignaczak TF, Pollock PS, Glenner GG. 1976. Amyloid fibril protein AA: purification and properties of the antigenically related serum component as determined by solid phase radioimmunoassay. *J Immunol*, 116(4):1151–1156.
108. Taherdoost H. 2016. Sampling Methods in Research Methodology; How to Choose a Sampling Technique for Research. *International Journal of Academic Research in Management (IJARM)* Vol. 5, No. 2, Page: 18-27, ISSN: 2296-1747
109. Takahashi E, Tawamoto K, Matsui T, Inokuma H, 2009. Detection of serum amyloid A isoform in cattle. *J Vet Diagn Invest* 21:874-877.
110. Taniyama H, Yamamoto S, Sako T, Hirayama K, Higuchi H, Nagahata H. 2000. Systemic KAL Amyloidosis Associated with Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency. *Vet. Phatol.* 37:98-100.
111. Tatalovic M. 2008. Nueva enfermedad misteriosa de los Chitas, Amiloidosis amiloidea. *Science Now*.
<http://www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/nfondevila/amiloidosis.htm>
112. Timothy P, Kathryn E. 2000. Cervical Lymphadenopathy and Adenitis. *Pediatrics in review*, 21(12): 399- 405

113. Tojo K, Tokuda T, Hoshii Y, Fu X Higuchi K, Matsui T. 2005. Unexpectedly high incidence of visceral AA amyloidosis in slaughtered cattle in Japan. *J. Amyloid* ,12 (2):103-108.
114. Torres V, Alí G. 2014. Metabolismo de proteínas. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, v.41 La Paz. ISSN 2304-3768.
115. Troiteiro C, Rendon U, Muriel C, López R, González M, Pérez R. 2010. Ictericia colestásica como presentación de amiloidosis primaria. *Sociedad Andaluza de Patología Digestiva*. Vol. 33 Núm. 2.
116. Vaden SL, Brown CA. 2009. Glomerular disease. In: Bonagura JD, Twedt DC (eds). *Current Veterinary Therapy XIV*. Saunders-Elsevier. St Louis, 863-868
117. Villa A, Moreno B, Navarro A, Baselga JM, Pueyo R. 2018. Examen Físico-Químico. Albeitar. *Informativo Veterinario*. <https://albeitar.portalveterinaria.com/>
118. Vitela M.I., Cruz V.C., Ramos P.M. 2004. Identificación de las causas de desecho en 5 establos lecheros de Aguascalientes, México. *Téc. Pecu. Mex.* 42(3), 437-444.
119. Watanabe K, Uchida K, Chambers JK, Tei M, Shoji A, Ushio N, Nakayama H. 2014. Experimental transmission of AA amyloidosis by injecting the AA amyloid protein into interleukin-1 receptor antagonist knockout (IL-1raKO) mice. *Vet Pathol.*;52(3):505-12. doi: 10.1177/0300985814556154.
120. Wayne M, Alan H, Meek, P. 1997. *Epidemiología Veterinaria. Principios y Métodos*. Zaragoza, España: *Acribia*.
121. Westermark G, Westermark P. 2009. Serum amyloid A and protein AA: Molecular mechanisms of a transmissible amyloidosis. *Febs Letters* (583) pp. 2685-2690.
122. Wilson MR, Yerbury JJ, Poon S. 2008. Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity. *Mol Biosyst.* 4:42–52.

123. Win epi ver 2.0. 2006. <http://www.winepi.net/> Ignacio de Blas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.
124. Woldemeskel M. 2012. A concise review of amyloidosis in animals. *Veterinary Medicine International*. Vol. 2012, Article ID 427296, pp 1-11.
125. Yamada M, Kotani Y, Nakamura K, Kobayashi Y, Horiuchi N, Doi T, Suzuki S, Sato N, Kanno T, Matsui T. 2006. Immunohistochemical Distribution of Amyloid Deposits in 25 Cows Diagnosed with Systemic AA Amyloidosis. *J. Vet. Med. Sci.* 68(79): 725-729.
126. Yoshida T, Zhang P, Fu X, Higuchi K, Ikeda S. 2009. Amyloid. 16(1):25-31. doi: 10.1080/13506120802676831.

ANEXOS

ANEXO A. ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA



Detección de amiloidosis reactiva secundaria en bovinos sacrificados en el rastro municipal de Aguascalientes

Encuesta epidemiológica

I.-Datos generales

No. caso		Fecha:	
Sexo	H M	Edad	
ID		Procedencia	Ags. Nac. Importado
Inspección <i>ante mortem</i> (Clínica)	Sano	Función zotécnica	Carne
			Leche
	Enfermo		D propósito
	Muerto		Lidia
Raza		CC	

*CC Condición corporal (1, caquéxico a 5, obeso)

II.-Para animales clínicamente enfermos o muertos.

		Causas del desecho		
Nivel de proteínas en orina		Muerte		Metritis
		Caída		Distocia
		Retículo- pericarditis		Desplazamiento De abomaso
		Clostridiasis		Intoxicación*

	Gangrena		Nefritis	
	Leucosis		Hepatitis/Cirrosis	
	Neumonía		Peritonitis	
	Tuberculosis		Mordedura víbora	
	Otra			

*Urea o quelite

III.-Lesiones asociadas a la amiloidosis y/o a procesos crónicos

Hepatomegalia		Degeneración serosa de la grasa	
Esplenomegalia		Visibilidad de vasos linfáticos cardiacos	
Nefromegalia		Diarrea	
Adenitis mesentérica		Adenopatías	
Palidez de órganos		Caquexia	
Edema		Otras (describir)	

ANEXO B. TÉCNICA HISTOLÓGICA PARA MICROSCOPIA ÓPTICA.

Toma de muestras:

a) Tejidos

Los tejidos fueron tomados inmediatamente después del sacrificio. Se empleó bisturí o navaja nueva.

Por cada animal, se tomó una muestra de los siguientes órganos: hígado, nódulo mesentérico, riñones e intestino delgado; así como una de orina, se midió la concentración de proteínas utilizando tiras reactivas (DFI Cybow, tiras reactivas multi especie, Eurovet)

b) Orina

La orina se tomó en el momento en el que los trabajadores de rastro retiraron todas las vísceras para proceder a dividir el cuerpo del bovino, se extrae la vejiga completamente y la orina se deposita en un frasco debidamente lavado y etiquetado. La medición con la tira reactiva se realiza al momento de colocar la orina en el frasco y sin exceder los 5 minutos de su toma.

La tira reactiva mide la proteína en base a un indicador de colorante de pH, método que utiliza azul de bromofenol. Si la proteína (albúmina) está presente en orina, el pH aumenta y un resultado positivo en la prueba ocurre. Esta prueba es principalmente sensible a la albúmina y relativamente insensible para la detección de globulinas y proteínas de Bence-Jones (los resultados obtenidos se miden en miligramos/ decilitros).

Fijación:

Se fijaron con formalina buferada al 10% en proporción de 10:1 y se colocaron en recipiente debidamente identificado con el número de muestra y la fecha.

Preparación de la formalina buferada:

Agua destilada 900 ml.

Solución de formalina al 37% 100ml

Fosfato de sodio monobásico 4 g

Fosfato de sodio dibásico 6.5 g

Deshidratación, aclarado e Inclusión en parafina:

Se deshidrataron las muestras en baños sucesivos en soluciones crecientes de alcohol etílico utilizando el siguiente procedimiento:

- a) Agua destilada
- b) Alcohol etílico al 80 %
- c) Alcohol etílico al 96 %
- d) Alcohol etílico al 96 %
- e) Alcohol etílico al 96 %
- f) Alcohol etílico al 100 %
- g) Alcohol etílico al 100 %
- h) Alcohol absoluto (50%) - xilol (50%)
- i) Xilol 100%
- j) Parafina

La parafina diluida se coloca en dos recipientes dentro de la estufa. El primero recibe a las muestras embebidas en xilol; la parafina reemplaza el xilol de las muestras y se infiltra al interior de las mismas. Los otros dos recipientes de manera consecutiva reciben a los tejidos. El último de ellos sirve para contener a las muestras antes del proceso de formación de los bloques de parafina.

El molde se llena con parafina caliente pura; con una pinza caliente se toma una pieza de tejido y se orienta una de sus superficies (aquella que se pondrá en contacto con el filo de la navaja) se sumerge al interior del molde, en el que la parafina ha empezado a solidificarse y se le aplica una leve presión. Después los moldes se enfrían de inmediato (placa fría) para que la parafina se solidifique de manera homogénea.

Elaboración de cortes histológicos

El sistema de funcionamiento de los micrótomos consta de cuatro mecanismos principales:

Sujeción del bloque de parafina.

Sujeción de la navaja.

Obtención de los cortes empleando los siguientes pasos

- a) Se sujetó firmemente el bloque con el sistema de abrazaderas y la muestra orientada correctamente.
- b) Se alineo el sistema de sujeción de la navaja y el filo de la misma, con la superficie de corte del bloque.
- c) Desgastar la superficie del bloque de parafina hasta alcanzar el tejido y se tenga la certeza de abarcar toda el área que se desea seccionar.
- d) Marcar en el dial del micrótomo, el número de micrómetros de grosor que deben alcanzar los cortes; en este caso se utilizó un grosor de 3 micrómetros.
- e) Accionar la manivela que desplaza la abrazadera con el bloque de parafina para obtener los cortes (aislados o seriados). Obtenidos los cortes se recogen cuidadosamente con unas pinzas o pinceles finos.

Extensión y adhesión de los cortes al porta objetos:

Los cortes se extienden en un baño de flotación (agua destilada a 49 °C y grenetina).

Las secciones se depositan en el líquido procurando que la superficie brillante (aquella correspondiente al filo de la navaja) se ponga en contacto con el líquido caliente.

Las secciones se extienden aisladas o formando cintas, estas se recogen y adhieren a la laminilla de la misma forma; en el caso que se requiera recoger los cortes aislados, extendidos previamente como una cinta, deben separarse utilizando las mismas pinzas finas o agujas de disección.

Desparafinado de los cortes:

Se meten las laminillas con los tejidos adheridos a una estufa a 60°C durante 10 minutos para lograr deshacerse de la parafina y la coloración sea exitosa.

Se realizaron las tinciones correspondientes para posteriormente realizar el montaje de la laminilla.

Montaje:

Consiste en colocar sobre el corte histológico ya coloreado una delgada lámina de vidrio llamada cubreobjetos, el cual se adhiere con Entellan de la marca JT Baker.

ANEXO C. TINCIÓN COMPLETA PARA HEMATOXILINA-EOSINA.

En este paso es conveniente se respeta el tiempo de coloración que recomienda cada tipo de solución de hematoxilina. (Prophet *et al.*, 1995)

1. Xilol 10 minutos
2. Alcohol 100% 4 minutos
3. Alcohol 96% 2 minutos
4. Alcohol 96% 2 minutos
5. Lavado en agua destilada 5 minutos
6. Hematoxilina 4 minutos
7. Lavado en agua corriente 5 minutos
8. Eosina 30 segundos
9. Alcohol 96% 2 minutos
10. Alcohol 96% 2 minutos
11. Alcohol 100% 4 minutos
12. Xilol 10 minutos

ANEXO D. TÉCNICA COMPLETA PARA LA TINCIÓN ROJO CONGO

CONGO

Para esta tinción se emplea la técnica modificada de Rojo Congo del libro de Métodos Histotecnológicos de las Fuerzas Armadas (Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de Estados Unidos de América)

1. Xilol 2 minutos
2. Xilol 2 minutos.
3. Alcohol / xilol, (Alcohol al 96%) 2 minutos.
4. Alcohol al 100% dos minutos.
5. Alcohol al 100% 2 minutos.
6. Alcohol al 96% 2 minutos.
7. Alcohol al 96% 2 minutos.
8. Agua destilada.
9. Rojo Congo al 1% por 5 minutos (en agua destilada).
10. Agua destilada
11. Diferenciar en solución alcohólica alcalina (etanol al 50% + Hidróxido de Sodio al 1%) de 5 a 10 segundos.
12. Lavar en agua corriente.
13. Hematoxilina de Harris 5 minutos.
14. Lavado en agua corriente.
15. Alcohol ácido (Ácido clorhídrico) de 5 a 10 segundos.
16. Lavado en agua corriente.
17. Carbonato de litio de 5 a 10 segundos.
18. Alcohol al 96% 4 minutos.
19. Alcohol al 100% 4 minutos.
20. Alcohol / xilol, (Alcohol al 96%) 4 minutos.
21. Xilol 10 minutos.

ANEXO E. TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON

1. Desparafinizar los cortes.
2. Sumergir los cortes en solución fijadora de Bouin toda la noche a temperatura ambiente.
3. Lavar en agua corriente hasta que el agua se observe clara, después enjuagar con agua destilada.
4. Teñir en solución de hematoxilina de Weigherts durante 10 minutos.
5. Lavaren agua corriente durante 10 min, enjuagar con agua destilada.
6. Teñir en solución de fucsina ácida escarlata durante 15 minutos, enjuagar con agua destilada.
7. Diferenciar en solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 10 a 15 minutos.
8. Contrateñir con solución azul de anilina por 5 a 10 minutos, lavar con agua corriente hasta que se vea clara.
9. Diferenciar en ácido acético al 1% de 3 a 5 minutos.
10. Deshidratar con alcohol al 96% por 2 minutos.
11. Alcohol al 100% dos veces durante 2 minutos.
12. Xilol durante 4 minutos.

ANEXO F. TÉCNICA EMPLEADA PARA ESPECTROFOTOMETRÍA

La determinación de proteínas totales es útil para el monitoreo de cambios ocasionados por diversos estados de enfermedad. En condiciones patológicas como pérdidas renales, desnutrición, infecciones prolongadas, etc., suelen presentarse hipoproteinemias, mientras que en otras como mieloma múltiple, endocarditis bacteriana y hemoconcentración de diversos orígenes se observan hiperproteinemias.

Los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ión cúprico en medio alcalino, para dar un complejo color violeta con máximo de absorción a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra.

Condiciones de Reacción

Longitud de onda: 540 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro verde (520-560 nm).

Temperatura de reacción: 37^o C

Tiempo de reacción: 15 minutos

Volumen de muestra: 20 µl

Volumen de Reactivo A: 2,0 ml

Volumen final de reacción: 2,02 ml

PROCEDIMIENTO
 En tres tubos marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido), colocar:

	B	S	D
Calibrador / Suero Patrón	-	20 ul	-
Muestra	-	-	20 ul
Reactivo A	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml

Mezclar con varilla. Incubar durante 15 minutos a 37°C. Leer en espectrofotómetro a 540 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (520-560 nm) llevando a cero con el Blanco de Reactivo.

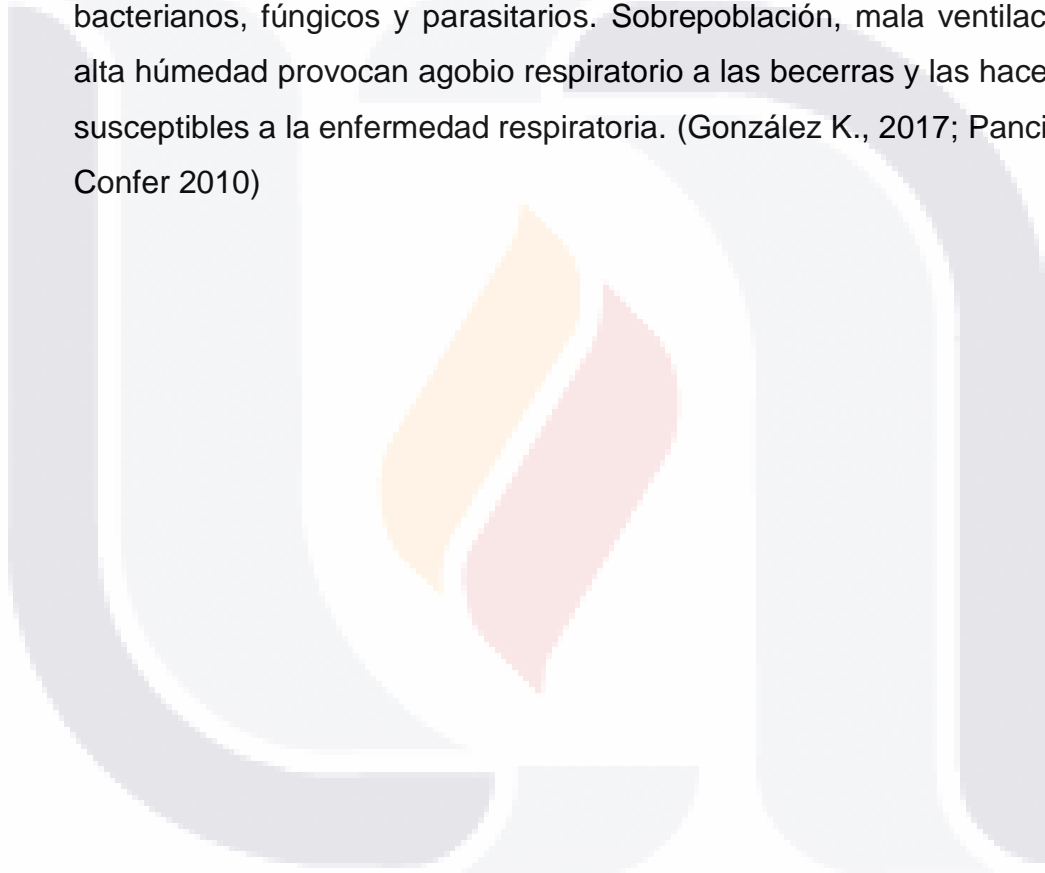


ANEXO G. DESCRIPCIÓN DE LESIONES Y/ O HALLAZGOS MACROSCÓPICOS DURANTE LA TOMA DE MUESTRAS.

- La linfadenomegalia es el agrandamiento visible o palpable de uno o más ganglios linfáticos superficiales (cervicales, supraclaviculares, axilares e inguinales) puede ser el primer indicio de una enfermedad en curso o de un síndrome clínico específico causado por agentes tanto infecciosos como no infecciosos (Osores *et al.*, 2004; Timothy y Kathryn 2000).
- El edema visceral signo clínico frecuente en muchas enfermedades y se manifiesta como una hinchazón de los tejidos blandos debida a la acumulación de líquido en el compartimento intersticial. Surge si se produce un desequilibrio entre las fuerzas que regulan el paso del líquido de un compartimento a otro. Si el paso de agua es abundante del compartimento intravascular al intersticial, aparece el edema. Esa extravasación de líquido puede responder a factores físicos o químicos, desde un incremento de la presión intravascular en la circulación de retorno, hasta un incremento de permeabilidad de la pared vascular o un descenso en los niveles de moléculas que mantienen el líquido intravascular (Clínica Universidad de Navarra).
- En la esteatosis la grasa pierde su opacidad y se convierte en un gel acuoso translúcido. Los factores de riesgo se pueden agrupar fundamentalmente en dos categorías: nutricionales y de manejo, aunque hay que tener también en cuenta una posible predisposición genética. Comúnmente se observa en vacas viejas, este incremento podría estar relacionado con alta producción de leche, un largo intervalo entre partos, etc. Otros factores de riesgo son la falta de espacio, una limpieza insuficiente, humedad elevada, calor o mala ventilación. Todos ellos favorecen la aparición de distintas patologías que generan un balance

energético negativo y propician la movilización de tejido adiposo, particularmente el desplazamiento de abomaso, la hipocalcemia, la retención de placenta, las mastitis y las metritis. Sucede rápidamente en casos de anorexia, la inanición o la caquexia. (Jiménez A.2016)

- La Neumonía es compatible con el Síndrome Respiratorio Bovino (neumonía, bronconeumonía, fiebre del transporte, pasteurelisis neumónica), ocasionado por diferentes agentes patógenos víricos, bacterianos, fúngicos y parasitarios. Sobre población, mala ventilación y alta humedad provocan agobio respiratorio a las becerras y las hace más susceptibles a la enfermedad respiratoria. (González K., 2017; Panciera y Confer 2010)



ANEXO H. PERMANGANATO DE POTASIO

Técnica de permanganato de potasio de Rijswijk y Heusden (1979)

Para realizar esta técnica, se emplean los siguientes pasos:

1. Permanganato de potasio al 5% 3 minutos.
2. Ácido sulfúrico al 3% 3 minutos.
3. Ácido oxálico al 5% 3 minutos.
4. Dos lavados en agua destilada.

