BAC
MODULO DIGITAL

Corpoica
El documento fuente se encuentra en
La Biblioteca Agropecuaria de Colombia

## ELEMENTOS BIBLIOGRAFICOS

AUTOR (ES): Mejía Arango, B.
AUTOR (ES) CORPORATIVO (S): Programa Univ. Nacional de Colombia / Inst. Colombiano Agropecuario, Bogotá (Colombia).
TITULO: Toxicología de la Bunchosia pseudonítida: estudio clínico-patológico de la cromatosis bovina
LUGAR DE PUBLICACION: Bogotá (Colombia)
AÑO DE PUBLICACION: 1984
PAGINAS: 146 p.

Sin resumen

# TOXICOLOGIA DE LA *Bunchosia pseudonítida*

## ESTUDIO CLINICO-PATOLOGICO DE LA CROMATOSIS BOVINA

TESIS

Presentada al Programa de Estudios para Graduados en Ciencias Agrarias UN - ICA

Por

BERNARDO MEJIA ARANGO

Como requisito parcial para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

Marzo, 1984

Bogotá, Colombia

# 1. INTRODUCCION

La incidencia de entidades patológicas de caracter tóxico que tienen como agentes etiológicos, principios de orígen vegetal, ha aumentado considerablemente en la última década debido quizá al mejor estudio y caracterización clinicopatológica de las mismas lo cual permite un diagnóstico más acertado.

En Colombia, en el área de la toxicología veterinaria, la fitotoxicología ha cobrado gran impulso, debido al incremento que se viene dando al estudio de la toxicologia en las facultades de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

La fitotoxicología plantea grandes problemas e interrogantes para la investigación, no solo por el hecho de que algunas plantas poseen principios tóxicos derivados de su propio metabolismo, sino por la asimilación y acumulación de productos químicos sintéticos empleados por el hombre para combatir plagas y enfermedades.

Dentro de un marco ecológico, las condiciones medioambientales desempeñan un papel importante como factor decisivo en la presentación de un problema de caracter fitotóxico.

En el área comprendida desde el sur del departamento del Tolima, hasta el norte y centro del departamento del Huila, los terrenos son pobres y escasos en pastos naturales y la precipitación pluvial es baja, En épocas de sequía, los bovinos y ovinos se ven obligados a consumir plantas propias de los bosques y rastrojos de la región.

Dentro de esta flora se encuentra la planta Mamei tomatillo (Bunchosia pseudonitida), cuya ingestión produce en los animales la excreción de orina de color azul, violeta o púrpura, pigmentación rosada o violeta de diversos tejidos incluyendo los dientes, y la presentación en una etapa más avanzada, de caquexia, ataxia del tren posterior y muerte. Dada la pigmentación de los tejidos, la entidad se denominó " Cromatosis."

El presente trabajo se planteó, una vez identificada la planta causante del problema y realizado su estudio fitoquímico, para tratar de establecer cuales procesos fisiológicos están alterados, de acuerdo con pautas dadas por experimentaciones anteriores, con el fín de establecer la patogénesis del problema.

# 2. REVISION DE LITERATURA

## 2.1 DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LA CROMATOSIS

La zona de Cromatosis está ubicada desde el sur del departamento del Tolima hasta el norte y centro del departamento del Huila, sobre ambas márgenes del Río Magdalena (72, 74, 102). Presenta una altura sobre el nivel del mar entre 400 y 700 metros, con una temperatura promedio de 29ºC (39, 40, 95) (Figura 1).

Los suelos de la zona son de tipo volcánico, pobres en material vegetal, existiendo pequeños bosques y rastrojos. La precipitación pluvial anual es de menos de 1.000 m.m. (23, 39, 40, 72). El pasto natural de la región es el Teatino (Boutelova filiformis) el cual escasea en épocas de sequía (40, 72, 74).

La Cromatosis afecta las ganaderías de dichas zonas, según casos reportados desde 1963 (18, 39, 66, 72, 95).

En 1969, en el municipio de Roncesvalles, Tolima, localizado a 2600 m.s.n.m. y temperatura promedio de 14ºC, se diagnosticó en bovinos una enfermedad con síntomas y lesiones iguales a las de Cromatosis descrita para clima cálido. (3)

## 2.2 RESEÑA HISTORICA SOBRE LAS INVESTIGACIONES DE CROMATOSIS

### 2.2.1 Primeros Reportes

Los primeros casos de Cromatosis fueron registrados en 1963,

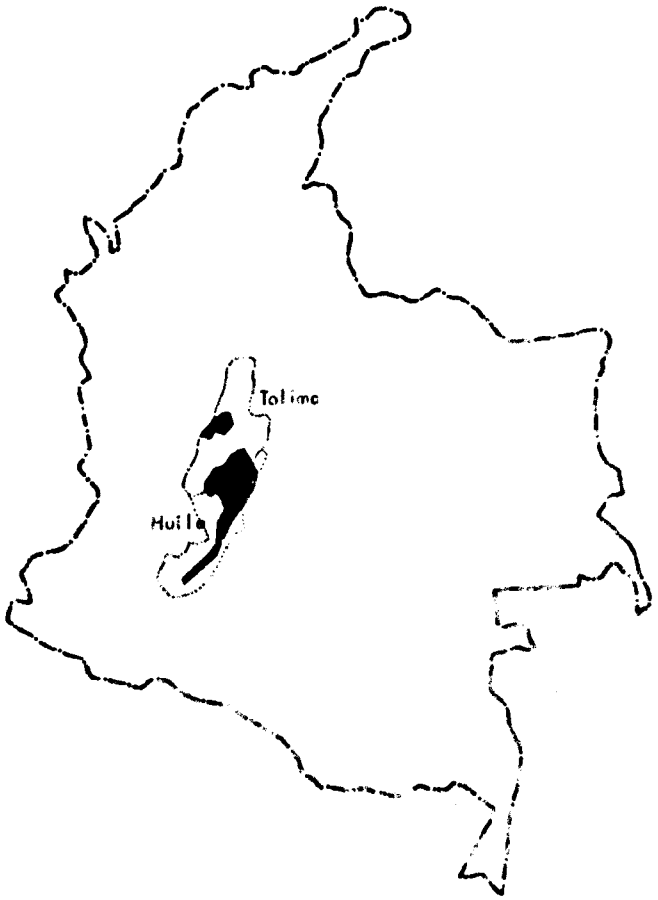



FIGURA Nº 1 Distribución de la cromatosis bovina en Colombia, departamentos del Huila y Tolima.*

* Tomado de Carta Ganadera, vol. 20 no. 6 1983

en el departamento del Huila (102).

Yepes, describió en 1977 un síndrome que afectaba al ganado bovino de todas las edades, caracterizado por signos clínicos de anoxia, incoordinación de miembros posteriores, emaciación, pigmentación rosada o azul de los dientes y mucosas explorables y excreción de orina de color rojiza, violeta o azul (23, 102).

El problema se designó con el nombre de Cromatosis, dada la pigmentación azul intensa de varios tejidos y líquidos orgáni - cos, principalmente el tejido elástico, el tejido fibroconectivo y la orina (18, 39, 66, 72, 95).

En 1978, se presentó en el departamento del Tolima, en regiones con similares características geográficas y medio ambientales a las del departamento del Huila (39, 66).

En 1979, se diagnosticó en el municipio de Roncesvalles, situado a 2600 m.s.n.m. con una temperatura de 14ºC.

### 2.2.2 Descripción clínica y anatomopatológica de los casos reportados.

La Cromatosis de clima cálido afecta bovinos y ovinos de diferentes edades, raza y sexo; también se conocen algunos casos en cabras (72, 74). En clima frío, solo se ha observado en bovinos adultos (3).

La frecuencia de presentación es mayor en la especie bovina, en la cual se ha caracterizado en mejor forma la enfermedad. Según lo observado hasta el momento, ésta tiene dos fases: la

primera comienza 10 a 20 días después de que los animales son situados en los potreros que contienen la planta problema y se manifiesta por la eliminación de orina rosada, azul o pardo oscura. En ocasiones los dientes presentan una pigmentación rosada, las mucosas generalmente toman una coloración violeta; los signos vitales y el estado de carnes son normales. En algunos casos se ha reportado una coloración rosada o azul de la leche (73, 74).

En la segunda fase se presentan alteraciones motoras de los miembros posteriores, emaciación, postración y muerte. Generalmente los animales nunca se recuperan luego que entran en decubito. Se presenta recuperación de los animales si son trasladados del potrero cuando se encuentran en la primera fase o cuando por causa del invierno se presenta una recuperación de los pastos naturales de la región. Esta recuperación se realiza en 10 a 15 días, pero cuando existe pigmentación de los dientes, generalmente persiste por varios meses (73, 74).

A la necropsia o en las canales de los mataderos, además de la coloración rosada de los dientes, se observa el tejido óseo de color violeta o azul, siendo más notorio en el periostio. El tejido elástico, fibroso, fascias, serosas y muscular liso de los diferentes órganos, presentan intensa coloración violeta. Siempre se encuentra el ligamento cervical de color azul, lo mismo que los demás tejidos elásticos (18, 74, 102).

Microscópicamente no se han hallado cambios significativos en ninguno de los órganos y tejidos estudiados (74).

Los análisis de patología clínica han demostrado que los valores hemáticos de transaminasas, nitrógeno ureico, proteínas

plasmáticas totales y calcio sérico se mantienen dentro de los niveles normales. No se han encontrado porfirinas (73, 74).

Además del cambio de coloración en la orina, se encuentra aumentado el urobilinógeno, en la mayoría de los casos ( 2,94).

2.2.3 Estudio de la Flora de Cromatosis y Experimentos preliminares de fitotoxicidad.

Desde un comienzo, el entonces denominado síndrome de Cromatosis se asoció con el consumo de una o varias plantas presentes en las zonas afectadas y por ello las investigaciones se encaminaron hacia el estudio y clasificación de la flora y la realización de pruebas biológicas con varias especies (2, 3, 21, 74, 95).

Del Río, Pinzón, Velásquez y Gutiérrez, entre 1968 y 1975 clasificaron 16 especies vegetales de la zona problema en el departamento del Huila y realizaron pruebas biológicas con extractos vegetales y de tejidos, con miras a reproducir experimentalmente el síndrome, sin ningún resultado positivo (18).

Entre 1975 y 1978, Peña y Echeverry completaron un total de 52 especies vegetales clasificadas, realizaron análisis clínicos a nivel de campo y pruebas biológicas con extractos alcohólicos y acuosos sin obtener resultados positivos (72).

En el departamento del Huila, en la zona de Cromatosis, se clasificaron las especies vegetales de la parte llana y de la parte de bosques y rastrojos, con una distribución porcentual aproximada de cada una de ellas (21, 74).

En las áreas llanas, la distribución aproximada en porcentaje de la flora, demostró que predomina el pasto teatino (Boutelova filiformis), le sigue en importancia el mastranto (Evolvolus sericeus) y cargadita (Stilosanthes humilis) (21, 74).

En los bosques y rastrojos, se encontró que porcentualmente predominaban las siguientes especies : mamei tomatillo (Bunchosia pseudonitida), arrayán (fam. Mirtaceae) y ondequera (Casearia corymbosa). Una observación importante que se realizó fue el hecho de que el mamei tomatillo se encontraba abundantemente ingerida por los bovinos. Otras plantas encontradas fueron : mosquerito (Croton leptostachyus), patillo (Banisteriopsis cornifolia), guásimo (Guazima ulmifolia), noro (Malphigia glabra) cruceto (Randia aculeata) y acituno o flor morado (Vitex cymosa) (21, 74).

Torres, Mejía, Echeverry y De Aguiar, en 1980 identificaron la especie vegetal denominada pateperro o mamei tomatillo (Bunchosia pseudonitida) como la especie vegetal causante del problema en clima cálido (39, 66, 74, 95).

En 1981, Aranda y Lozano realizaron estudios de clasificación taxonómica y distribución porcentual de 27 especies vegetales en dos ganaderias dedicadas a levante y ceba de novillos, localizadas en regiones quebradas y onduladas, cubiertas en su mayoría por pasto kikuyo (Pennisetum clandestinum), existiendo en las cimas y hondonadas de estas ganaderías pequeños bosques en las cuales predominan las siguientes especies arbóreas : mamei de tierra fría (Bunchosia armeniaca), cedro (cedrela), tachuelo (Solanum inopilum) y laurel comino (Aniba perutilis). Se encontró que el 30% de los arbustos y árboles correspondía a la especie mamei de tierra fría (Bunchosia armeniaca) y que

sus hojas estaban "ramoneadas" abundantemente por los bovinos. Esta observación condujo al descubrimiento de la Bunchosia armeniaca como la planta responsable de los casos de cromatosis en clima frío y cuya presentación se dió ocasionalmente, por el consumo de las hojas de la especie citada, que pertenece a la familia de las malpigiaceas, al igual que la Bunchosia pseudonitida (4).

### 2.2.4 Caracterización Epidemiológica

Peña, 1981, examinó 25 fincas de la zona de Cromatosis de clima cálido en dos épocas de verano, encontrando en 10 de ellas 456 bovinos clínicamente afectados por la enfermedad y el registro de 16 animales muertos en 1979. En ocho de las 10 fincas afectadas, el problema se presenta siempre en verano (73).

24 de las 25 fincas estaban dedicadas a la cría y explota - ción lechera, con un promedio de más de 35 años de establecidas (73).

La prevalencia instantánea para la entidad en el área problema fue de 6%, determinándose que el grupo de los toretes es el más afectado con un 19.9% y el menos afectado es el de las terneras, con una prevalencia instantánea del 0.9%. Se determinó que la prevalencia instantánea en las fincas problema es del 11.5% y que igualmente el grupo más afectado es el de los toretes con un 28.7% y el menos afectado es el de las terneras con un 1.6% (73).

La precipitación pluvial se presenta en dos períodos : el primero entre octubre y diciembre y el segundo puede variar de

marzo a mayo o de abril a junio. En ocasiones puede no presentarse uno de los períodos de lluvias (73).

Las fincas según el estudio, presentan buenas fuentes de agua durante el invierno, En verano, algunas de estas fuentes se secan y los animales tienen que desplazarse a grandes distancias, para satisfacer su necesidad de bebida (73).

Se determinó también que el manejo de las praderas es deficiente, observándose alto grado de enmalezamiento. En conjunto con la deficiencia de pastos naturales y artificiales en época de verano, constituyen un factor que obliga a los animales a consumir malezas de los bosques y rastrojos (73).

La capacidad de carga de los potreros es en promedio de 0.7 U.G.G. El manejo sanitario de la zona es aceptable, con prácticas de desparasitación y vacunación contra fiebre aftosa, carbón bacteridiano y sintomático y septicemia hemorrágica (73).

### 2.2.5 Reproducciones experimentales de la Cromatosis. Hallazgos clinicopatológicos.

El estado de Cromatosis se reprodujo experimentalmente en conejos y posteriormente en ovinos, los cuales desarrollaron una coloración rosada o azulosa de dientes y diversos tejidos conjuntivos principalmente de predominancia elástica como el ligamento cervical y la aorta, lo mismo que la pigmentación rojiza o azul de la orina (39, 66, 93, 94).

Alvarez y colaboradores, (1980), reprodujeron el estado de Cromatosis en bovinos (2).

2.2.5.1 Reproducción experimental en conejos

Se han realizado reproducciones experimentales en conejos empleando las dos especies vegetales :

- Bunchosia pseudonitida : Cromatosis de clima cálido.
- Bunchosia armeniaca : Cromatosis de clima frío.

Se utilizó la planta mamei - tomatillo (Bunchosia pseudonitida) en dos experimentos en los que se emplearon 14 conejos distribuídos en cuatro grupos. A estos conejos se les suministró en su dieta, de 5 a 20 gramos diarios de la planta problema. En esta especie animal se reprodujeron síntomas, signos y lesiones similares a los observados en bovinos con Cromatosis, en casos de ocurrencia natural, entre los 12 y 18 días de iniciado el experimento como son coloración rosada de los dientes; a los 15 días se presentó excreción de orina de color azul oscuro; entre los 18 y los 60 días, los tejidos subcutáneos, fascias, ligamentos, tejidos elásticos y superficie de los músculos presentaron coloración rosada o violeta o azul, de acuerdo con el grado de consumo de la planta (93).

Los exámenes de sangre e histopatológicos fueron siempre normales (93).

Con el empleo de la planta mamei de tierra fría (Bunchosia armeniaca) para la reproducción experimental de la Cromatosis se utilizaron 12 conejos adultos de razas Nueva Zelanda y Ruso Californiano, distribuídos al azar en cuatro grupos de tres conejos cada uno. A los tres primeros grupos les fueron

suministrados respectivamente, 60, 45 y 30 gramos de hojas del árbol (3).

Al séptimo día de iniciado el experimento, los animales que consumían la planta eliminaron orina pigmentada de color rosado, la cual posteriormente cambió a un color morado. Las encías y la cara interna de las orejas, a partir del décimo día presentaron una coloración violeta y los dientes comenzaron a pigmentarse de color rosado partiendo de la base, siendo más intensa la coloración en los conejos del grupo I. Los conejos de los tres primeros grupos tenían pigmentados los dientes de color rosado oscuro hacia el día 25 (3).

Los días 35 y 50, fue sacrificado un animal de cada grupo y se suspendió el suministro de la planta al resto de animales. A la necropsia todos los animales presentaron coloración rosada o violeta en los tejidos subcutáneos, músculos dorsolumbares, aorta, útero, vejiga, tendones rotulianos, metacarpianos y dedos (3).

A los conejos se les suspendió el consumo de la planta, y dejaron de eliminar orina oscura a los cuatro días. Se sacrificaron 40 días después de suspender el consumo de la planta, presentando todavía coloración rosada de sus tejidos (3).

2.2.5.2 Reproducción experimental de Cromatosis en ovinos

En esta especie solo se ha experimentado con la planta mamei - tomatillo (Bunchosia pseudonitida).

Se utilizaron nueve ovinos africanos distribuídos en tres grupos, sin tener en cuenta sexo ni edad; a cada animal del grupo I se le suministró en la dieta 5 gramos por kilo de peso vivo, de la planta problema. El grupo II recibió 10 gramos por Kg. y el grupo III se empleó como control. La alimentación consistió en pasto elefante (Pennisetum purpureum) picado, concentrado comercial y agua a voluntad (94).

A partir del cuarto día de iniciado el suministro de la planta problema, los ovinos que la estaban consumiendo comenzaron a eliminar orina de color violáceo, que variaba a vino tinto o azul oscuro. Estas coloraciones no eran constantes, ya que periódicamente se registraron tomas de orina de color normal, la cual al exponerse a la luz del sol o al aire se tornaban más oscuras. En estos animales se determinó aumento considerable de urobilinógeno urinario hasta de 12 U. Ehrlich. Entre los días 40 y 42, un animal del grupo I y uno del grupo II, presentaron incoordinación de miembros posteriores. En los ovinos del grupo II se presentó a partir del día 40 y hasta el día del sacrificio (día 45), una coloración rosada débil de los dientes (94).

Todos los animales que consumieron la planta presentaron coloración rosada o violeta de sus tejidos subcutáneos elásticos, aponeurosis, fascias, tendones, ligamentos, musculatura lisa y huesos, siendo más acentuada la coloración del ligamento cervical y de la arteria aorta. Un ovino del grupo II se sacrificó 10 meses después de suspendido el consumo de la planta, no encontrándose ningún tipo de pigmentación en sus tejidos (94).

2.2.5.3 Reproducción experimental de Cromatosis en bovinos

Al igual que con la especie ovina, solo se ha experimentado

en bovinos con la planta mamei - tomatillo (Bunchosia pseudonitida) para la reproducción experimental de la Cromatosis.

Alvarez y colaboradores, (1980) reprodujeron experimentalmente el estado patológico en bovinos (2).

Se emplearon tres bovinos cebú mestizo de doce meses de edad y de pesos iniciales entre 105 y 108 Kg. Fueron mantenidos estabulados y alimentados con heno de pasto angleton (Andropogon nodossus ), pasto elefante (Pennisetum purpureum) y agua a voluntad. Los animales números 1 y 2 recibieron con la dieta la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonitida) en cantidad de 5 g/Kg. de peso corporal y por día, durante 56 días el primero y 98 el segundo. El tercer bovino se utilizó como control y solo recibió la dieta citada, excluyendo la planta problema.

Se practicaron exámenes clínicos previos, que incluyeron la evisión de las mucosas explorables, bilirrubina sanguínea y exámenes parciales de orina. Posteriormente a la iniciación del consumo de la planta problema se realizaron exámenes con una periodicidad de una semana. Se comprobó la alta palatabilidad de la planta. A partir del cuarto día de iniciado el consumo, los bovinos empezaron a eliminar orina oscura, con tonalidades de rojo hasta azul oscuro o vino-tinto. Al igual que en experimentaciones anteriores con ovinos, se registró un aumento considerable del urobilinógeno urinario. No se observaron alteraciones en los niveles de bilirrubina sanguínea que explicaran el aumento de urobilinógeno urinario registrado (2).

En la tercera semana se observó coloración rojiza en el pelaje que entraba en contacto con la orina igualmente las mucosas explorables tomaron una tonalidad rosado azulosa, hasta

adquirir un color violeta. Una tonalidad similar se observó en la piel de las orejas y la región de la ubre (2).

Durante el experimento, los bovinos 1 y 2 perdieron 11 y 13 Kg. de peso corporal respectivamente, observándose al mismo tiempo disminución de la calidad del pelaje; el bovino control aumentó 3 kg. de peso. El bovino 2 presentó ataxia en el período final de la experimentación (2).

En la necropsia, los bovinos 1 y 2 presentaron pigmentación azul o violeta del tejido subcutáneo y de las fascias y aponeurosis de los músculos abdominales. La pigmentación fue más acentuada en tejidos subyacentes de órganos de las cavidades torácicas y abdominal. La pigmentación más oscura se observó a nivel de órganos con abundancia de tejido elástico, como el ligamento cervical en sus dos porciones, en vasos sanguíneos arteriales de gran calibre como la aorta y en el bazo. Las meninges del sistema nervioso central también presentaban grado considerable de pigmentación violeta. El bovino control no presentó ningún cambio de coloración en sus tejidos (2).

### 2.2.6 ESTUDIO FITOQUIMICO DE LA PLANTA MAMEI-TOMATILLO (*Bunchosia pseudonitida*).

#### 2.2.6.1 Análisis Físico químico del pigmento.

A partir de tejido y orina de animales afectados de Cromatosis de clima cálido, se aisló un pigmento, estableciéndose su gran polaridad y su contenido de carbono, hidrógeno y nitrógeno. La caracterización química del compuesto fue positiva para insaturación activa, grupos amino primario, grupos hidróxilo. Por el ensayo de ignición se obtuvo un residuo permanente

de reacción alcalina el cual corresponde a un metal alcalino terreo. Ha sido difícil purificar el compuesto por su grado de insaturación, lo que hace que tome con facilidad el oxígeno del aire y se oxide (23).

### 2.2.6.2 Análisis Fitoquímico de la planta Mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonitida)

Cano y Mendoza (1982), realizaron el estudio fitoquímico empleando hojas de la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonitida); un estudio fitoquímico preliminar permitió confirmar la presencia de alcaloides y encausar el estudio para tratar de aislarlos e identificarlos (9).

La siguiente tabla muestra los resultados de la marcha fitoquímica :

TABLA 1. Compuestos químicos aislados de la planta (Bunchosia pseudonitida)

| Compuesto | Método | Resultado |
|---|---|---|
| Antraquinonas | | - |
| Flavonoides | | - |
| Fenoles libres | | + |
| Alcaloides | R. Reineckato | ++ |
| | Mayer | ++ |
| | Valser | +++ |
| | Dragendorf | +++ |
| Esteroides | Lieberman | + |
| Saponinas | Espuma | + |
| | Hemólisis | - |

| | | |
|---|---|---|
| Taninos | Gelatina - sal | - |
| Heterósidos cardio- | | |
| tónicos y sesquiterpen | | |
| lactonas | Raymond | - |
| | Legal | - |
| | Killer - Killiani | - |
| | Hidroxamato | - |

- : Negativo

+ : Escaso

++ : Abundante

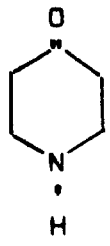
+++ : Muy abundante

Del aislamiento e identificación de compuestos según el estudio fitoquímico se obtuvieron :

- Un compuesto denominado BP1, posiblemente corresponde a un triterpeno tetracíclico monohidroxilado para el cual no se pudo proponer una fórmula química (9).

- Un compuesto denominado BP2, con una fórmula $C_6H_{14}O_6$ correspondiente a un polihidroxialcohol, el galactitol (9).

- Un compuesto BP3, con una fórmula condensada $C_5H_7ON$ correspondiente a 2,3-dehidro-4-piperidona, cuya fórmula estructural es :



Con la planta mamei de tierra fría (Bunchosia armeniaca) no se ha adelantado ningún estudio fitoquímico, como tampoco con tejidos u orina de animales afectados. No se descarta la posibilidad de que presenten características químicas similares a las de la Cromatosis producida por Bunchosia pseudonítida.

## 2.3 MECANISMOS PROPUESTOS PARA LA PATOGENESIS DE LA CROMATOSIS

Establecida la relación entre el consumo de las plantas mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida) y la Cromatosis de clima cálido, mamei de tierra fría (Bunchosia armeniaca) y la Cromatosis de clima frío se sugiere que las dos plantas contienen fracciones tóxicas pigmentarias similares, que al ser ingeridas por los animales, pueden actuar de una manera similar.

El aumento de urobilinógeno urinario registrado en los experimentos en bovinos y ovinos, se descarta como consecuencia de una consecuencia de hemólisis intravascular, ya que no se detecta hemoglobinuria. Tampoco se presenta daño hepático que implique un proceso de tal naturaleza, dado que los análisis de transaminasas y los análisis histológicos son normales (2).

Se considera la posibilidad de una interferencia enzimática en la síntesis de HEME, en una etapa posterior a la formación de porfobilinógeno, posiblemente en el paso de porfobilinógeno a uroporfirinogeno I y coproporfirinógeno III, con lo cual el porfobilinógeno originaría niveles hemáticos suficientes para sobrepasar el umbral renal y ser detectado en la orina como Ehrlich positivo (2, 23).

Por lo anterior, cabría la posibilidad de un caso de porfiria,

debido al color de la orina y los tejidos orgánicos, la cual cursaría sin fotosensibilización, como se sabe puede ocurrir en algunos casos (9, 84).

Las porfirias son condiciones patológicas en diferentes especies, en las cuales la rata de síntesis de porfirinas y de otros metabolitos del HEME están aumentados ampliamente, hasta el punto que sobrepasan el umbral renal y se excretan por la orina a la cual imparten una coloración pardo rojiza, púrpura o vino tinto (9, 35, 53, 84).

Las porfirias se clasifican según la etiología pudiendo ser congénitas o adquiridas; también según el sitio donde se origina el desórden metabólico, pudiendo efectuarse éste en células hepáticas o de la médula ósea (9, 12, 84).

Generalmente aunque son excepciones, los niveles elevados de metabolitos de la fracción HEME, constituyen la causa de alteraciones patológicas como son la pigmentación rosada de tejidos, excreción de orina de color rojizo y neuropatía periférica entre otras. De los casos de porfiria, muchos cursan con fotosensibilización, ya que existen isómeros de las porfirinas que son sustancias fotodinámicas. El síndrome presentado depende del tipo de porfiria y de las características químicas de las porfirinas u otros metabolitos producidos en exceso (9, 12, 24, 84).

Las características clinicopatológicas de las porfirias en humanos se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2. Características clínico - patológicas de las porfirias en humanos *

Tomado de "The metabolic basis of inherited disease", 1978

| | Congénita Eritropoyética | Aguda Intermitente | Coproporfiria hereditaria. | Variegata. | Cutánea tardía | Protoporfiria |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Coloración rosada roja o pardo-rojiza de la orina | X | X | | | X | |
| Huesos oscuros | X | | | | | |
| Dientes rosados | X | | | | | |
| Fotosensibilidad | X | | | X | X | X |
| Manifestaciones neurológicas | | X | X | X | | |
| Alteraciones en glóbulos rojos. | X | | | | | |
| Dolor abdominal | | X | X | X | | |
| Caquexia | | X | | | | |
| Hipertricosis | X | | | | X | |
| Fluorescencia en eritrocitos | X | | | | | X (Reticulocitos) |
| Fluorescencia hepática | | | X | | X | |
| Fluorescencia plasmática | | | | X | | |

Las características observadas en los casos de Cromatosis, permiten plantear la hipótesis de que exista un caso de porfiria sin fotosensibilización, desencadenada por compuestos químicos contenidos en la planta Bunchosia pseudonítida.

De los diferentes tipos de porfirias clasificadas hasta la fecha, se han reportado casos de porfiria congénita eritropoyética en bovinos, similar en cuanto a sus manifestaciones clínicas a la de humanos. Otras especies afectadas son los cerdos, zorras y un caso reportado en un gato (4, 27, 37, 84).

Otro mecanismo de patogénesis propuesto sería : un alcaloide preformado sería ingerido con la planta (podría ser la 2, 3-dehidro-4-piperidona). Por su misma actividad biológica y la acción de las enzimas y microorganismos del tracto digestivo, se oxidaría tornandóse violáceo, pasando luego a la sangre y tejidos y entrando a ser parte de ellos en forma estructural, teniendo en principio mayor afinidad por los tejidos elásticos. Al iniciarse la saturación de los tejidos (3 a 4 días), el alcaloide se eliminaría vía renal, obteniéndose orina que en contacto con el aire y expuesta a la luz solar, se haría más oscura. Esta sustancia por si misma podría dar reacción Ehrlich positiva falsa (92).

# 3. MATERIALES Y METODOS

## 3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACION

En el presente experimento se utilizaron seis ovinos Rommey Marsh hembras adultos, procedentes de la Granja San Jorge, ubicada en el municipio de Soacha, departamento de Cundinamarca a 2600 m.s.n.m. De los 6 animales, cuatro fueron sometidos al consumo de la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonitida) durante un período de 45 días; los dos ovinos restantes fueron empleados como controles.

Los animales permanecieron durante el tiempo de experimenta - ción, en las instalaciones del Centro de Diagnóstico Veterinario del ICA en la ciudad de Ibagué a una altura de 1.110 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 23ºC y una precipitación pluvial de 1.802 m.m. anuales.

Durante un período previo de 30 días se establecieron las condiciones fisiológicas de los animales, mediante la realización de estudios clínicos y la determinación de los parámetros descri- tos posteriormente y los cuales se observaron durante el tiempo de experimentación.

Los animales del grupo problema fueron alimentados con pasto elefante (Pennisetum purpureum) picado, como dieta básica con la cual se administró la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida) en la proporción de 5 gramos de hojas de la misma, por kilogramo de peso corporal y por día.

Los dos ovinos controles recibieron únicamente pasto elefante picado. Ambos grupos se les suplementó la ración con sal mineralizada y dispusieron permanentemente agua a voluntad.

Los ovinos fueron esquilados completamente; permanecieron estabulados durante el tiempo de experimentación, con exposiciones diarias de aproximadamente 4 horas a la luz solar para observar posibles efectos de fotosensibilización, según los planteamientos propuestos en la revisión de literatura.

## 3.2 TOMA DE MUESTRAS Y ANALISIS CLINICOS

Según los requerimientos de los análisis y descritos posteriormente, se tomaron periódicamente y en forma previa y posterior a la iniciación del consumo de la planta problema, las siguientes muestras :

- Orina : recolectada en frascos ambar, tomada directamente de la vejiga urinaria mediante sondeo intravesical. Las muestras de orina fueron procesadas inmediatamente en todos los casos.

- Sangre : por punción de la vena yugular, en recipientes con y sin anticoagulante. Se empleó como anticoagulante E.D.T.A. en la proporción de 2 gotas por cada 5 c.c. de muestra. También se empleó heparina* como anticoagulante, en la proporción de 0.03 c.c. para 5 c.c. de muestra. La sangre obtenida sin anticoagulante se dejó en reposo durante 30 minutos y se centrifugó luego a 2.000 g. durante 10 minutos para obtener suero, el cual se procesó inmediatamente o fue congelado para posteriores determinaciones.

---

*Producto comercial : Liquemine. Lab. Roche

En forma previa y posterior al suministro de la planta problema, se realizaron las siguientes determinaciones :

HEMOGRAMAS : recuentos totales y diferenciales de glóbulos blancos, recuento total de glóbulos rojos, hematocrito, hemoglobina, hemoglobina corpuscular media, concentración media de hemoglobina corpuscular.

Para los hemogramas se empleó el método fotoeléctrico de Coulter-Counter*. Las determinaciones se realizaron con una periodicidad de 7 días durante el período previo y durante los 45 días posteriores a la iniciación del consumo de la planta problema.

De cada muestra de sangre se elaboraron extensiones, tanto para recuentos celulares y observación de la morfología celular, como para detectar una posible fluorescencia de los glóbulos rojos ante la luz ultravioleta, una vez iniciado el consumo de la planta.

PRUEBA DE VAN DEN BERGH : con el fín de establecer el orígen de las alteraciones de los niveles de urobilinogeno urinario, observadas en experimentaciones anteriores, se realizaron pruebas de funcionamiento hepático, determinando pigmentos biliares séricos.

DETERMINACIONES DE GAMMA-GLUTAMIL TRANSFERASA : Se empleó por ser una prueba para establecer el funcionamiento hepático en forma más específica.

---

* Coulter Electronics, Inc. Hialea, Fla. USA.

METABOLITOS DEL HEME : La relación con una porfiria se determinó mediante el análisis de porfirinas y compuestos intermediarios de la vía metabólica del HEME como sigue : determinación de ácido delta - aminolevulínico en la orina según el método de Tomokuni y Ogata (1972) (86). Determinaciones cuantitativas de porfobilinógeno en la orina según Schwartz (1960) y Morre y col. (1960) (82).

Se realizaron pruebas tamiz y determinaciones cuantitativas de coproporfirinas y uroporfirinas en orina según las técnicas de Fernández y col. (1966) y Scott y col (1967) (82). Estas pruebas analíticas fueron estandarizadas en los laboratorios del Centro de Diagnóstico Veterinario del ICA de la ciudad de Ibagué, Departamento de Química y Suelos de la Universidad del Tolima, Laboratorio Clínico de la Clínica Minerva y Hospital Federico Lleras de la ciudad de Ibagué.

Los análisis se realizaron en tres oportunidades antes de la iniciación del consumo de la planta problema, con intervalos de 15 días con el fín de establecer los niveles de estos compuestos en los ovinos de experimentación. Desde el día 1 del consumo de la planta problema, hasta el día 24, las determinaciones se realizaron con intervalos de aproximadamente 4 días, con el fín de observar el comportamiento de estos compuestos una vez iniciado el consumo de la planta y establecer la posible relación con las variaciones en la coloración de la orina. Desde el día 24 hasta la finalización del experimento, se realizaron con una periodicidad de aproximadamente 7 días.

ANALISIS URINARIOS COMPLEMENTARIOS : Se realizaron mediante el empleo de tiras reactivas Combur-8-tes-U, empleando en forma complementaria la prueba de

Ehrlich para determinación de urobilinógeno urinario, además del análisis del sedimento urinario. Los análisis urinarios comprendieron las siguientes determinaciones : nitritos, densidad, pH, bilirrubina, urobilinógeno, cuerpos cetónicos, glucosa, hemoglobina.

DETERMINACIONES SERICAS DE HIERRO, COBRE : Se realizaron mediante técnicas de la casa Boehringuer Mannheim, estandarizadas en los laboratorios del L.I.M.V. de la ciudad de Bogotá.

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS VALORES DE PORFIRINAS : Para analizar si existe alguna diferencia importante en los valores de uroporfirinas y coproporfirinas tanto en el grupo problema como en el grupo control, en relación con el consumo de la planta, se realizó un diseño completamente al azar, con un arreglo factorial de orden 2 x 2. Los factores que se tuvieron en cuenta fueron :

- Factor A : grupo control y grupo problema.
- Factor B : consumo y no consumo de la planta.

Hipótesis : se denotó como $H_0$ la hipótesis nula y como $H_1$ la hipótesis alternativa. Las hipótesis a probar para cada uno de los factores fueron :

1. $H_0$ : el promedio de los niveles de uroporfirinas en el grupo control, es igual al promedio de los niveles de uroporfirinas en el grupo problema, contra :

   $H_1$ : El promedio de los niveles de uroporfirinas en el grupo control se comporta diferente.

2. $H_o$ : El promedio de los niveles de uroporfirinas cuando no hubo consumo de la planta problema, se comporta igual que cuando si hubo consumo de la planta, contra :

   $H_1$ : El promedio de niveles de uroporfirinas, cuando no hay consumo se comporta diferente a cuando hay consumo.

3. $H_o$ : El promedio de los niveles de uroporfirinas, teniendo en cuenta el factor A (grupo control y grupo problema) y el factor B (consumo y no consumo) se comporta igual contra :

   $H_1$ : El promedio de los niveles de uroporfirinas se comporta diferente teniendo en cuenta los dos factores.

Para análisis del comportamiento de los niveles de coproporfirinas, se plantearon las mismas hipótesis, teniendo en cuenta los mismos factores y el diseño empleado fue el mismo.

Para tomar una decisión respecto de las hipótesis anteriormente planteadas, se realizó un análisis de varianza, el cual nos proporciona los cálculos necesarios para realizar una prueba F, la cual permite rechazar $H_o$ si el F hallado por medio del análisis de varianza es mayor o igual que un F que se encuentra previamente tabulado.

En caso de rechazo de alguna de las hipótesis nulas planteadas, se realizó un análisis de Duncan, para poder determinar el grupo que tiene un comportamiento diferente, bien sea en uroporfirinas o en coproporfirinas. Este análisis de Duncan se realizó calculando la amplitud límite significativa, la cual se

comparó con la diferencia absoluta de los promedios de interés, con rechazo de la $H_o$ planteada si la diferencia absoluta fuere mayor o igual que la amplitud límite significativa.

El nivel de significancia que se utilizo a través del análisis fue del 5%.

## 3.3 SACRIFICIO Y NECROPSIA DE LOS OVINOS

Los ovinos se sacrificaron el día 45 luego de haber iniciado el consumo de la planta problema, mediante electrocusión; se practicó la necropsia registrando los cambios macroscópicos.

## 3.4 ANALISIS HISTOPATOLOGICOS E HISTOQUIMICOS

Se tomaron muestras de los siguientes tejidos : cerebro, cerebelo, médula espinal a diferentes niveles, nervios periféricos, músculos esquelético y cardíaco, aorta, ligamento cervical, hígado, riñón, intestino grueso y delgado, páncreas, adrenales, pulmones, piel y médula ósea.

Las muestras fueron incluídas en solución fijadora de formalina al 10% bufferada, para realizar los análisis histopatológicos e histoquímicos.

# 4. RESULTADOS Y DISCUSION

## 4.1 OBSERVACIONES SOBRE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Durante el tiempo de experimentación se registró un consumo completo de la ración de la planta mamai - tomatillo (Bunchosia pseudonítida).

Hacia las 24 horas de iniciado el consumo de la planta problema, los ovinos que la consumieron, iniciaron la excreción de orina de color amarillo oscuro en diferentes tonalidades según se observa en la figura No. 2 (izquierda), en comparación con la orina de los dosovinos controles, figura No. 2 (derecha).

La orina excretada por los dos animales del grupo problema cambió de coloración, adquiriendo una tonalid ligeramente verdosa o azul, oscureciéndose en presencia de la luz o el aire, por lo cual se hizo necesaria su recolección en recipientes de color ambar y con tapa.

La coloración de la orina de los animales del grupo problema fue adquiriendo progresivamente una tonalidad café, la cual cobró el máximo de intensidad hacia el día 11 de iniciado el consumo de la planta (figura Nº 3) y regresó hacia su coloración normal hacia el día 18 de iniciado el consumo de la planta problema.

A partir del día 19 de iniciado el consumo de la planta, la orina de los animales del grupo problema fue adquiriendo

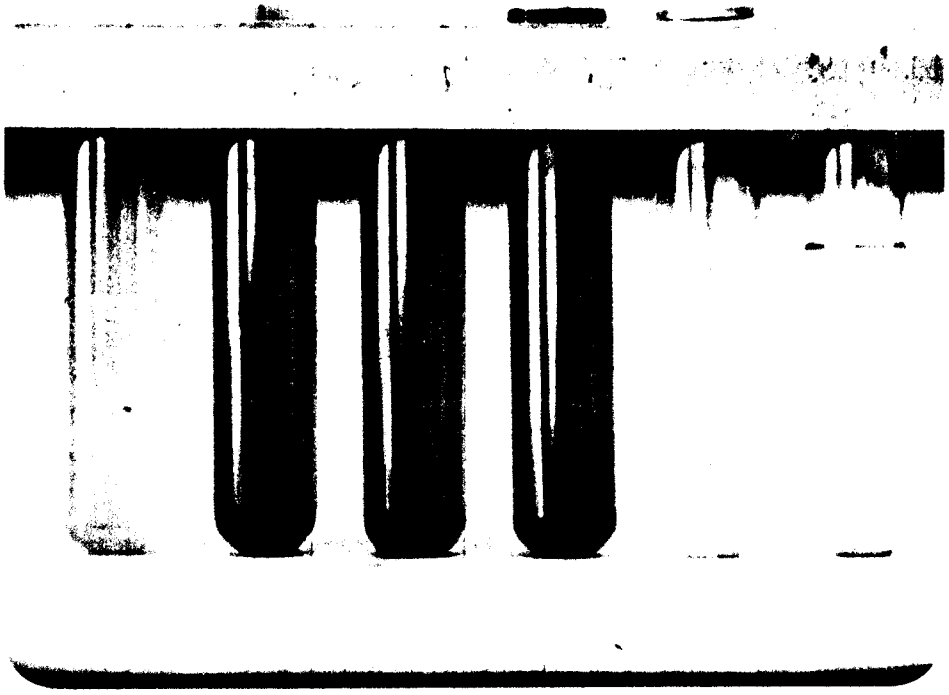


FIGURA Nº 2. Cromatosis. Reproducción experimental en ovinos.

Coloración de la orina de los cuatro ovinos del grupo problema (izquierda), en comparación con la orina de los controles (derecha), a las 24 horas de iniciado el consumo de la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida).

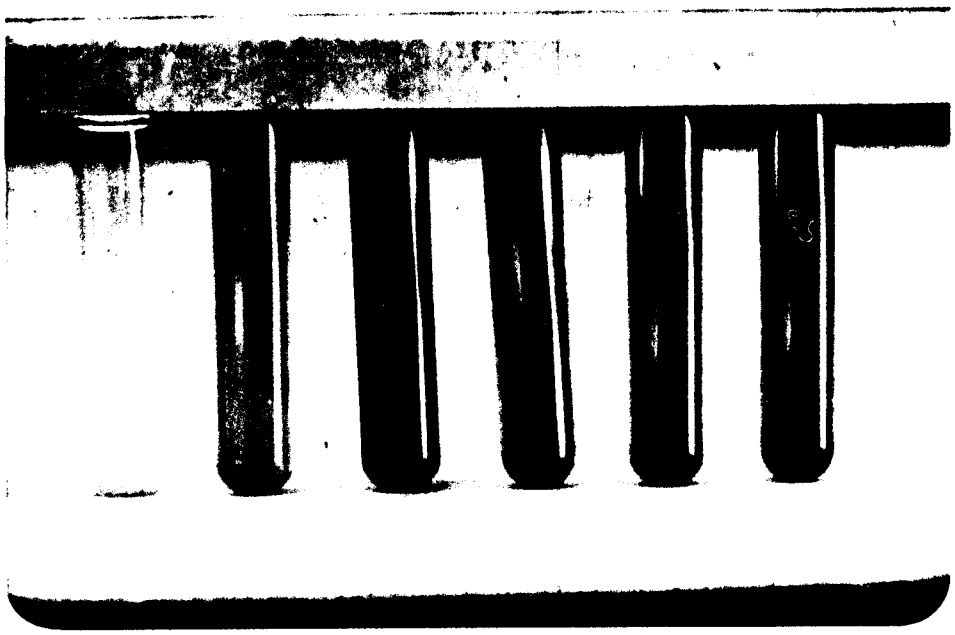


FIGURA Nº 3. Cromatosis. Reproducción experimental en ovinos.

Tonalidad parda de la orina de los cuatro ovinos del grupo problema (derecha), en comparación con la orina de los controles (izquierda) el día 11 de iniciado el consumo de la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida).

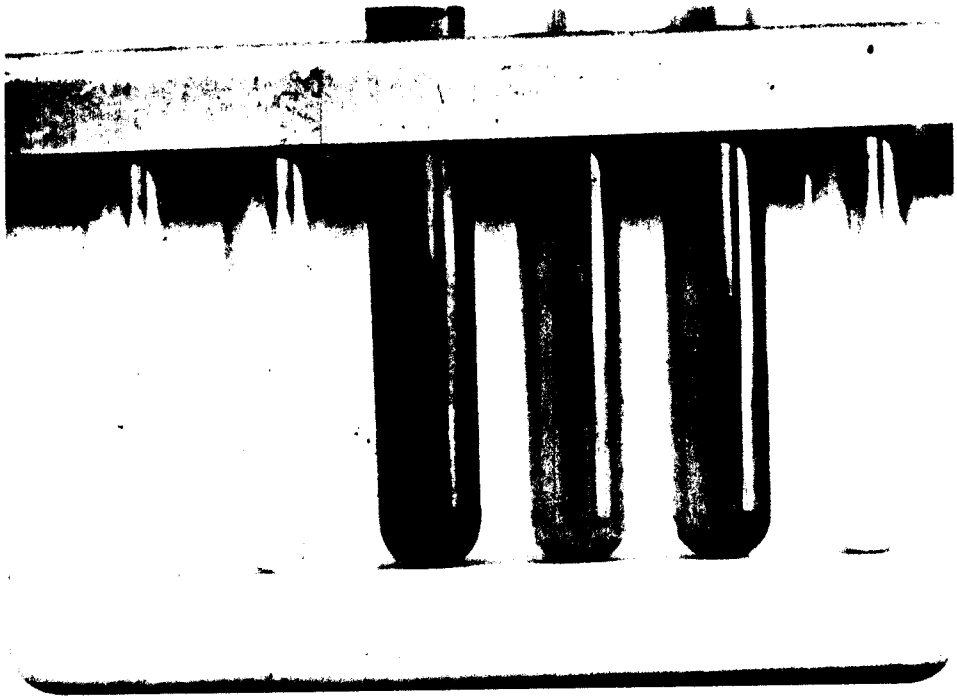


FIGURA Nº 4. Cromatosis. Reproducción experimental en ovinos.

Coloración púrpura de la orina de los cuatro ovinos sometidos al consumo de la planta mamei-tomatillo (Buncho-sia pseudonítida) (derecha) en comparación con la orina de los controles (izquierda), entre los días 22 a 35 de iniciado el consumo de la planta.

progresivamente una tonalidad pardo-rojiza; durante los días 22 a 35 adquirió una tonalidad púrpura (figura Nº 4) y posteriormente regresó en igual forma a la coloración inicial, la cual se hizo completamente normal hacia los días 43 y 44 de iniciado el consumo de la planta problema.

Con excepción de los días en que la coloración de la orina fue normal, es decir similar a la orina de los animales del grupo control, la orina de los ovinos del grupo problema presentó una reacción Ehrlich altamente positiva (figura Nº 5).

El pelaje de los animales del grupo problema, al entrar en contacto con la orina, presentó a partir del día 20 de iniciado el consumo de la planta, una coloración azul - rojiza (figura Nº 6).

No se desarrolló una coloración violácea de las mucosas explorables. Los dientes de los ovinos del grupo problema presentaron una tonalidad rosada muy tenue a partir del día 40 de iniciado el consumo de la planta. A través de la piel de las orejas se pudo apreciar una coloración azul intensa, debido a la pigmentación del cartílago elástico del pabellón auditivo (figura Nº 7).

No se registraron reacciones cutáneas ante la luz solar.

A partir del día 20 de iniciado el consumo de la planta, se presentó ataxia ligera de las extremidades posteriores en los ovinos del grupo problema aparentemente causada por contracciones de carácter tónico pues los animales tenían cierta dificultad para ejercer movimientos de flexión de los miembros posteriores. Esta ataxia casi imperceptible no evolucionó y

FIGURA Nº 5. Cromatosis. Reproducción experimental en ovinos.

Reacción Ehrlich positiva de la orina de los ovinos del grupo problema (izquierda). Obsérvese la reacción negativa de los ovinos controles (derecha).

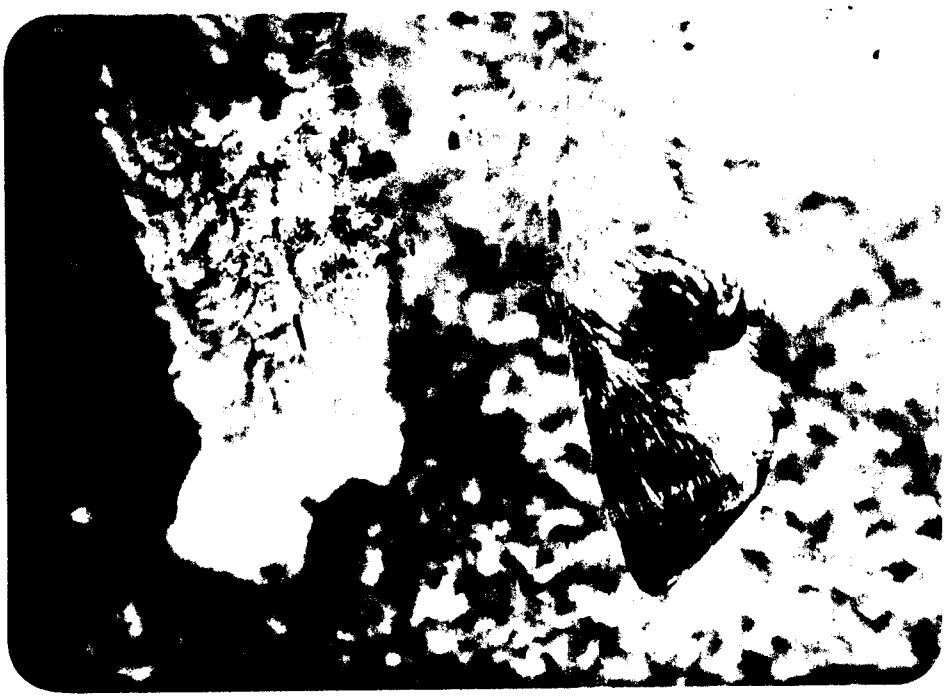


FIGURA Nº 6. Cromatosis. Reproducción experimental en ovinos.

Obsérvese la pigmentación del pelaje que entra en contacto con la orina, en los ovinos que consumieron la planta mamei- tomatillo (Bunchosia pseudonítida).

FIGURA Nº 7. Cromatosis. Reproducción experimental en ovinos.

Se aprecia a través de la piel, la pigmentación del cartílago elástico.

se registró hasta el día 45 en que fueron sacrificados los animales.

Las observaciones hasta aquí realizadas concuerdan con los experimentos anteriores en los cuales se reprodujo la Cromatosis en ovinos (94) y bovinos (2).

## 4.2 RESULTADOS Y DISCUSION DE LOS ANALISIS CLINICOS

Los principales interrogantes que se plantearon en experimentaciones anteriores y los cuales no pudieron ser esclarecidos fueron los siguientes :

- Causa o causas del aumento de urobilinógeno de la orina.
- Coloración violácea, parda o púrpura de la orina.
- Pigmentación de diferentes órganos y tejidos de una coloración rosada o violeta.
- Ataxia de las extremidades posteriores.

### 4.2.1 Reacción Ehrlich Positiva. Prueba de Van Den Bergh.

Con excepción de los días en que la orina presentó coloración normal, siempre se presentó reacción Ehrlich altamente positiva (Figura 5).

El reactivo de Ehrlich empleado en los análisis cualitativos rutinarios de la orina, revela la presencia de urobilinógeno (17, 25, 101).

Este pigmento de la orina, representa un grupo de sustancias y no una entidad química por separado (17).

Cuando los glóbulos rojos son destruídos en el sistema fagocitario mononuclear, la bilirrubina formada a partir de esta ruptura se une a una fracción de la albúmina en la sangre circulante. Esta bilirrubina penetra a las células hepáticas en las cuales se conjuga a ácido glucorónico (25). La mayor parte de esta bilirrubina es secretada con la bilis al intestino, una fracción muy pequeña pasa al torrente circulatorio (17, 25).

La mucosa intestinal es relativamente impermeable a la bilirrubina conjugada, luego no debe reabsorberse y pasar al torrente circulatorio (25).

En la luz del intestino, la bilirrubina conjugada es transformada en urobilinógeno por acción bacterial, el cual si pasa fácilmente la mucosa intestinal y gana la circulación (25).

De lo anterior se deduce que el urobilinógeno es un componente normal de la orina, dentro de ciertos valores límites, lo cual no debe suceder con la bilirrubina. La presencia de urobilinógeno urinario entonces está indicando que las vías biliares son permeables para el pigmento en el sistema enterohepático.

Dado que el aumento de urobilinógeno urinario implica necesariamente un aumento sérico de la bilirrubina libre, su determinación es indicativo de un problema de carácter hemolítico.

Existen dos pruebas fundamentales para asegurar que este "urobilinógeno" no procede de hemólisis, ni intravascular, ni

dentro del sistema fagocitario mononuclear: no se detectó hemoglobina en la orina y no se detectó aumento de los niveles de bilirrubina total en el suero sanguíneo de los ovinos del grupo problema con respecto a los controles, mediante la prueba de Van den Bergh (figura Nº 8, Tabla Nº 3). Se deduce que se trata de una reacción falsa positiva.

Se descarta la posibilidad de una eritropoyesis ineficáz, dado que en tal caso operaría un mecanismo similar al de destrucción de glóbulos rojos dentro del sistema fagocitario mononuclear (101).

En condiciones rutinarias de laboratorio, las pruebas de urobilinógeno utilizan el aldehido de Ehrlich como reactivo (101). Existen otros compuestos que pueden dar reacción positiva: porfobilinógeno, indol, sulfonamidas y procaína (101).

Durante el tiempo de experimentación no se dieron tratamientos a base de sulfas ni procaína ni en el grupo problema ni en los controles.

Se podría pensar que el suministro de la planta mamei - tomatillo (Bunchosia pseudonítida) produjera una afección intestinal de caracter inflamatorio que produjera putrefacción intestinal la cual induciría una reacción Ehrlich positiva por la presencia de indol; no se observó evidencia de inflamación intestinal en ningún caso, por lo cual se descarta la posibilidad de que la positividad de la reacción se deba a la presencia de indol (17).

TABLA 3. Cromatosis. Concentraciones séricas de Bilirrubina total (mg./100 ml.) en los ovinos durante el tiempo de experimentación.

| Animal Nº. | Tiempo de Experimentación (días) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Previo al Consumo | | | | Consumo | | | | | | |
| | 1 | 9 | 17 | 24 | 32 | 37 | 44 | 53 | 59 | 63 | 72 |
| | GRUPO PROBLEMA | | | | | | | | | | |
| 1 | 0.03 | 0.36 | 0.22 | 0.20 | 0.17 | 0.20 | 0.21 | 0.39 | 0.24 | 0.25 | 0.24 |
| 2 | 0.14 | 0.29 | 0.16 | 0.21 | 0.09 | 0.20 | 0.27 | 0.25 | 0.26 | 0.31 | 0.30 |
| 3 | 0.10 | 0.31 | 0.15 | 0.12 | 0.03 | 0.12 | 0.17 | 0.19 | 0.18 | 0.15 | 0.16 |
| 4 | 0.30 | 0.24 | 0.20 | 0.10 | 0.06 | 0.13 | 0.17 | 0.22 | 0.28 | 0.30 | 0.28 |
| | CONTROLES | | | | | | | | | | |
| 5 | 0.07 | 0.20 | 0.10 | 0.12 | 0.01 | 0.16 | 0.23 | 0.22 | 0.22 | 0.25 | 0.26 |
| 6 | 0.31 | 0.30 | 0.10 | 0.18 | 0.07 | 0.13 | 0.17 | 0.23 | 0.23 | 0.24 | 0.20 |

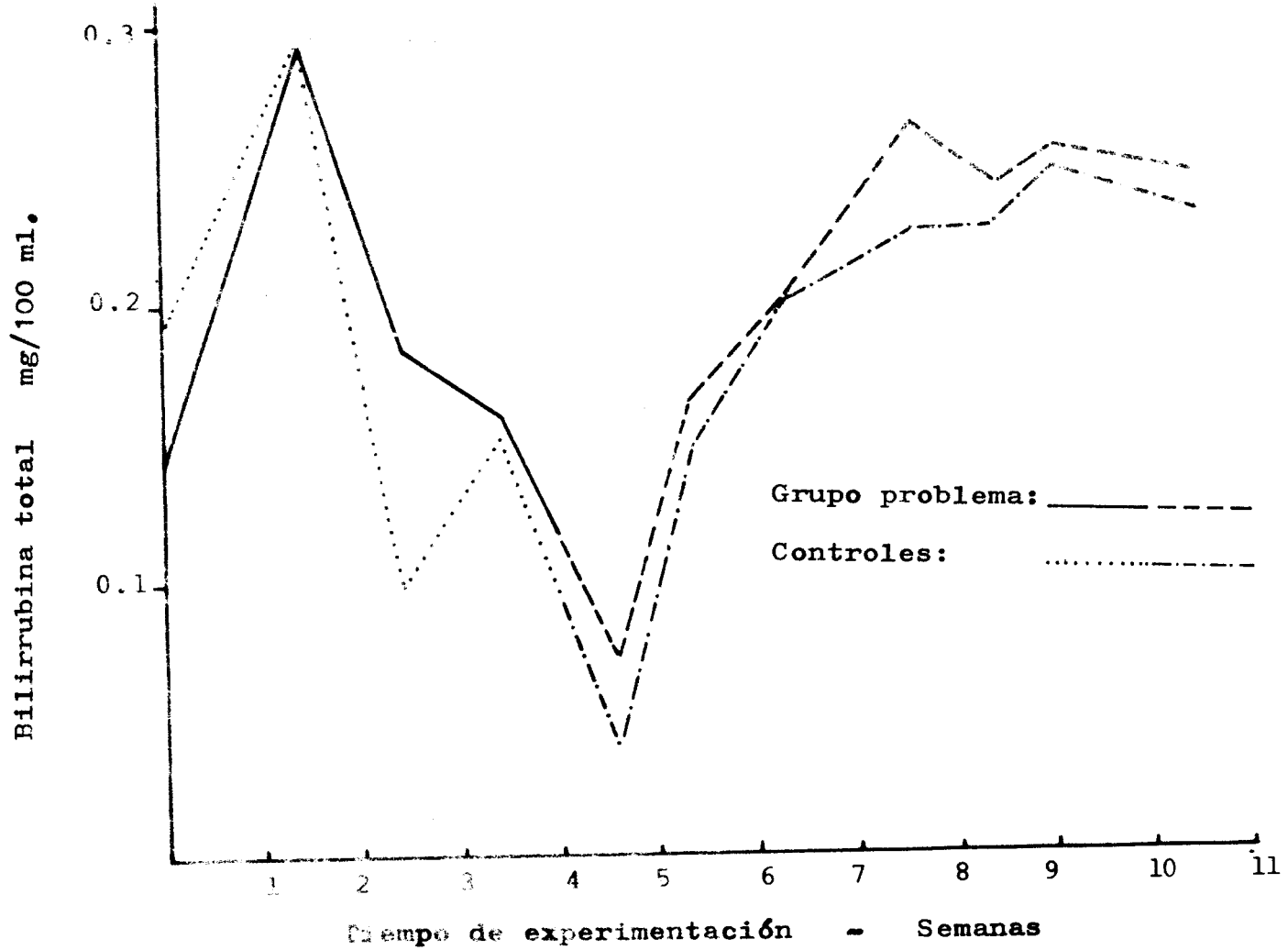



FIGURA Nº 8 Cromatosis, reproducción experimental en ovinos. Concentraciones séricas de bilirrubina total en los animales durante el tiempo de experimenta - ción.

De las especulaciones anteriores se plantea la posibilidad de que la sustancia por sí misma, luego de diversos procesos metabólicos, daría una reacción Ehrlich positiva.

4.2.2 Determinaciones urinarias de metabolitos del HEME.

Con base en experimentaciones anteriores, en las cuales se planteó la posibilidad de una interferencia enzimática de la vía metabólica del HEME, responsable de las manifestaciones clínicas y patológicas observadas hasta entonces, se procedió a practicar los respectivos análisis de los metabolitos en la orina de los animales, para observar posibles cambios en sus niveles debido al consumo de la planta mamei - tomatillo (Bunchosia pseudonítida).

La reacción Ehrlich positiva fue constante en las orinas de los ovinos del grupo problema, desde las 24 horas de iniciado el consumo de la planta hasta el día del sacrificio de los animales (Figura Nº 5).

4.2.2.1 Porfobilinógeno

El porfobilinógeno, uno de los metabolitos de la síntesis del heme y cuya presencia en la orina origina una reacción Ehrlich positiva, presentó niveles ligeramente superiores en los ovinos del grupo problema con relación a los del grupo control. En los ovinos del grupo control nunca se registró reacción Ehrlich positiva a pesar de haber superado en ocasiones los niveles de porfobilinógeno urinario, a los de los ovinos del grupo problema (Tabla 4, Figura Nº 9).

TABLA 4. Cromatosis. Concentraciones urinarias de porfobilinógeno (microgramos/100 ml.) en los ovinos durante el tiempo de experimentación.

| Animal No. | Tiempo de Experimentación ( días ) | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Previo al Consumo | | | Consumo | | | | | | | | | |
| | 1 | 14 | 31 | 3 | 7 | 10 | 15 | 17 | 22 | 24 | 31 | 38 | 44 |
| | GRUPO PROBLEMA | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 0.300 | 0.310 | 0.307 | 0 | 0.709 | 0.220 | 0.219 | 0.105 | 0.482 | 0.044 | 0.570 | 0.526 | 0.300 |
| 2 | 0.307 | 0.412 | 0.614 | 0.395 | 0.220 | 0.570 | 0.400 | 0.307 | 0.395 | 0.920 | 0.132 | 0.482 | 0.310 |
| 3 | 0 | 0.100 | 0 | 0.132 | 0 | 0 | 0.090 | 0.263 | 0.658 | 0.307 | 0.088 | 0.789 | 0.634 |
| 4 | 0.570 | 0.450 | 0.702 | 0 | 0.482 | 0.351 | 0.746 | 0.526 | 0.088 | 0.132 | 0.526 | 0.702 | 0.512 |
| | CONTROLES | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 0.395 | 0.180 | 0.007 | 0.439 | 0.263 | 0 | 0.789 | 0.087 | 0.132 | 0.570 | 0.175 | 0.263 | 0.260 |
| 6 | 0.395 | 0.211 | 0.044 | 0 | 0 | 0.175 | 0.263 | 0 | 0.175 | 0 | 0 | 0.351 | 0.170 |

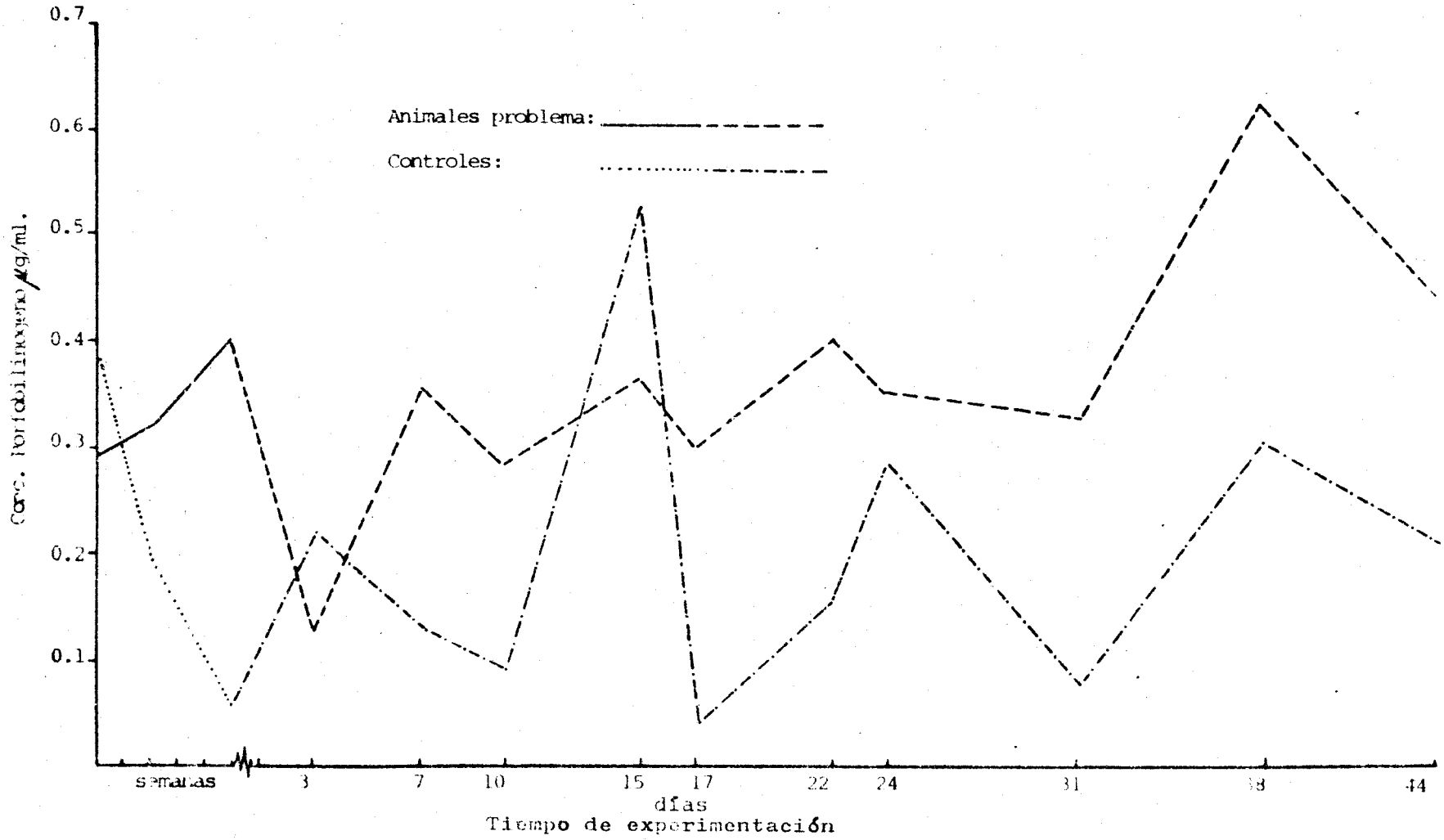



FIGURA Nº 9 **Cromatosis, reproducción experiemtal en ovinos. Concentraciones urinarias de porfobilinógeno en los animales durante el tiempo de experimentación.**

Se excluye por tanto la posibilidad de que los niveles de porfobilinógeno estén produciendo una reacción Ehrlich positiva.

El método utilizado para las determinaciones cuantitativas de porfobilinógeno urinario, descrito por Moore y Labbé, permite la eliminación del efecto producido por cromógenos diferentes del porfobilinógeno, mediante la adsorción del metabolito a una resina de intercambio iónico y su posterior elución y cuantificación al espectrofotómetro (82).

Dentro del desarrollo de la técnica, se presentó un cromógeno de una tonalidad violeta que adsorbió perfectamente a la resina Dowex 2-X 8 empleada, de la cual no fue posible eluirlo. Este cromógeno fue constante, con excepción de los días 21 y 44 de iniciado el consumo de la planta, en los cuales el color de la orina regresó al estado inicial normal de coloración.

4.2.2.2 Acido Delta-Aminolevulínico

Los valores de los niveles de ácido delta-aminolevulínico obtenidos durante el tiempo de experimentación se presentan en la tabla Nº 5, Figura Nº 10.

En los ovinos del grupo problema, los niveles de ácido delta-aminolevulínico presentan una elevación entre los días 17 y 31 de iniciado el consumo de la planta problema, superando ampliamente tanto a los niveles previos de ambos grupos, como a los niveles ligeramente altos con respecto a los iniciales, presentados por los controles (Tabla Nº 5, Figura Nº 10).

TABLA 5. Cromatosis. Concentraciones de ácido Delta-Aminolevulínico (mg/litro) en la orina de los ovinos durante el tiempo de experimentación.

| Animal No. | Tiempo de Experimentación (días) | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Previo al consumo | | | Consumo | | | | | | | | | |
| | 1 | 14 | 31 | 1 | 4 | 7 | 12 | 14 | 18 | 21 | 29 | 35 | 44 |
| | GRUPO PROBLEMA | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 0 | 0.120 | 0.296 | 0 | 0.090 | 0 | 0 | 0.299 | 0.370 | 0.540 | 0.436 | 0.206 | 0.206 |
| 2 | 0.145 | 0.104 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.237 | 0.400 | 0.541 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0.163 | 0.052 | 0.037 | 0.013 | 0.045 | 0.044 | 0.057 | 0.113 | 0.704 | 0.139 | 0.245 | 0.170 | 0.093 |
| 4 | 0.390 | 0.052 | 0 | 0.112 | 0.593 | 0.022 | 0.262 | 0.073 | 0.017 | 0.458 | 0 | 0.260 | 0.200 |
| | CONTROLES | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 0 | 0 | 0.129 | 0.217 | 0.232 | 0 | 0.242 | 0.152 | 0.012 | 0.492 | 0.279 | 0.194 | 0.206 |
| 6 | 0.254 | 0.165 | 0 | 0.033 | 0 | 0.197 | 0 | 0.022 | 0.236 | 0.062 | 0 | 0 | 0.060 |

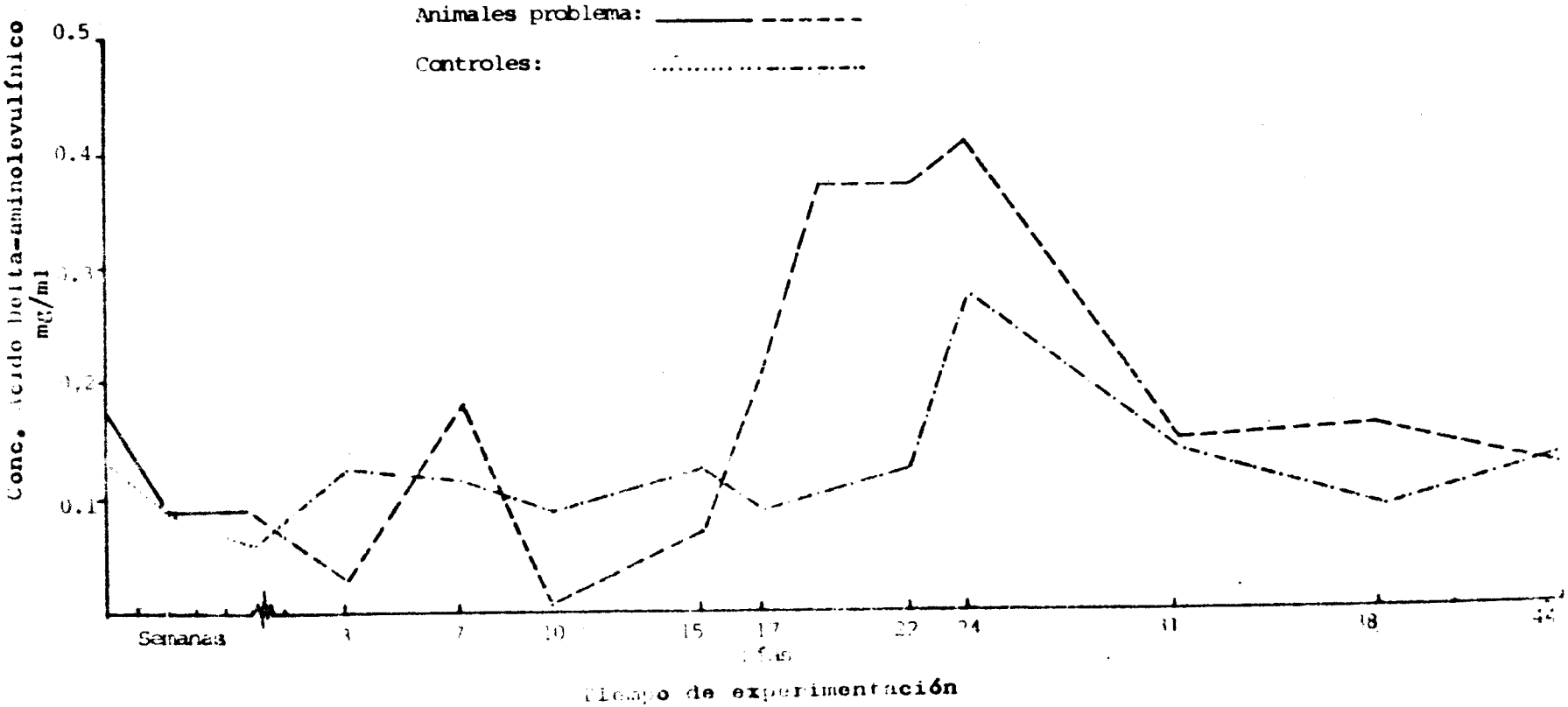



FIGURA Nº 10 **Cromatosis, reproduccion experimental en ovinos. Concentraciones de ácido delta-aminolevulínico en la orina de los animales de experimentación.**

4.2.2.3 Uroporfirinas y Coproporfirinas

Los valores de los niveles de uroporfirinas y coproporfirinas se presentan en las tablas Nº 6 y 7, Figuras Nº 11 y 12.

Se puede observar que los valores, aunque ligeramente superiores en el grupo problema con relación al grupo control, presentan un rango de variación durante las primeras cinco semanas previas a la iniciación del consumo de la planta problema entre 0.2 y 0.4 microgramos/dl. para coproporfirinas y entre 0.1 y 0.2 microgramos/dl. para uroporfirinas. Los niveles de uro y coproporfirinas presentan un comportamiento similar hasta el día 18 de iniciado el consumo de la planta problema. Luego del día 18, los niveles de porfirinas en los ovinos del grupo problema se elevan hasta concentraciones máximas de 1.1 microgramos/dl. para ambos compuestos. Es importante que el nivel máximo es alcanzado por coproporfirinas hacia el día 21, mientras que para uroporfirinas el máximo se obtiene hacia el día 29 de iniciado el consumo de la planta problema.

Para ambos metabolitos, los niveles se mantienen altos en los ovinos del grupo problema, en relación con los ovinos del grupo control, entre los días 19 a 35. Durante este lapso de tiempo, la orina de los ovinos del grupo problema presentó una coloración púrpura.

Se puede por tanto inferir, que la coloración púrpura de la orina durante este período se debe a la presencia de porfirinas.

Las figuras 13 y 14, muestran la fluorescencia roja de las porfirinas, una vez extraídas de la orina y listas para ser cuantificadas por espectrofotometría.

TABLA 6 Cromatosis Concentraciones urinarias de Uroporfirinas (microgramos/dl ) en los ovinos durante el tiempo de experimentación.

| Animal No. | Tiempo de Experimentación (días) | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 14 | 31 | 1 | 4 | 7 | 12 | 14 | 18 | 21 | 29 | 25 | 44 |
| | GRUPO PROBLEMA | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 0.130 | 0.113 | 0.077 | 0.205 | 0.113 | 0.113 | 0.360 | 0.083 | 0.940 | 0.924 | 1.980 | 0.212 | 0.114 |
| 2 | 0.250 | 0.085 | 0.043 | 0.078 | 0.085 | 0.080 | 0.154 | 0.184 | 0.146 | 0.804 | 0.994 | 0.154 | 0.085 |
| 3 | 0.099 | 0.100 | 0.292 | 0.067 | 0.027 | 0.024 | 0.183 | 0.200 | 0.240 | 0.630 | 0.848 | 0.367 | 0.230 |
| 4 | 0.200 | 0.184 | 0.314 | 0.120 | 0.212 | 0.152 | 0.234 | 0.296 | 0.247 | 0.416 | 0.714 | 0.212 | 0.114 |
| | CONTROLES | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 0.254 | 0.263 | 0.262 | 0.414 | 0.151 | 0.028 | 0.230 | 0.090 | 0.464 | 0.320 | 0.242 | 0.090 | 0.180 |
| 6 | 0.050 | 0.049 | 0.046 | 0.069 | 0.047 | 0.028 | 0.040 | 0.054 | 0.041 | 0.062 | 0 | 0.056 | 0.060 |

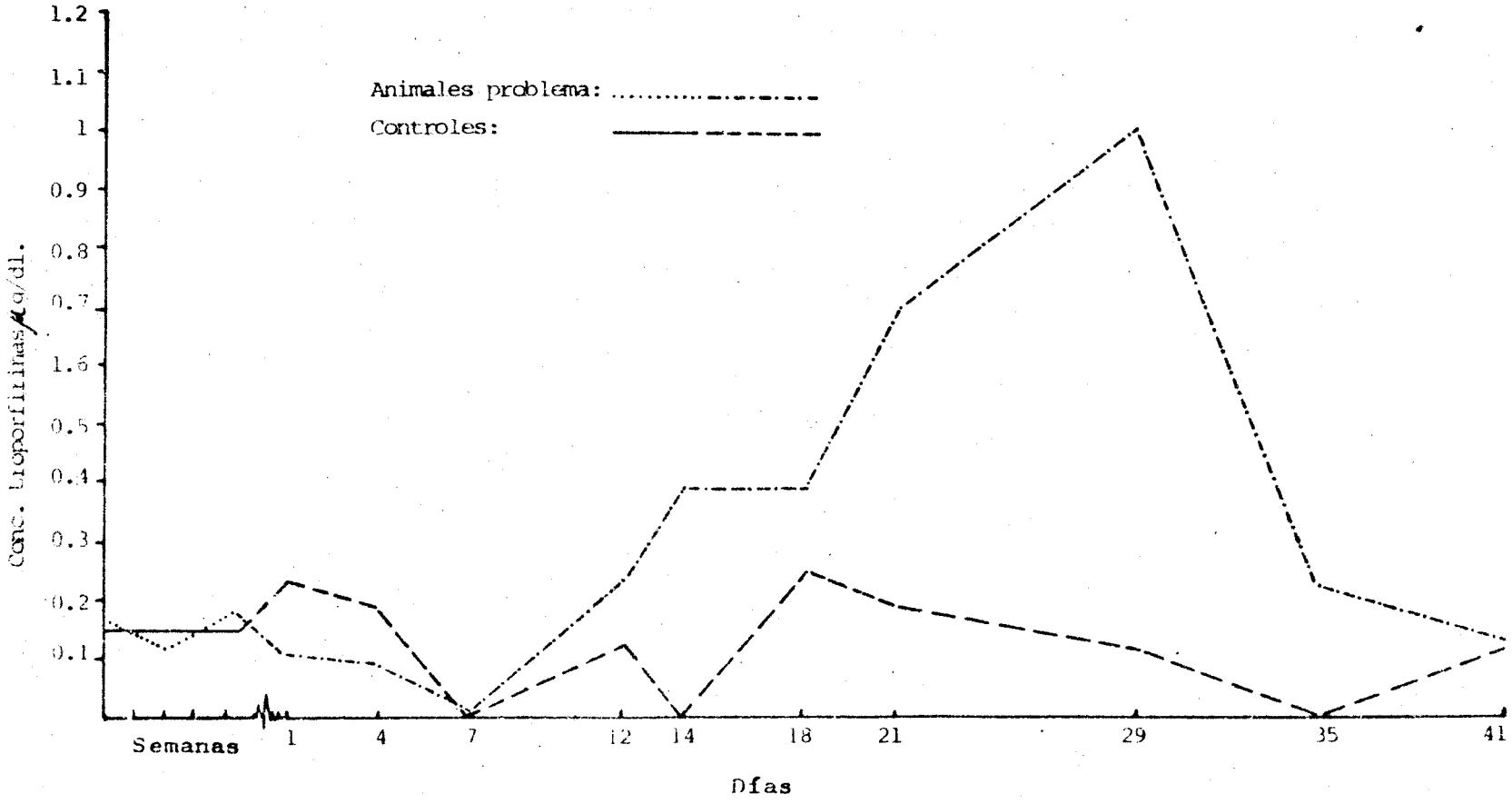



FIGURA Nº 11 Cromatosis, reproducción experimental en ovinos. Concentraciones urinarias de uroporfirinas en los animales durante el tiempo de experimentación.

TABLA 7. Cromatosis. Concentraciones urinarias de coproporfirinas (microgramos/dl.) en los ovinos durante el tiempo de experimentación.

| Animal No. | Tiempo de Experimentación (días) | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Previo al consumo | | | Consumo | | | | | | | | | |
| | 1 | 14 | 31 | 1 | 4 | 7 | 12 | 14 | 18 | 21 | 29 | 35 | 44 |
| | GRUPO PROBLEMA | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 0.450 | 0.270 | 0.060 | 0.572 | 0.492 | 0.285 | 0.678 | 0.622 | 0.705 | 0.556 | 1.138 | 0.358 | 0.280 |
| 2 | 0.290 | 0.200 | 0.120 | 0.423 | 0.299 | 0.379 | 0.280 | 0.256 | 0.146 | 1.975 | 0.390 | 0.436 | 0.256 |
| 3 | 0.100 | 0.090 | 0.080 | 0.160 | 0.074 | 0.076 | 0.090 | 0.160 | 0.183 | 1.178 | 1.000 | 0.937 | 0.200 |
| 4 | 0.260 | 0.410 | 0.550 | 0.530 | 0.219 | 0.226 | 0.316 | 0.058 | 0.247 | 0.615 | 0.715 | 0.658 | 0.060 |
| | CONTROLES | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 0.190 | 0.210 | 0.220 | 0.230 | 0.247 | 0.035 | 0.042 | 0.048 | 0.464 | 0.190 | 0.208 | 0.200 | 0.050 |
| 6 | 0.070 | 0.100 | 0 | 0.259 | 0.049 | 0.053 | 0.021 | 0.076 | 0.042 | 0.018 | 0.040 | 0.127 | 0.170 |

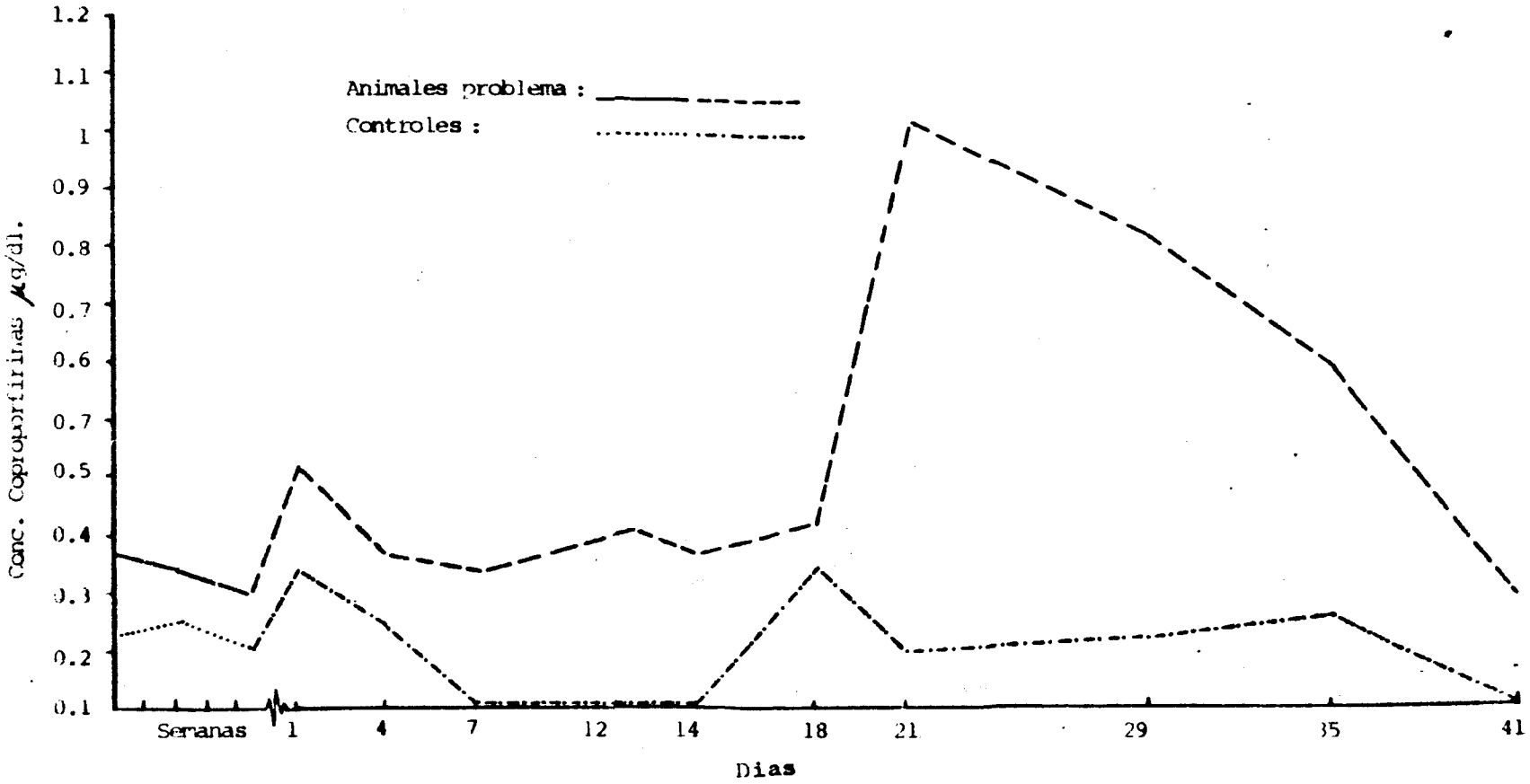



**FIGURA Nº 12** **Cromatosis, reproducción experimental en ovinos. Concentraciones urinarias de coproporfirinas en los animales durante el tiempo de experimentación.**

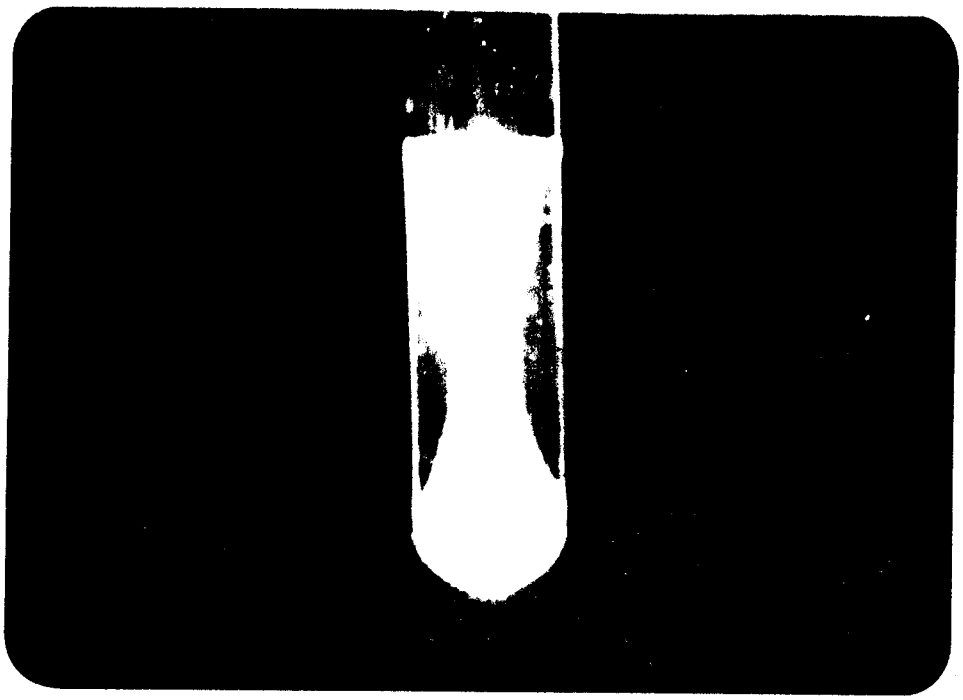


FIGURA Nº 13. Cromatosis. Reproducción experimental en ovinos.

Fluorescencia roja de las porfirinas en la orina. La muestra corresponde a un ovino control.

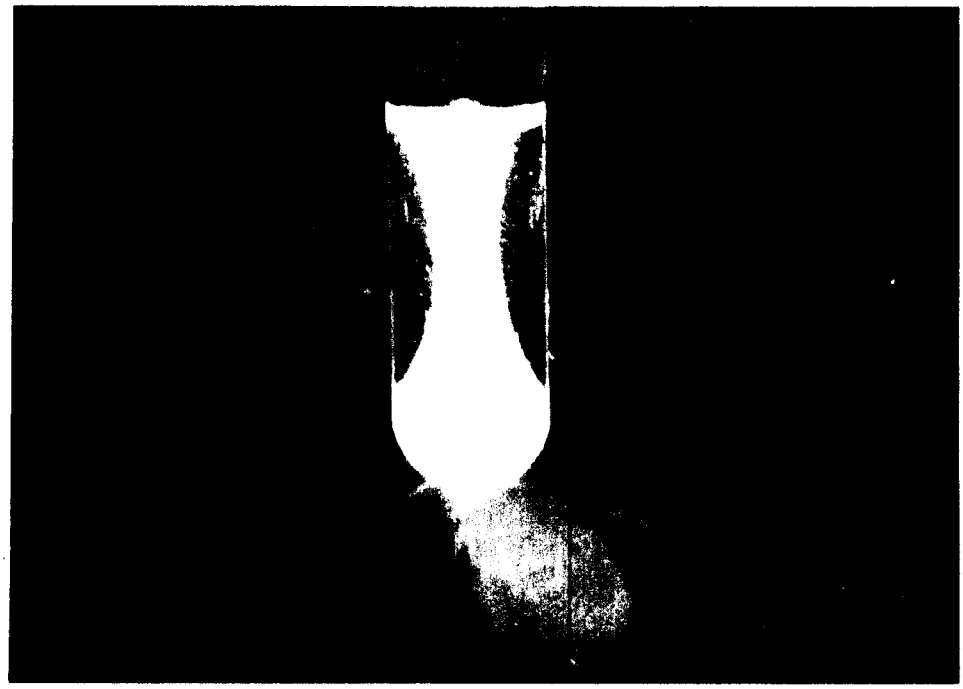


FIGURA Nº 14. Cromatosis. Reproducción experimental en ovinos.

Fluorescencia roja de las porfirinas en la orina, la muestra corresponde a un ovino problema.

La figura Nº 13 corresponde a la fluorescencia dada por las porfirinas extraídas de la orina de un ovino control. La figura Nº 14 corresponde a la fluorescencia de las porfirinas extraídas de la orina de un ovino del grupo problema, hacia el día 29 de iniciado el consumo de la planta problema.

### 4.2.3 Análisis Estadísticos para los niveles de Uroporfirinas y Coproporfirinas.

Los resultados de los correspondientes análisis de varianza del diseño seleccionado se encuentran en las tablas Nºs 8 y 9.

De los resultados del análisis de varianza, se produce un rechazo de la hipótesis nula, relacionada con el comportamiento promedio de uroporfirinas y coproporfirinas en el factor A, es decir, el promedio de las porfirinas en los dos grupos (control y problema) tienen un comportamiento diferente, de mayor importancia en las coproporfirinas.

El análisis de varianza no detectó diferencias en el comportamiento promedio de las porfirinas después de iniciado el consumo de la planta, en comparación con los niveles obtenidos antes de iniciar el consumo de la planta problema. Igualmente la interacción resultó no significativa.

En este punto es necesario observar detenidamente por qué un fenómeno observado que tiene significación biológica, estadísticamente es no significativo.

Se está observando un fenómeno biológico : el consumo de una planta problema induce la excreción de porfirinas, cuyos valores

TABLA 8. Análisis de Varianza de los valores promedio de Uroporfirinas en un diseño completamente al azar con arreglo factorial de orden 2 x 2.

| Fuente de Variación | Grados de Libertad | Suma Cuadrados | Cuadrado medio calculado | F calculado |
|---|---|---|---|---|
| Factor A | 1 | 0.4665 | 0.4665 | 4.3159 * |
| Factor B | 1 | 0.1952 | 0.1952 | 1.8059 N.S. |
| Interacción AB | 1 | 0.13382 | 0.13382 | 1.238 N.S. |
| Error Experimental | 74 | 7.99848 | 0.108087 | |
| Total | 77 | 8.794 | | |

* Significante al 95% de confianza.

N.S. No significante

TABLA 9. Análisis de varianza de los valores promedio de coproporfirinas en un diseño completamente al azar con arreglo factorial de orden 2 X 2.

| Fuente de Variación | Grados de Libertad | Suma Cuadrados | Cuadrado medio calculado | F calculado |
|---|---|---|---|---|
| Factor A | 1 | 1.3458 | 1.3458 | 16.474 ** |
| Factor B | 1 | 0.269079 | 0.269079 | 3.2738 NS. |
| Interacción AB | 1 | 0.15094 | 0.15094 | 1.8364 NS. |
| Error experimental | 74 | 6.082232 | 0.08219 | |
| Total | 77 | 7.848051 | | |

** Altamente significativo, nivel de confianza del 99%

NS. No significativo.

son bastante elevados en un grupo problema en relación con un control. Estos niveles altos se producen en un período de tiempo corto. El número de observaciones luego de iniciado el consumo de la planta es de 40 para el grupo problema, contra 12 observaciones antes de iniciado el consumo. El alto número de observaciones con valores relativamente bajos, reduce en conjunto, los pocos datos con valores altos luego de iniciado el consumo. Antes de iniciado el consumo, son pocas las observaciones (solo 12), ésto hace que cualquier valor alto, siendo normal, puede elevar el promedio.

Se deduce que aparentemente, es decir estadísticamente, los valores altos de uroporfirinas y coproporfirinas son independientes del consumo.

Como un complemento a los análisis de varianza anteriores, se realizó el análisis de Duncan, según la metodología descrita en el capítulo de materiales y métodos.

En la tabla Nº 10 se presentan los promedios de uroporfirinas y coproporfirinas de los grupos control y problema, teniendo en cuenta el consumo de la planta.

Es importante resaltar en la tabla Nº 10 que el promedio de coproporfirinas en el grupo problema es bastante mayor en comparación con el control, pero es más importante aún la diferencia cuando se comparan el grupo problema con consumo contra los otros tres grupos, es decir, el control con y sin consumo y el problema sin consumo.

TABLA 10. Promedios de Porfirinas en los dos grupos teniendo en cuenta el consumo y no consumo de la planta.

| | UROPORFIRINAS | | COPROPORFIRINAS | |
|---|---|---|---|---|
| | Control | Problema | Control | Problema |
| No consumo | 0.154 | 0.1572 | 0.1316 | 0.24 |
| Consumo | 0.1333 | 0.3455 | 0.1235 | 0.4532 |

La misma situación se presenta para las uroporfirinas, aunque no con una diferencia tan marcada como para las coproporfirinas.

En el análisis de Duncan se comparó el promedio del grupo problema (luego de iniciado el consumo) contra el promedio de los otros tres grupos ( grupo problema antes del consumo, grupo control antes del consumo y grupo control luego de iniciado el consumo ) tanto para uroporfirinas como para coproporfirinas.

En la tabla Nº 11 se presentan los resultados correspondientes a dichas comparaciones.

Es importante resaltar en la tabla 11 el comportamiento absolutamente diferente del promedio de coproporfirinas del grupo problema con consumo, comparado con los otros tres grupos, es decir : problema sin consumo y control antes del consumo y luego del consumo.

Se puede observar como en el análisis de Duncan, se detectan diferencias en comportamiento del promedio de este grupo (problema con consumo) contra los otros grupos.

Sin embargo, en las uroporfirinas, a pesar de que el promedio del grupo problema con consumo es bastante mayor comparado con los otros tres promedios, no alcanza a presentar diferencias estadísticamente significativas. Solo se detectaron diferencias entre el promedio de uroporfirinas de los dos grupos dados anteriormente en el análisis de Duncan.

TABLA 11. Resultados del Análisis de Duncan para los Porfirinas.

| Hipótesis | | | Amplitud límite significativa | Diferencia absoluta de promedios comparados. | |
|---|---|---|---|---|---|
| $H_o$ | : | El promedio de uroporfirinas en el grupo problema con consumo se comporta igual al grupo control con consumo, contra : | | | |
| $H_1$ | : | El promedio de urocorfirinas en estos dos grupos se comporta diferente. | 0.2245 | 0.2121 | NS |
| $H_o$ | : | El promedio de coproporfirinas en el grupo problema con consumo se comporta igual al promedio del grupo control con consumo, contra : | | | |
| $H_1$ | : | El promedio de coproporfirinas se comporta diferente en estos dos grupos. | 0.19 | 0.32 | * |
| $H_o$ | : | El promedio de coproporfirinas del grupo problema con consumo se comporta igual al promedio del grupo control sin consumo, contra : | | | |
| $H_1$ | : | El promedio de coproporfirinas se comporta diferente en estos dos grupos. | 0.203 | 0.3215 | * |

TABLA 11. (Continuación) 2

| Hipótesis | | Amplitud límite significativa | Diferencia absoluta de promedios comparados. | |
|---|---|---|---|---|
| $H_o$ : | El promedio de coproporfirinas del grupo problema con consumo se comporta igual al promedio del grupo problema sin consumo, contra : | | | |
| $H_1$ : | El promedio de coproporfirinas se comporta diferente en estos dos grupos. | 0.158 | 0.2132 | * |
| $H_o$ : | El promedio de coproporfirinas del grupo problema sin consumo se comporta igual al promedio del grupo control con consumo, contra : | | | |
| $H_1$ : | El promedio de coproporfirinas se comporta en estos dos grupos. | 0.24 | 0.116 | NS |

* : Significante, nivel de confianza del 95%

NS : No significante.

### 4.2.4 Posibilidades de relación con un estado de porfiria

La presencia de metabolitos de la vía de síntesis del Heme, está determinando o caracterizando una entidad denominada porfiria.

Las porfirias son condiciones patológicas en las cuales la rata de síntesis de porfirinas está ampliamente incrementada, de tal manera que aparecen en la orina, a la cual le imparten un color rojo púrpura (9, 84).

Dependiendo del órgano implicado en el desórden metabólico, las porfirias se clasifican en eritropoyéticas o hepáticas, según sea la médula ósea o el hígado los órganos comprometidos, los cuales presentan la rata de síntesis de heme más alta dentro del organismo (9, 35, 53, 84).

Las porfirias está bien caracterizadas en el humano (9, 84). En otras especies, se ha identificado bien la porfiria congénita eritropoyética en bovinos, porcinos y un caso reportado en un gato. En ovinos no se han reportado casos de porfiria, por lo cual las discusiones respecto de los hallazgos se deben realizar a la luz de los conocimientos obtenidos en la especie humana, con caracter comparativo.

Las características clínico - patológicas y los hallazgos químicos en la orina en los casos de porfiria en humanos se presentan en las tablas 2 y 12.

En la figura 15 se esquematiza la vía metabólica del HEME y en la tabla 14 se presentan los enzimas alterados en cada uno de los defectos metabólicos en humanos.

TABLA 12 Hallazgos Químicos Usuales en las Porfirias *

Tomado de: Philip, K. B. y col. Metabolic Control and Disease.

| Porfiria | Orina | | | | Heces | | | Glóbulos Rojos | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ALA | PBG | URO | COPRO | URO | COPRO | PROTO | URO | COPRO | PROTO |
| Congénita eritropoyética | N | N | +++ | ++–+++ | ++ | +++ | N | +++ | ++ | + |
| Protoporfiria Eritropoyética | N | N | N | N | N–++ | N– + | N–+++ | N | + | +++ |
| Coproporfiria eritropoyética | N | N | N | N | | N | | +–++ | +++ | + |
| Porfiria aguda intermitente | +–+++ | +–+++ | N–++** | + | + | ± | ± | N | N | N |
| | ++–+++ | ++–+++ | ++–+++ | + | +–++ | + | + | N | N | N |
| Porfiria Variegata | N–++ | N–++ | N–++ | +–++ | N | +++ | +++ | N | N | N |
| | ++–+++ | +–+++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | N | N | N |
| Coproporfiria Hereditaria | N–++ | N–++ | N–+ | N–++ | | +–+++ | N–+ | N | N | N |
| | +++ | +++ | | ++–+++ | | +++ | N–+ | N | N | N |
| Cutánea tarda | N–+ | N | +++ | ++–+++ | | ±–+++ | N–+ | N | N | N |

N = Excreción normal
+–+++ = Desde ligero hasta marcado incremento
** = Algunas de las porfirinas pueden ser formadas no enzimáticamente por polimerización del porfobilinógeno
ALA = Acido Delta-Aminolevulínico
PBG = Porfobilinógeno
URO = Uroporfirinas
COPRO = Coproporfirinas

Esta Tabla sirve sólo como una guía general. Para algunas de las porfirias, los datos están basados en pocos casos.

Existen excepciones a los patrones anteriores.

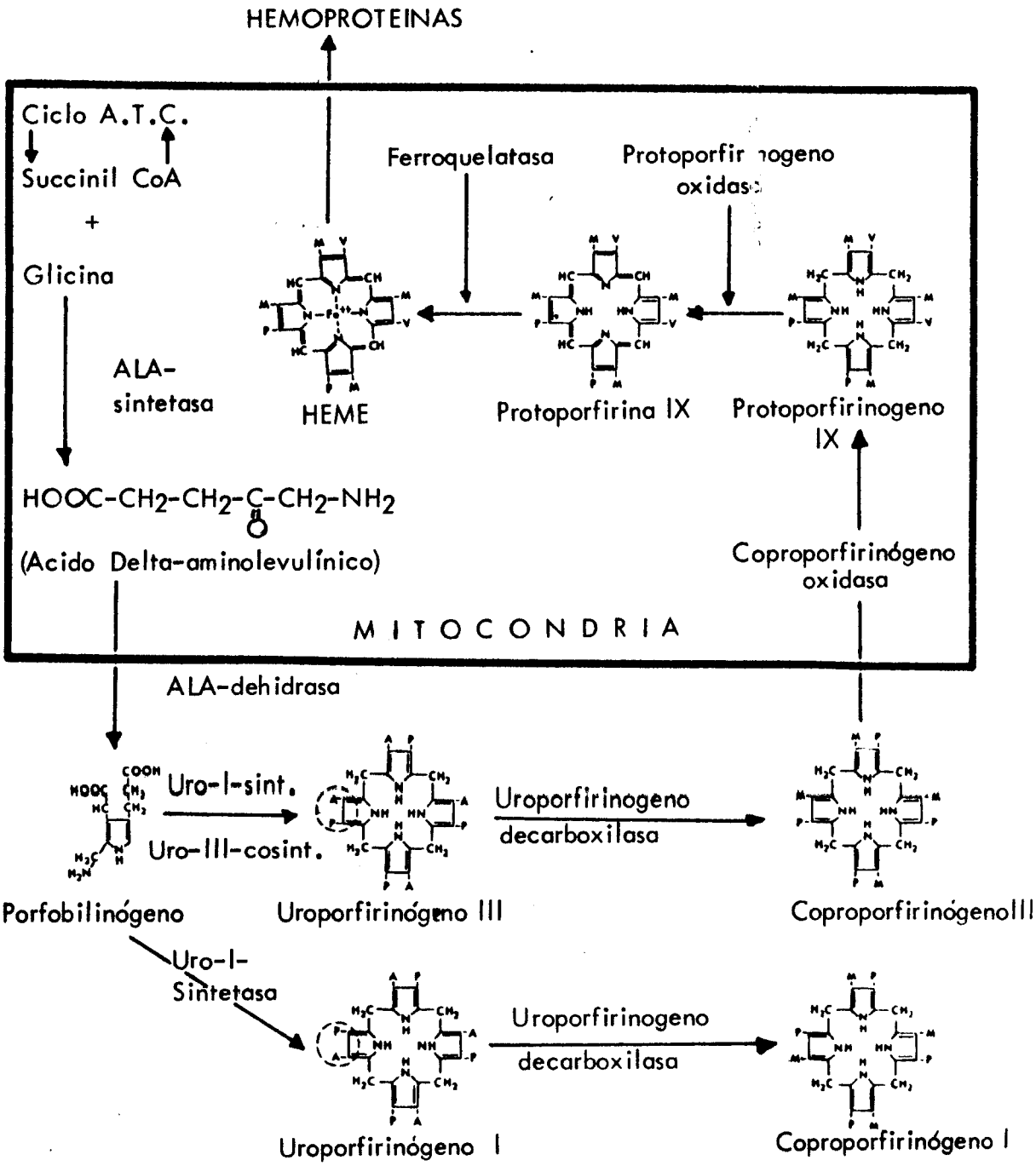



**FIGURA Nº 15** Esquema de la vía metabolica del heme
Tomado de: "The metabolic basis of inherited disease", 1980

TABLA 13. Enzimas afectadas en las Porfirias en humanos *

* Tomado de Stambury, J. B. En: The metabolic basis of inherited disease.

| Porfiria | Enzima |
|---|---|
| Congénita eritropoyética | Uro - I - sintetasa<br>Uro - III- cosintetasa |
| Aguda intermitente | Uro - I - sintetasa |
| Coproporfiria hereditaria | Coproporfirinógeno oxidasa |
| Variegata | Protoporfirinógeno oxidasa<br>Ferroquelatasa |
| Cutánea tardía | Uroporfirinógeno decarboxilasa |
| Protoporfiria | Ferroquelatasa |

En bovinos, la porfiria congénita eritropoyética, ha sido observada en Suráfrica, Dinamarca, Inglaterra, Australia y los Estados Unidos (4, 47, 67). En Japón solo se han reportado dos casos (38), en Suramérica se reportó un caso en un ternero overo negro en Chile (4) y González y col. reportaron un caso en terneros mellizos Holstein-Friesian en 1978 (27).

En todos los casos la enfermedad es hereditaria y obedece a un caracter mendeliano recesivo simple (4, 37, 69).

Los animales afectados presentan fotosensibilidad de áreas no pigmentadas de la piel (4, 37, 67).

La porfiria congénita bovina, tiene marcadas similaridades con la forma humana de porfiria eritropoyética. Los bovinos pueden presentar anemia, reticulocitosis y esplenomegalia (67).

Se reporta una reducción de la vida media de los eritrocitos y un incremento marcado del reciclaje del hierro, aún en casos en que no hay anemia (67).

En bovinos, las concentraciones de porfirinas son insignificantes, la médula ósea presenta una intensa fluorescencia roja (4, 37, 67).

En la porfiria congénita eritropoyética, en los bovinos contrasta con la forma humana de presentación en el sentido de que los eritrocitos circulantes contienen relativamente poca cantidad de uroporfirinas y mucha protoporfirinas. En estos bovinos, las porfirinas del plasma están representadas en uro y coproporfirinas (54).

La orina de los bovinos con porfiria congénita eritropoyética contenía principalmente uro y coproporfirinas (54). No se ha detectado ácido delta-aminolevulínico ni porfobilinógeno en la orina de estos animales (4, 37, 54).

4.2.4.1 Comparación con una Porfiria Eritropoyética

Los dos órganos con rata altamente significativa de síntesis de heme corresponden a la médula ósea y el hígado.

Dado que se detectaron niveles ligeramente elevados de ácido delta-aminolevulínico y bastante elevado de uroporfirinas y coproporfirinas en las orinas de los animales de experimentación que consumieron la planta problema, un análisis de los niveles de hemoglobina y su concentración en glóbulos rojos, es necesario como una manera de evaluar una posible alteración de la vía metabólica del heme a nivel de tejidos eritropoyéticos. Una alteración en el tejido hepático será evaluada posteriormente.

4.2.4.1.1 Análisis de los Hemogramas

En las tablas Nºs 14, 15, 16, 17, 18 y 19, se presentan los valores de hematocrito, recuento total de glóbulos rojos, hemoglobina, volúmen corpuscular medio, hemoglobina corpuscular media y concentración media de hemoglobina corpuscular respectivamente. De manera complementaria, en la tabla 20, se presentan los valores de los recuentos totales de glóbulos blancos. En las figuras 16, 17, 18 y 19 se puede observar las variaciones de los niveles de hematocrito, hemoglobina, hemoglobina corpuscular media y concentración media de hemoglobina corpuscular.

TABLA 14. Cromatosis. Hematocrito (%) de los ovinos durante el tiempo de experimentación.

| Animal No. | Tiempo de Experimentación (días) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Previo al Consumo | | | Consumo | | | | |
| | 1 | 7 | 13 | 2 | 9 | 18 | 28 | 37 |
| | GRUPO PROBLEMA | | | | | | | |
| 1 | 38.19 | 38.9 | 32.6 | 29 | 28 | 30.1 | 25 | 25 |
| 2 | 28.8 | 29.8 | 28 | 28 | 27 | 38.5 | 29 | 28.8 |
| 3 | 25.3 | 25 | 25.5 | 23 | 22 | 29.3 | 22 | 22.2 |
| 4 | 26.3 | 26.7 | 25.8 | 21 | 21 | 28.4 | 21 | 22.3 |
| | CONTROLES | | | | | | | |
| 5 | 22 | 20.2 | 21 | 25 | 24 | 24.8 | 25 | 24.6 |
| 6 | 26.9 | 28.8 | 26.4 | 25 | 25 | 26.3 | 23 | 24.3 |

TABLA 15. Cromatosis. Recuento de glóbulos rojos ( X $10^6$/m.m.$^3$) en los ovinos durante el tiempo de experimentación.

| Animal No | Tiempo de Experimentación ( días ) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Previo al consumo | | | Consumo | | | | |
| | 1 | 7 | 13 | 2 | 9 | 18 | 28 | 37 |
| | GRUPO PROBLEMA | | | | | | | |
| 1 | 8.8 | 8.9 | 7.69 | 7.13 | 6.96 | 7.25 | 6.46 | 5.94 |
| 2 | 6.66 | 6.65 | 6.1 | 6.26 | 6.1 | 8.69 | 6.43 | 6.81 |
| 3 | 5.82 | 5.86 | 5.42 | 5.29 | 5.12 | 6.42 | 5.12 | 5.27 |
| 4 | 6.0 | 6.14 | 6.0 | 5.14 | 5.14 | 6.29 | 5.14 | 5.30 |
| | CONTROLES | | | | | | | |
| 5 | 5.0 | 4.81 | 4.6 | 5.67 | 5.51 | 6.79 | 5.67 | 5.84 |
| 6 | 6.2 | 6.49 | 6.01 | 5.95 | 5.95 | 7.08 | 5.62 | 5.77 |

TABLA 16. Cromatosis Concentraciones de Hemoglobina (g./100 ml.) en los ovinos durante el tiempo de experimentación.

| Animal No. | Tiempo de Experimentación (días) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Previo al consumo | | | Consumo | | | | |
| | 1 | 7 | 13 | 2 | 9 | 18 | 28 | 37 |
| | GRUPO PROBLEMA | | | | | | | |
| 1 | 12.5 | 12.5 | 12.2 | 9.56 | 8.97 | 8.8 | 8.89 | 7.4 |
| 2 | 8.3 | 8.5 | 8.1 | 8.22 | 8.2 | 10.2 | 9.0 | 8.8 |
| 3 | 7.4 | 7.3 | 7.6 | 7.35 | 6.9 | 8.2 | 6.75 | 7.0 |
| 4 | 7.7 | 8.1 | 7.9 | 6.9 | 6.8 | 8.1 | 6.0 | 6.4 |
| | CONTROLES | | | | | | | |
| 5 | 5.8 | 6.0 | 5.8 | 8.2 | 7.13 | 8.5 | 7.75 | 7.8 |
| 6 | 8.0 | 8.7 | 7.8 | 8.1 | 8.3 | 8.0 | 7.9 | 8.1 |

TABLA 17. Cromatosis. Volúmen corpúscular medio ( micras$^3$ ) de los glóbulos rojos de los ovinos durante el tiempo de experimentación.

| Animal No. | Tiempo de Experimentación (días) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Previo al consumo | | | Consumo | | | | |
| | 1 | 7 | 13 | 2 | 9 | 18 | 28 | 37 |
| | GRUPO PROBLEMA | | | | | | | |
| 1 | 43.4 | 43.7 | 42.4 | 40.6 | 40.2 | 41.5 | 38.7 | 42.1 |
| 2 | 42.4 | 44.8 | 45.9 | 44.7 | 44.3 | 44.3 | 45.1 | 42.3 |
| 3 | 43.4 | 42.7 | 47.0 | 43.5 | 43.0 | 45.6 | 43.0 | 42.13 |
| 4 | 43.8 | 43.5 | 43 | 41 | 41 | 45.1 | 41 | 42 |
| | CONTROLES | | | | | | | |
| 5 | 44 | 42 | 45.6 | 44.1 | 43.6 | 42.4 | 44.1 | 42.4 |
| 6 | 43.4 | 43.1 | 44 | 42 | 42 | 42.8 | 41 | 42.1 |

TABLA 18. Cromatosis. Hemoglobina corpuscular media ( micro-microgramos ) de los ovinos durante el tiempo de experimentación.

| Animal No. | Tiempo de Experimentación (días) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Previo al consumo | | | Consumo | | | | |
| | 1 | 7 | 13 | 2 | 9 | 18 | 28 | 37 |
| | GRUPO PROBLEMA | | | | | | | |
| 1 | 14.2 | 14 | 15.9 | 13.4 | 12.9 | 12 14 | 13.8 | 12.5 |
| 2 | 12.5 | 12.8 | 13.3 | 13.1 | 13.5 | 11.7 | 14 | 12.9 |
| 3 | 12.7 | 12.5 | 13.3 | 13.9 | 13.5 | 12.8 | 13.2 | 13.3 |
| 4 | 12.8 | 13.1 | 13.1 | 13.4 | 13.2 | 12.9 | 11.7 | 12.1 |
| | CONTROLES | | | | | | | |
| 5 | 11.6 | 12.4 | 12.6 | 14.5 | 12.9 | 12.5 | 13.7 | 13.5 |
| 6 | 12.9 | 13.4 | 12.9 | 13.6 | 13.9 | 11.3 | 14 | 14 |

TABLA 19. Cromatosis. Concentración media de Hemoglobina corpuscular (%) en los ovinos durante el tiempo de experimentación.

| Animal No. | Tiempo de Experimentación (días) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Previo al consumo | | | Consumo | | | | |
| | 1 | 7 | 13 | 2 | 9 | 18 | 28 | 37 |
| | GRUPO PROBLEMA | | | | | | | |
| 1 | 32.7 | 32.1 | 37.4 | 33 | 32 | 29.5 | 35.6 | 29.6 |
| 2 | 28.8 | 28.5 | 28.9 | 29.3 | 30.5 | 26.4 | 31 | 30.6 |
| 3 | 29.3 | 29.2 | 29.6 | 31.9 | 31.4 | 27.9 | 30.7 | 31.5 |
| 4 | 29.3 | 30.3 | 30.6 | 32.9 | 32.4 | 28.5 | 28.6 | 28.2 |
| | CONTROLES | | | | | | | |
| 5 | 26.4 | 29.7 | 27.6 | 32.8 | 29.7 | 29.5 | 31 | 31.7 |
| 6 | 29.7 | 30.5 | 29.5 | 32.3 | 33.2 | 26.4 | 34.3 | 33.3 |

TABLA 20. Cromatosis. Recuento total de glóbulos blancos (X $10^3$/ m.m.$^3$ ) en los ovinos durante el tiempo de experimentación.

| Animal No | Tiempo de Experimentación (días) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Previo al consumo | | | Consumo | | | | |
| | 1 | 7 | 13 | 2 | 9 | 18 | 28 | 37 |
| | GRUPO PROBLEMA | | | | | | | |
| 1 | 6.2 | 7.8 | 7.4 | 5.25 | 5.0 | 6.3 | 5.25 | 5.2 |
| 2 | 4.2 | 3.1 | 15.9 | 6.8 | 4.4 | 19.6 | 4.65 | 4.6 |
| 3 | 6.8 | 7.0 | 9.8 | 7.25 | 5.5 | 5.1 | 5.2 | 5.0 |
| 4 | 4.2 | 4.2 | 5.6 | 4.2 | 4.95 | 4.1 | 3.7 | 3.7 |
| | CONTROLES | | | | | | | |
| 5 | 4.5 | 4.2 | 5.1 | 6.35 | 5.05 | 5.0 | 5.3 | 5.4 |
| 6 | 4.3 | 4.2 | 5.4 | 4.3 | 5.3 | 4.9 | 4.0 | 4.0 |

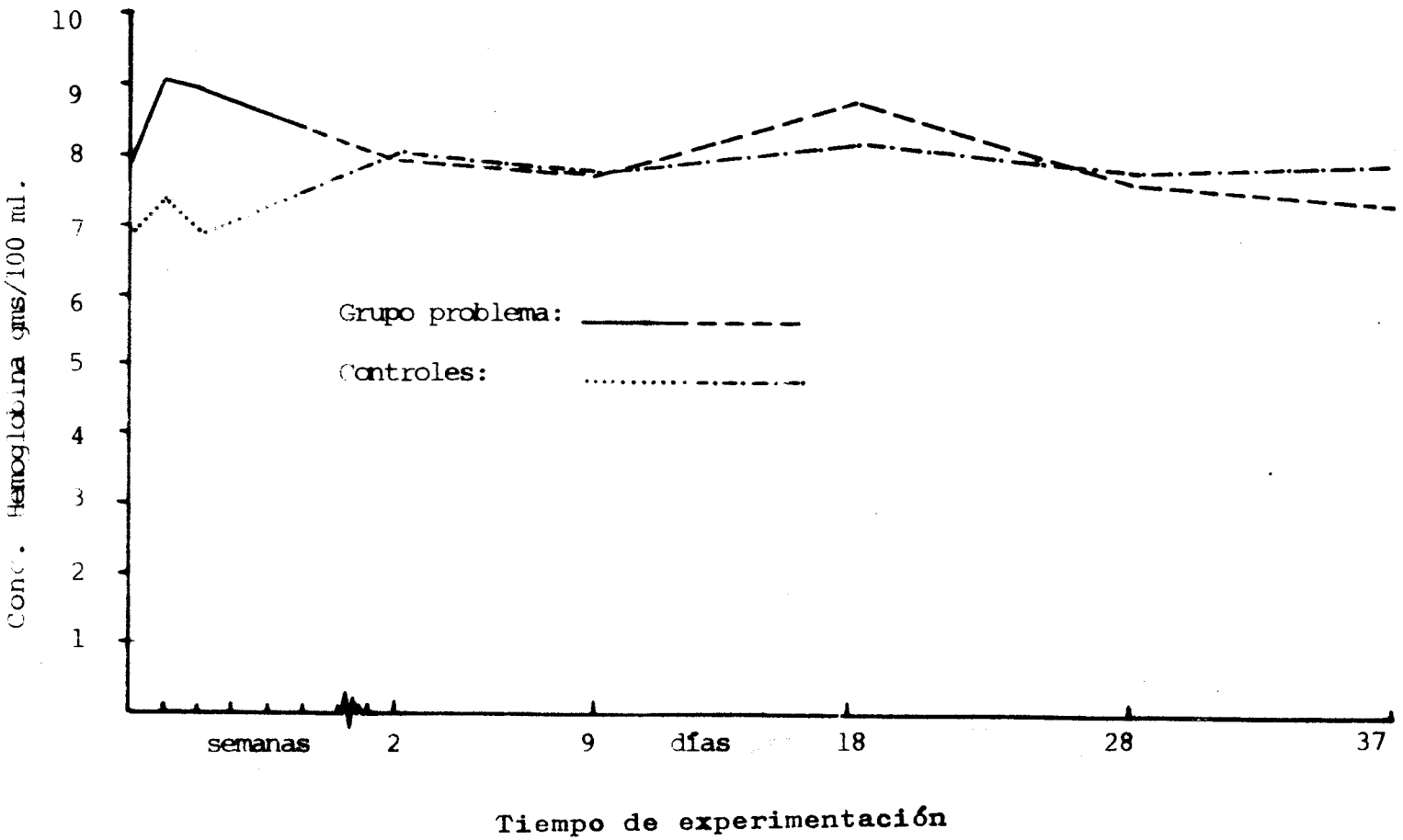



**FIGURA Nº 17** **Cromatosis, reproducción experimental en ovinos. Concentraciones de hemoglobina en los animales durante el tiempo de experimentación.**

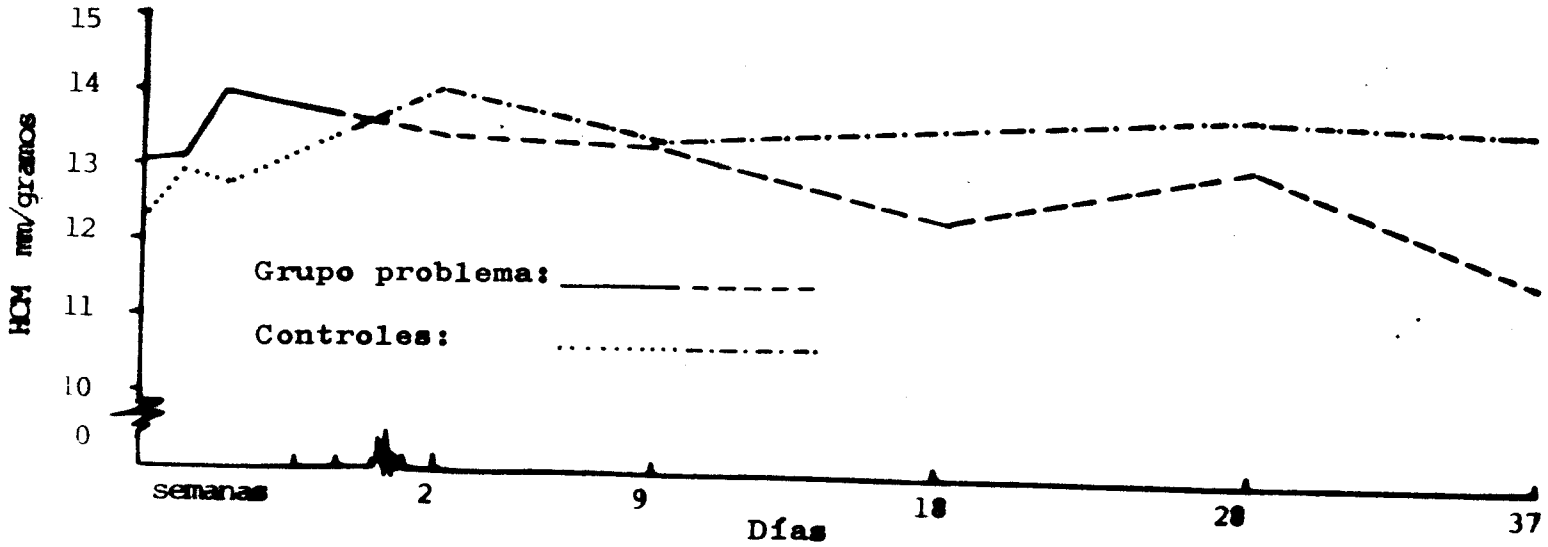



FIGURA Nº 18 Cromatosis, reproducción experimental en ovinos. Hemoglobina corpuscular media en los animales durante el tiempo de experimentación.

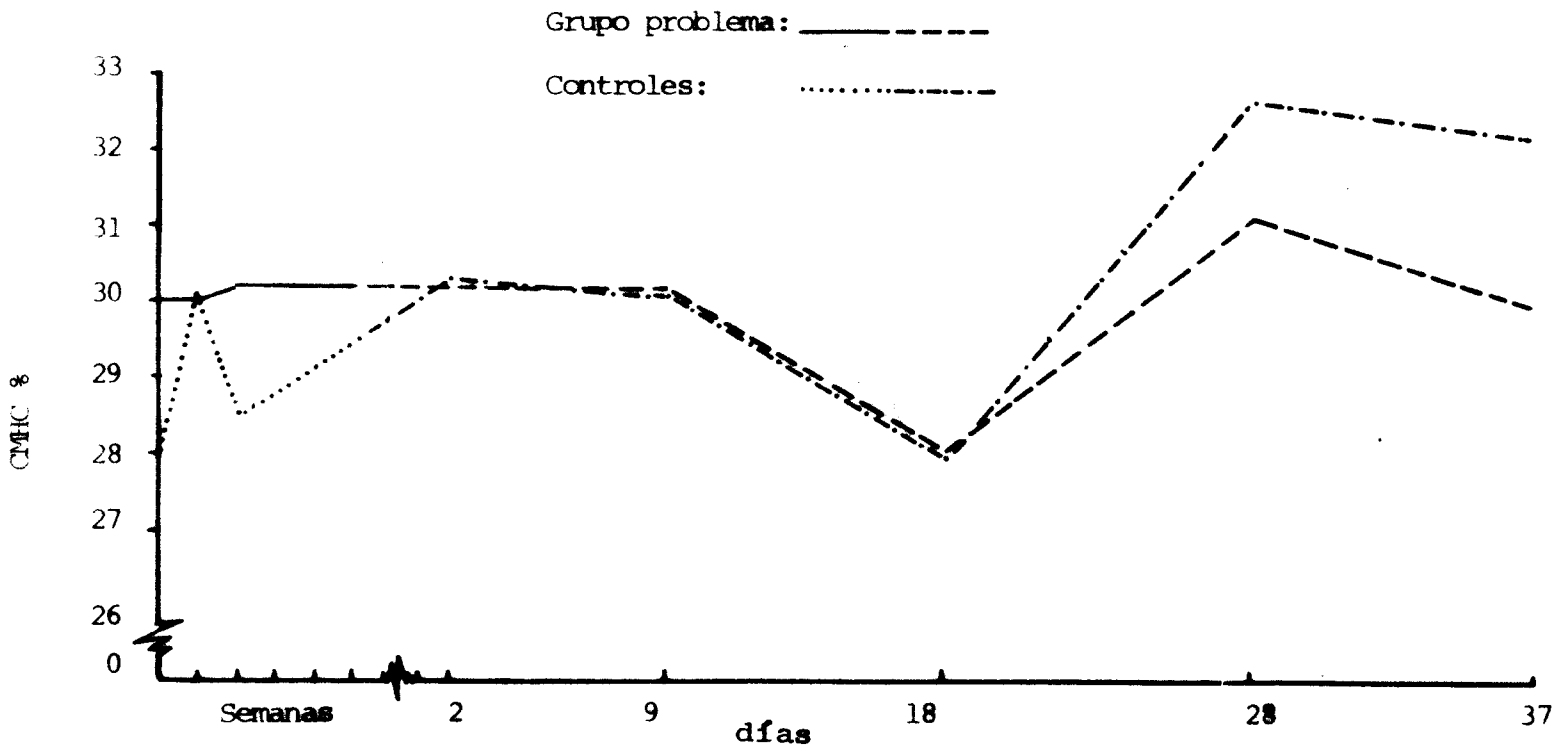



**FIGURA Nº 19** Croamtosis, reproducción experimental en ovinos. Concentración media de hemoglobina corpuscular en lo animales de experimentación.

En la tabla 19 se puede observar que el volúmen corpuscular permaneció constante durante el tiempo de experimentación, tanto en los ovinos del grupo problema como en los controles. Sin embargo, la concentración de hemoglobina corpuscular media y la concentración media de hemoglobina corpuscular descendieron en los ovinos del grupo problema, según se puede observar en las tablas 18 y 19, figuras 18 y 19, desde el día 9; se hizo más acentuada hacia el día 18 y presentaron una recuperación hacia el día 28 (En las gráficas, la escala de tiempo está dada en semanas y posteriormente en días, luego los días 9, 18 y 28, corresponden realmente a los días 17, 25 y 35 respectivamente, de iniciado el consumo de la planta). Se observa de nuevo un descenso en los niveles de concentraciones de hemoglobina hacia el día 37 (que corresponde realmente al día 44 de iniciado el consumo de la planta problema).

En los ovinos del grupo control, los niveles permanecieron constantes.

La hemoglobina corpuscular media, está indicando que cada glóbulo rojo tiene en peso, determinado número de micro-microgramos de hemoglobina; la concentración media de hemoglobina corpuscular indica que porcentaje del peso del glóbulo rojo es hemoglobina (69).

A pesar de notarse un aumento de hemoglobina hacia los mismos días para el grupo problema, según se observa en la figura 17, también aumenta considerablemente el hematocrito (figura 16). Quiere decir que hay más hemoglobina para ser distribuída entre un mayor número de glóbulos rojos. Luego ese pico en la curva de hemoglobina hacia el día 18, no implica un descenso en el peso y porcentaje de la misma en los glóbulos rojos de los ovinos del grupo problema, en comparación con los datos obtenidos para los ovinos del grupo control.

Aunque los descensos en estos parametros dentro de los lapsos descritos no son muy acentuados, están revelando un descenso en la concentración de hemoglobina de los glóbulos rojos, es decir una tendencia hacia una hipocromía de las células, sin variaciones en su tamaño. Se podría pensar en una alteración de la síntesis de hemoglobina aunque muy leve.

#### 4.2.4.1.1 Análisis de Cofactores vinculados a la Síntesis de Hemoglobina

Es necesario especular sobre las determinaciones de cofactores como el hierro, el cobre y el cobalto, cuya deficiencia puede ocasionar alteraciones en la síntesis de hemoglobina (17, 97).

##### 4.2.4.1.1.1 Cobalto

Aunque no se realizaron determinaciones de cobalto por carencia de la infraestructura necesaria, es conocido que la carencia de este elemento causa anemia de tipo macrocítica normocrómica (17).

La carencia de cobalto se acompaña de un descenso de los niveles de vitamina B12 (17). Hasta la fecha se conocen más o menos 12 reacciones dependientes de la vitamina B12 (8). En rumiantes con carencia de cobalto, se desarrolla una anemia marcada y en los ovinos la morfología de los glóbulos rojos revela una anemia aplástica que evoluciona con poiquilocitosis y policromasia (17).

Ninguna de las alteraciones descritas se observó en los ovinos de experimentación. Se puede descartar la posibilidad

de una alteración en la síntesis de hemoglobina por deficiencia de este elemento.

4.2.4.1.1.2 Cobre

En la tabla Nº 21, Figura 20, se pueden observar los valores de los niveles de cobre durante el tiempo de experimentación. No se presentaron variaciones significativas.

El cobre es un componente esencial de varias proteínas, muchas de ellas enzimas. El cobre se encuentra en los glóbulos rojos de la sangre de los rumiantes en forma de un complejo formando una hemoproteína, pero en esta el contenido de cobre es de solo 0.34%. La sangre de los rumiantes posee 1 microgramo de esta proteína por ml. (16)

En el plasma, el cobre se encuentra en dos formas principales: una corresponde a un complejo cobre-proteína llamada ceruloplasmina, la proteína corresponde a una alfa-globulina. En condiciones normales la oveja posee cerca del 80 % del cobre en el plasma en esta forma (97).

La otra parte del cobre sérico se encuentra ligado a una proteína probablemente seroalbúmina; se considera que esta es la forma de transporte (87).

En los glóbulos rojos, se encuentra formando una hemoproteína la cual contiene 0.34% de cobre (87, 97).

El cobre figura como componente de citocromo-oxidasas y monoaminoxidasas (16).

TABLA 21. Cromatosis. Concentraciones de cobre sérico ( microgramos/100 ml.) en los ovinos durante el tiempo de experimentación.

| Animal No | Tiempo de Experimentación (días) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Previo al consumo | | Consumo | | | |
| | 1 | 14 | 24 | 45 | 55 | 64 |
| | | | GRUPO PROBLEMA | | | |
| 1 | 96.9 | 94.5 | 90.72 | 92.7 | 98.7 | 121.64 |
| 2 | 111.46 | 110.5 | 115.46 | 108.4 | 101.0 | 105.15 |
| 3 | 119.54 | 134.8 | 169.1 | 140.48 | 119.6 | 140.2 |
| 4 | 105.15 | 105.1 | 109.28 | 101.18 | 92.78 | 76.3 |
| | | | CONTROLES | | | |
| 5 | 84.53 | 85.3 | 84.53 | 120.5 | 164.4 | 119.58 |
| 6 | 109.28 | 102.8 | 94.84 | 93.45 | 92.78 | 76.3 |

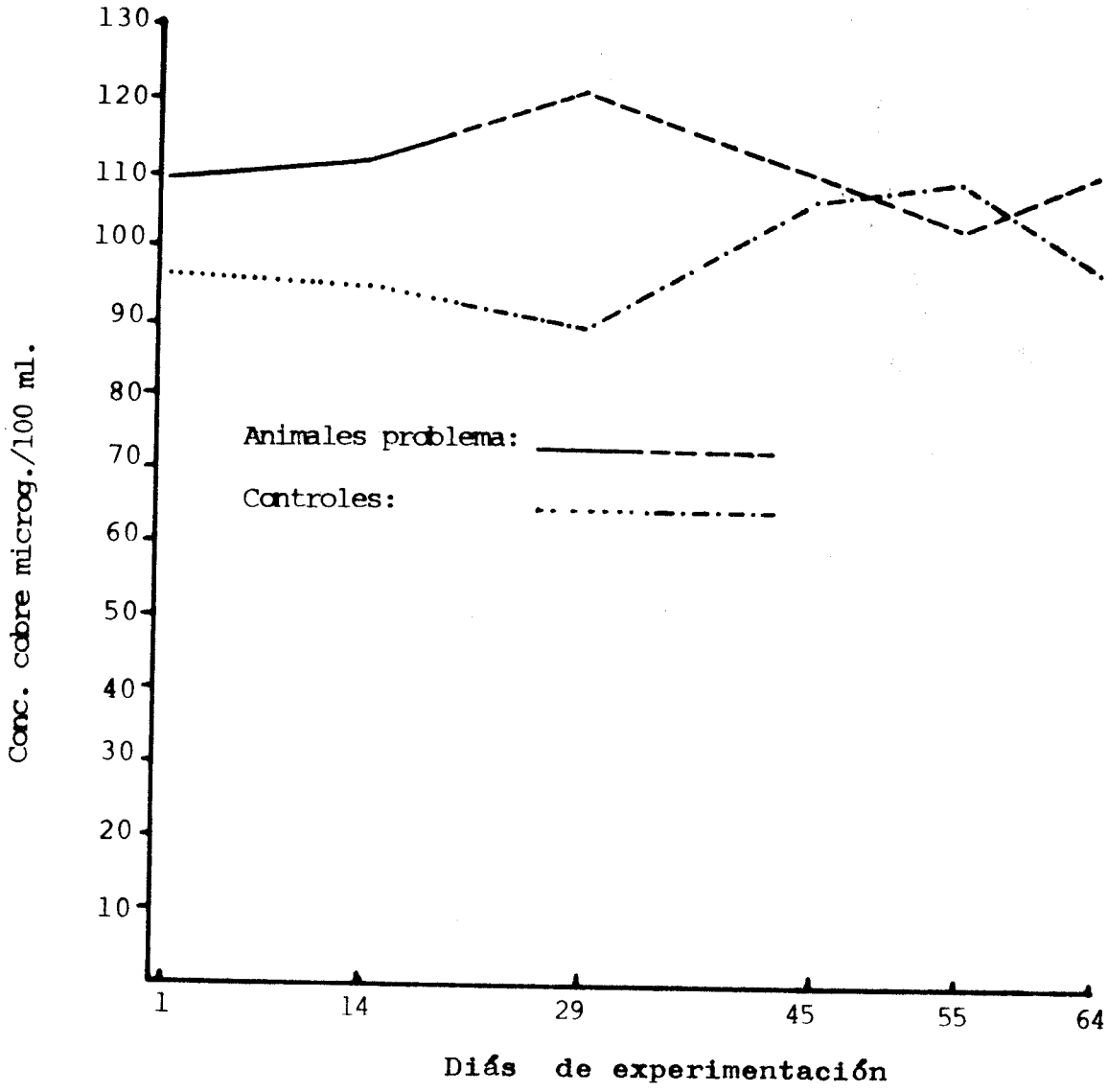



FIGURA Nº 20 Cromatosis, reproducción experimental en ovinos. Concentraciones séricas de cobre en los ovinos durante el tiempo de experimentación.

Hasta 1978, la literatura no registra información sobre los mecanismos de absorción del cobre en los rumiantes (36). Según Starcher, existe un complejo entre proteina y cobre en las células de la mucosa del duodeno, demostrado por lo menos para las aves la cual tiene parte importante en el mecanismo de absorción del metal (87).

El molibdeno y el sulfato inorgánico reducen la retención del cobre ingerido y aumentan su excreción (97).

El cobre absorbido por el intestino entra en el plasma sanguíneo y se liga débilmente a la seroalbúmina, es distribuído a los diversos tejidos y puede pasar rápidamente a los eritrocitos (36).

En el hígado, que es el principal órgano relacionado con su metabolismo, se incorpora a las mitocondrias, microsomas, núcleo y citosol, como parte de las enzimas que lo contienen (97).

La ceruloplasmina que es una alfa-globulina, es sintetizada en el hígado y secretada en el suero; la hemoproteína que lo contiene es sintetizada en el normoblasto de la médula osea (36).

El efecto de la deficiencia de cobre sobre la síntesis de hemoglobina se puede llevar a cabo sobre la síntesis de protoporfirina y heme o de globina, o deberse a afecciones sobre el metabolismo del hierro. La explicación exacta aún no es clara (14, 15, 36, 51).

Se ha demostrado que la deficiencia de cobre en ratas y cerdos impide la movilización de hierro de los depósitos orgánicos de éste al plasma (52).

Como puede observarse, no se presentaron variaciones significativas en bs niveles de cobre de ambos grupos, con respecto a los niveles iniciales (tabla 21, figura 20).

Según Underwod (1971), se necesitan valores séricos persistentes mínimos de cobre de 10 a 12 microgramos/ml. para que se presente la anemia (97), la cual es de tipo microcítico hipo - crómico (17).

De los datos obtenidos y de los análisis planteados, no hay evidencia de que el cobre esté comprometido en las manifestaciones clínicas observadas.

4.2.4.1.2.3 Hierro

En la tabla 22, figura 21, se presentan los valores de los niveles de hierro sérico obtenidos durante el tiempo de experimentación.

Se observa una elevación bastante marcada de los niveles de hierro sérico en los ovinos del grupo problema hacia el día 9 de iniciado el consumo de la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida) (Nota: el día 29 en la gráfica corresponde al día 9 de iniciado el consumo de la planta), alcanzando un máximo hacia el día 55 de experimentación (35 de iniciado el consumo de la planta) y presenta un descenso hacia el día 64 (44 de iniciado el consumo de la planta problema).

Se nota una diferencia bastante marcada entre los niveles de hierro sérico de los ovinos del grupo problema con respecto a los controles, lo mismo que con respecto a los niveles previos a la iniciación del consumo de la planta problema.

TABLA 22. Crometosis. Concentraciones séricas de hierro (microgramos/100 ml.) en ovinos durante el tiempo de experimentación.

| Animal No | Tiempo de Experimentación (días) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Previo al consumo | Consumo | | | | |
| | 1 | 14 | 24 | 45 | 55 | 64 |
| | GRUPO PROBLEMA | | | | | |
| 1 | 114.14 | 115 | 117.3 | 200.68 | 264.05 | 140.97 |
| 2 | 110.99 | 140.08 | 176.16 | 175.0 | 176.8 | 136.6 |
| 3 | 47.87 | 86.27 | 104.67 | 82.5 | 60.49 | 159.9 |
| 4 | 146.23 | 127.56 | 108.88 | 190.78 | 276.68 | 247.75 |
| | CONTROLES | | | | | |
| 5 | 83.63 | 93 | 103.62 | 103.35 | 103.8 | 71.54 |
| 6 | 101.52 | 101.84 | 104.15 | 118.0 | 119.46 | 110.98 |

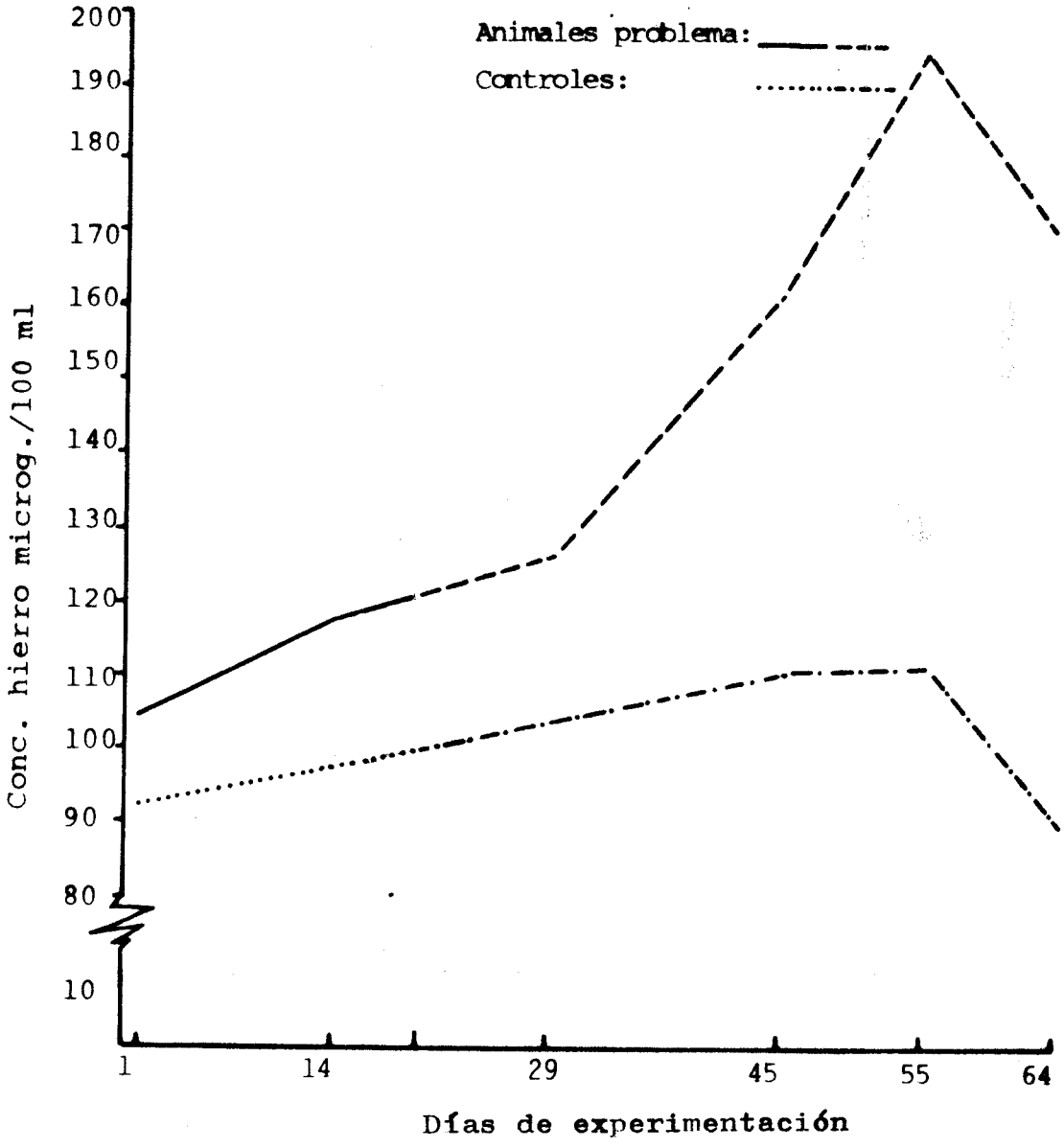



FIGURA Nº 21 Cromatosis, reproducción experimental en ovinos. Concentraciones de hierro sérico en los animales durante el tiempo de experimentación.

Considerando que ambos grupos de animales tuvieron una dieta básica igual, las diferencias observadas en losniveles de hierro sérico entre ambos grupos se atribuyen al consumo de la planta problema.

Para inferir acerca de un posible mecanismo fisiológico alterado que ocasione tales elevaciones de hierro sérico, se debe realizar una discusión acerca de los conocimientos actuales del metabolismo del hierro.

El hierro en el organismo animal se encuentra en formas complejas con proteínas, como compuestos Heme (hemoglobina, mioglobina), como enzimas (citocromos, catalasa, peroxidasa), o como compuestos no heme (enzimas flavin-Fe, transferrina y ferritina) (8, 97).

El papel del hierro en el organismo animal está confinado casi exclusivamente a los procesos de respiración celular en donde el oxígeno molecular es almacenado y transportado entre los átomos de hierro presentes en la hemoglobina y en la mioglobina (8, 97).

La conservación del balance del hierro depende principalmente de mecanismos que controlan una absorción excesiva, pues las vías de eliminación son muy limitadas (62, 79).

El desbalance observado en el hierro sérico debe estar relacionado con dos mecanismos : o una interferencia en la utilización del hierro en mayor o menor grado, o una absorción excesiva originada por una alteración de los mecanismos propuestos hasta el moemtno para la conservación de la homeostasis del

hierro, en favor de una absorción aumentada. También podría pensarse en una combinación de ambos mecanismos.

Se han propuesto tres mecanismos que controlan la absorción del hierro. Granick (1949), citado por Robbins, propuso la teoría del bloqueo de la mucosa, en células intestinales donde el hierro es absorbido (79).

Se propuso que en estas células se sintetiza una proteína fijadora de hierro: apoferritina. La apoferritina saturada con hierro se transforma en ferritina, en esta forma puede pasar la mucosa intestinal y llegar a la circulación, donde el hierro es transferido a una beta-1-globulina denominada transferrina, la cual transporta el hierro a los tejidos. El bloqueo consiste en que la saturación de la apoferritina limita la absorción de hierro y este solo se realiza cuando la ferritina (apoferritina saturada) transfiere el hierro a la transferrina y queda libre para ser saturada nuevamente con hierro (79).

Manis y Schachter (1962) y Boender y Verloop (1962) citados por Robbins proponen una teoría de fondos comunes. En una de ellas, el hierro sería transferido rápidamente desde la luz intestinal hasta la transferrina, ello explicaría la capacidad de transportar hierro rápidamente luego de absorbido; es un sistema activo dependiente de energía (79).

El otro fondo común implicaría un recambio más lento con un almacenaje de hierro en la mucosa, probablemente en complejo con apoferritina (79).

Wheby y Jones (1963), citados por Robbins, proponen la existencia de "hierro mensajero". El "hierro mensajero" se encontraría

en las células intestinales ejerciendo la absorción desde el intestino y liberándolo en el plasma, de acuerdo con las necesidades corporales (79).

Aunque la detección y diagnóstico del estado férrico en rumiantes debe comprender un exámen de la capacidad de fijación, porcentaje de saturación (62, 90), el cual nos daría una idea de cuál parte del mecanismo está fallando, el método empleado en los análisis del presente trabajo está contabilizando el total de hierro, ya que en la metodología para su determinación, el hierro es liberado de proteínas y luego reducido y transformado en un compuesto específico único que desarrolla un color proporcional a la cantidad de hierro (7).

Podría plantearse que la planta contiene un compuesto que formaría un quelato en la luz intestinal, y que su abosrción conllevaría la absorción del hierro, independientemente de los mecanismos; ello no explicaría el aumento progresivo y el luego el descenso observado hacia los últimos días de experimentación.

Otro mecanismo planteado podría corresponder a una liberación del hierro del complejo transferrina hierro en la corriente sanguínea, por una de los compuestos contenidos en la planta mamei - tomatillo (Bunchosia pseudonítida), ello tampoco explicaría los niveles progresivos de hierro sérico en los ovinos del grupo problema.

Del total de hierro, la hemoglobina contiene 60%, la mioglobina 3%. Un 25% se encuentra como ferritina y hemosiderina en hígado, bazo, medula ósea y otros tejidos (90, 101).

Otro mecanismo que ocasione niveles altos de hierro implicaría un impedimento de la fijación de hierro en una o varios de los compuestos citados anteriormente.

Tanto para la hemoglobina como para la mioglobina, la no incorporación de hierro dentro del anillo de protoporfirina para formar el compuesto heme (Figura 15) implicaría una interferencia sobre la ferroquelatasa que es la enzima encargada del proceso.

Para este efecto, podrían plantearse dos alternativas : la primera está relacionada con la carencia de sustancias reductoras como el ácido ascórbico, cisteína o glutatión, los cuales se ha comprobado que son indispensables para el funcionamiento de la enzima (56, 76). En este caso, el consumo de la planta estaría ocasionando la carencia o la alteración de uno o varios de éstos compuestos reductores.

Otra alternativa podría consistir en que la planta por sí proporcionará los metales al organismo, los cuales alterarían la selectividad de la enzima por el hierro. Esta consideración se efectúa con base en investigaciones que demuestran que el cobalto y el zinc son incorporados a la protoporfirina e inhiben la incorporación del hierro (41, 48, 99). In vitro se ha demostrado que muchos cationes divalentes inhiben la actividad de la feroquelatasa (42, 40).

La presencia de uroporfirinas y coproporfirinas en altas concentraciones en la orina está indicando una alteración de la vía metabólica del heme. Aunque la mayoría de estudios revisados emplean sistemas relacionados principalmente con la formación de hemoglobina, es probable que las etapas enzimáticas de la biosíntesis de heme son las mismas aunque esta fracción esté destinada

a ser componente de la hemoglobina, mioglobina, triptofano - oxigenasa, catasala o citocromos mitocondriales o microsomales. (84). Se deduce que no necesariamente esté alterada la síntesis de heme destinado a formar parte de la hemoglobina.

Como se discutirá posteriormente, se plantea una acción inhibitoria sobre la enzima uroporfirinógeno de carboxilada por parte de un compuesto contenido en la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida). Esta inhibición ocasionaría niveles altos de uroporfirinas y coproporfirinas. Estudios realizados por Labbe (1963) demuestran que éstos compuestos no sirven como sustratos para la incorporación de hierro en una reacción catalizada por la ferroquelatasa (50).

El mecanismo propuesto implicaría bajos niveles de heme y un mecanismo de represión de la enzima delta-aminolevulínico sintetasa (ALA-sintetasa) acompañada por un sistema de retroalimentación, lo cual explicaría los niveles progresivos y luego regresivos de hierro sérico en los ovinos de experimentación que consumieron la planta problema.

Las concentraciones altas de hierro en el suelo se producen cuando existen alteraciones de las células del parénquima hepático. En hepatitis aguda se producen altas concentraciones de hierro sérico (8).

El daño o disfunción de membranas de organelos celulares hepáticas podría jugar un papel importante en las alteraciones de las funciones enzimáticas puesto que ALA-sintetasa se encuentra ubicada en la matriz mitocondrial o unida a la membrana interna de la mitocondria (71), y la ferroquelatasa está fuertemente unida a la membrana interna de la mitocondria (64).

4.2.4.2 Comparación con una Porfiria hepática

4.2.4.2.1 Pruebas de funcionamiento hepático

En la tabla 23, figura 22, se presentan los valores de los niveles de Gamma-glutamil transferasa en los ovinos durante el tiempo de experimentación.

Se puede apreciar que en losovinos del grupo problema hay un aumento progresivo de los niveles enzimáticos de Gamma glutamil transferasa en el suero, a partir del día 9 (29 en la gráfica) de iniciado el consumo de la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida), con respecto a los niveles enzimáticos en el suero de los ovinos controles.

Los datos obtenidos para los niveles de la enzima Gamma glutamil transferasa, como parámetro para establecer una alteración hepática, contrastan con los datos obtenidos para las transaminasas SGPT* y SGOT** presentados en las tablas 24 y 25. Figuras 23 y 24, respectivamente. En las transaminasas solo se registran variaciones muy leves en los niveles de SGOT entre la segunda y la sexta semana de iniciado el consumo de la planta problema, en los ovinos que la consumieron, con respecto a los controles; no se observan sin embargo, variaciones dentro de los niveles de ésta enzima en el grupo problema en estos datos a partir de la segunda semana de iniciado el consumo de la planta problema, con respecto a los niveles iniciales en los mismos animales.

---

* Nomenclatura actual : Alanina aminotransferasa.

** Nomenclatura actual : Aspartato aminotransferasa (7).

TABLA 23. Cromatosis. Concentraciones séricas de Gamma-glutamil transferasa (mU./ml.) en los ovinos durante el tiempo de experimentación.

| Animal No. | Tiempo de Experimentación (días) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Previo al consumo | Consumo | | | | |
| | 1 | 14 | 29 | 45 | 55 | 64 |
| | GRUPO PROBLEMA | | | | | |
| 1 | 25.5 | 24.5 | 24.5 | 39.5 | 44.5 | 42 |
| 2 | 41 | 41 | 42.5 | 47.5 | 58.5 | 47 |
| 3 | 28.5 | 28 | 29 | 40 | 43.5 | 50 |
| 4 | 33 | 32.5 | 35.5 | 51.5 | 65.5 | 67.5 |
| | CONTROLES | | | | | |
| 5 | 23 | 21 | 21 | 23 | 25 | 22 |
| 6 | 64.5 | 42 | 43.5 | 42 | 42.5 | 41.5 |

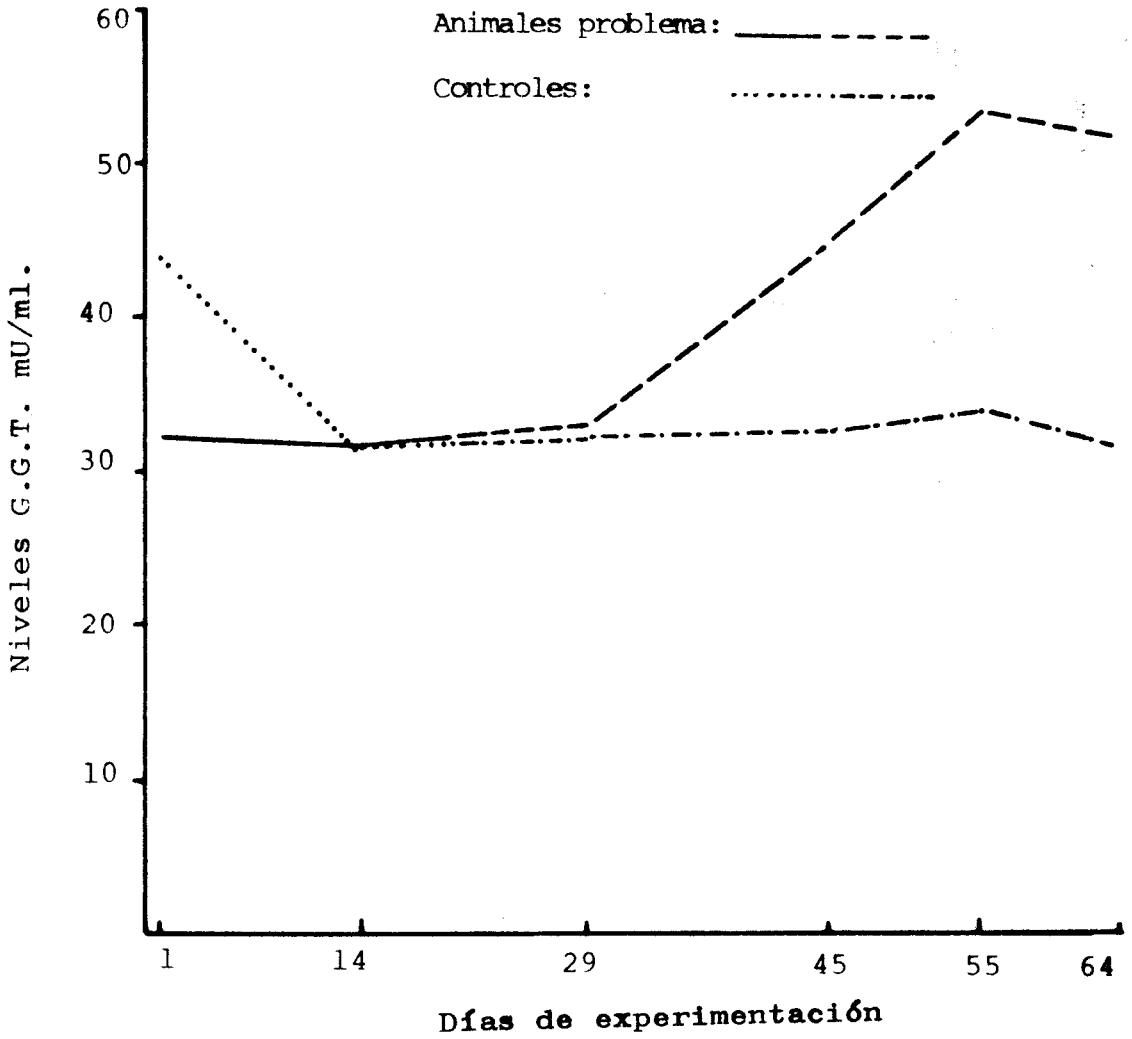



FIGURA Nº 22 Cromatosis, reproducción experimental en ovinos. Concentraciones séricas de gamma-glutamil transferasa en los animales durante el tiempo de experimentación.

TABLA 24. Cromatosis. Concentraciones séricas de transaminasa SGPT (U./100 ml.) en los ovinos durante el tiempo de experimentación.

| Animal No. | Tiempo de Experimentación (días) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Previo al consumo | | | | Consumo | | | | | | |
| | 1 | 9 | 17 | 24 | 4 | 9 | 16 | 25 | 31 | 35 | 44 |
| | GRUPO PROBLEMA | | | | | | | | | | |
| 1 | 15 | 27 | 28 | 30 | 33 | 18 | 15 | 20 | 18 | 19 | 17 |
| 2 | 20 | 24 | 24 | 23 | 24 | 16 | 8 | 19 | 20 | 13 | 14 |
| 3 | 22 | 12 | 18 | 22 | 24 | 22 | 8 | 17 | 16 | 17 | 15 |
| 4 | 31 | 27 | 24 | 25 | 24 | 22 | 27 | 24 | 25 | 13 | 18 |
| | CONTROLES | | | | | | | | | | |
| 5 | 14 | 15 | 18 | 19 | 26 | 22 | 17 | 22 | 20 | 19 | 18 |
| 6 | 6 | 13 | 14 | 18 | 19 | 18 | 13 | 15 | 13 | 12 | 14 |

TABLA 25. Cromatosis. Concentraciones séricas de transaminasa SGOT (U./100 ml.) en los ovinos durante el tiempo de experimentación.

| Animal No. | Tiempo de Experimentación (días) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Previo al consumo | | | | Consumo | | | | | | |
| | 1 | 9 | 17 | 24 | 4 | 9 | 16 | 25 | 31 | 35 | 44 |
| | GRUPO PROBLEMA | | | | | | | | | | |
| 1 | 122 | 85 | 76 | 80 | 69 | 75 | 82 | 73 | 65 | 54 | 58 |
| 2 | 83 | 87 | 85 | 87 | 92 | 75 | 64 | 83 | 74 | 68 | 62 |
| 3 | 73 | 62 | 68 | 70 | 75 | 65 | 55 | 68 | 60 | 59 | 61 |
| 4 | 83 | 59 | 55 | 56 | 55 | 54 | 52 | 64 | 58 | 54 | 53 |
| | CONTROLES | | | | | | | | | | |
| 5 | 76 | 78 | 66 | 72 | 62 | 60 | 54 | 76 | 68 | 54 | 55 |
| 6 | 94 | 101 | 95 | 90 | 94 | 85 | 78 | 94 | 90 | 115 | 94 |

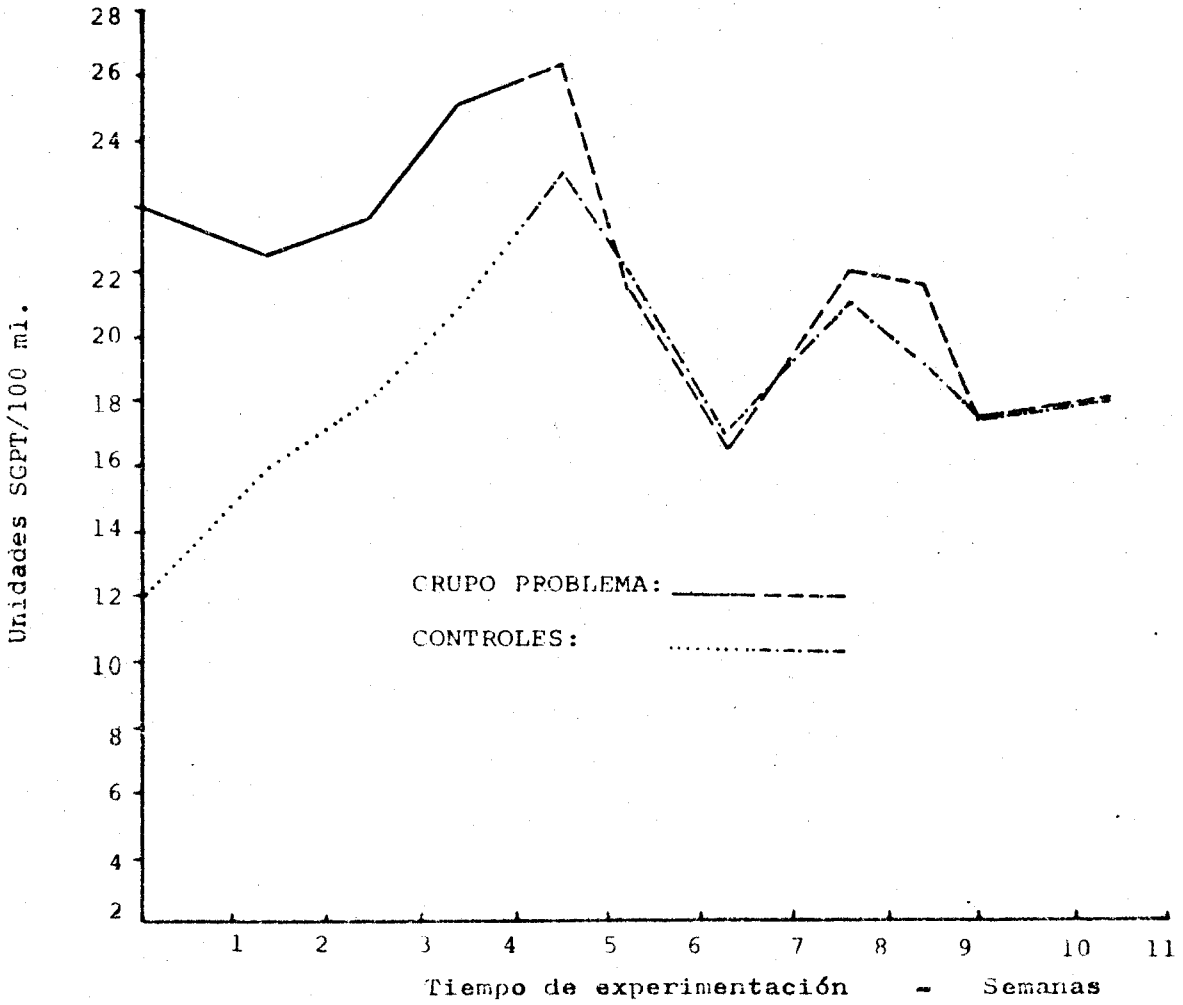
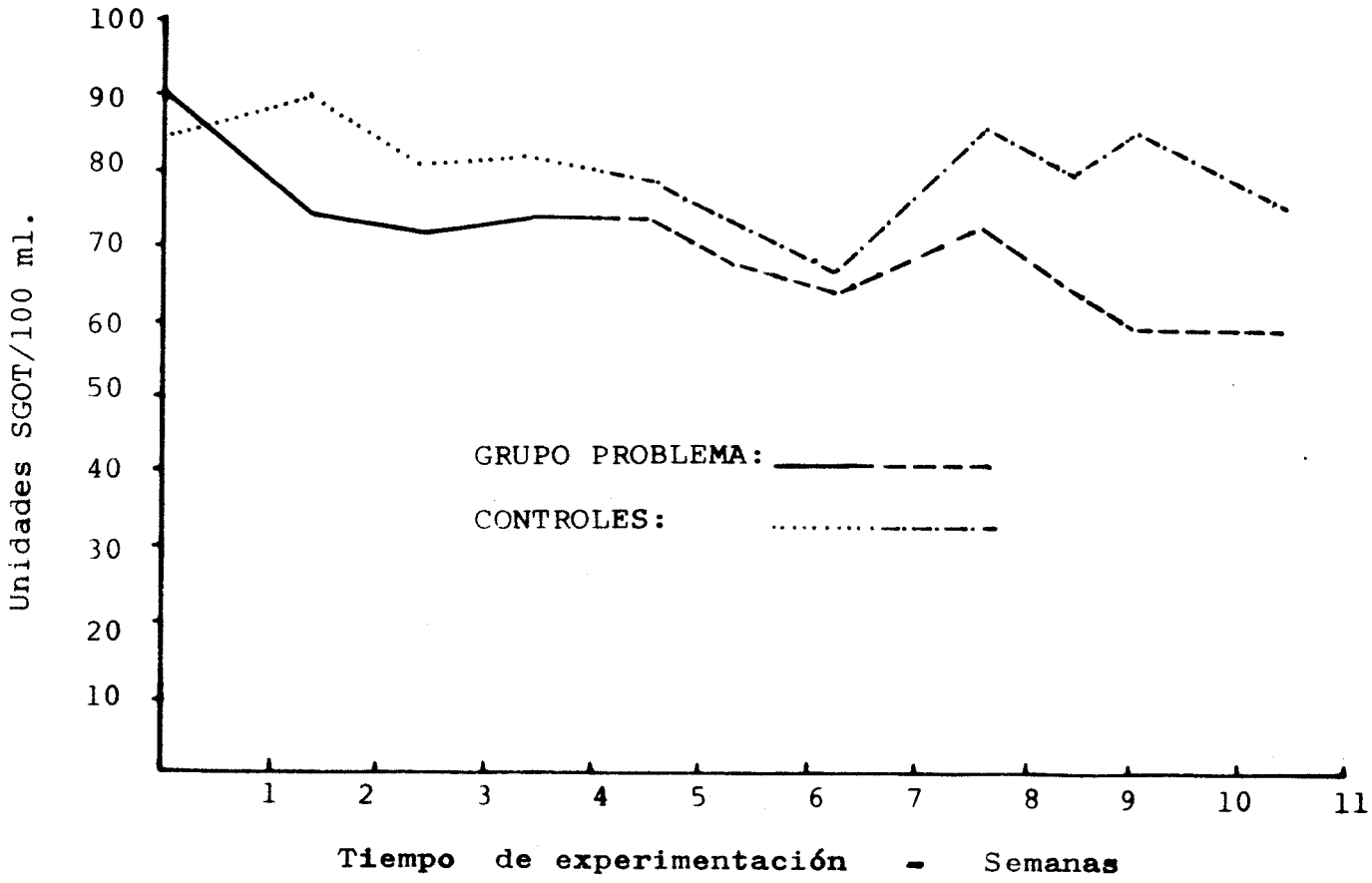



FIGURA Nº 23 Cromatosis, reproducción experimental en ovinos. Concentraciones séricas de SGPT en los animales durante el tiempo de experimentación.




BIBLIOTECA AGROPECUARIA

**FIGURA Nº 24** Cromatosis, reproducción experimental en ovinos. Concentraciones séricas de SGOT en los animales durante el tiempo de experimentación.

Se puede concluír, que los niveles séricos de transaminasas no pueden ser tenidos en cuenta para las especificaciones de daño tisular en que se recomienda su determinación en otras especies. De por sí, la SGPT en los rumiantes no tiene valor diagnóstico en alteraciones hepáticas, pues esta enzima solo alcanza concentraciones considerables en caninos, felinos y primates (7, 17, 65).

Un aumento en los niveles de SGOT en los rumiantes está indicando una variedad de enfermedades de caracter necrótico. En rumiantes, un aumento de actividad enzimática se produce en necrosis hepática, necrosis de Zenker e inanición (17).

Las lesiones de carácter necrótico de miocardio, músculo estriado voluntario o de células hepáticas, permite la salida de grandes cantidades de esta enzima a la sangre y su determinación con referencia al hígado solo puede tenerse en cuenta como tal, si se pueden descartar lesiones en otros tejidos donde la enzima exista en cantidades considerables (7, 65).

A diferencia de la SGPT, la SGOT está presente en una proporción de 50% en el citoplasma y 50% en la mitocondria; aunque no revele necrosis, altos valores de SGOT están indicando daño severo de las células del parénquima hepático (7). En ausencia de necrosis, este efecto se debe a un aumento de permeabilidad de las membranas celulares (17).

La interpretación clínica podría corresponder a la dada para estos análisis enzimáticos en humanos, en los cuales, los niveles circulantes no aumentan cuando el daño celular es puramente funcional. Los niveles aumentan en la circulación solo cuando las células que las contienen han sido afectadas irreversiblemente (101).

El daño hepático de caracter tóxico no produce un cuadro clínico standar en cuanto a alteraciones enzimáticas (7).

Para nuestro caso, la alteración hepática detectada por medio de los análisis de los niveles de G.C.T. están correlacionados con las alteraciones histopatológicas observadas en los hepatocitos de los ovinos del grupo problema.

Estos hallazgos concuerdan con las observaciones realizadas para las aplicaciones clínicas en las cuales se determina Gamma-glutamil transferasa, realizadas para medicina veterinaria por la casa Boehringuer Mannheim en 1982 (7).

Según estas observaciones, el aumento de las concentraciones de G.G.T como alteración enzimática, permaneciendo estables las transaminasas, es indicativo de daño hepático pasajero, inducido por tóxicos o drogas y es de caracter no ictérico (7).

### 4.2.5 Hipótesis sobre mecanismo de acción

#### 4.2.5.1 Mecanismo de inducción-represión

Para inferir sobre un posible sitio de falla metabólica, es necesario entender sobre los sitios de la vía metabólica en que se ha comprobado que se operan mecanismos de control.

En la figura 15 se pueden observar esos sitios. Se ha comprobado que se ejerce un control regulador principal a nivel de ALA- sintetasa (29, 33, 34, 61). A nivel de esta enzima se ejerce un control que afecta el contexto general de la vía metabólica del heme.

Se ha demostrado que el heme como tal induce a un mecanismo

de retroalimentación negativa sobre ALA-sintetasa (33). Para tal mecanismo se han propuesto tres formas :

- Inhibición por retroalimentación sobre la actividad de ALA-sintetasa por el heme.

- Represión por retroalimentación de la síntesis de ALA-sintetasa por el heme.

- Inhibición por el heme, de la transferencia de ALA-sintetasa del citosol al interior de la mitocondria.

Para el primer mecanismo, una explicación es que altas concentraciones de heme formado dentro de la mitocondria, ejercen un efecto inhibitorio sobre ALA-sintetasa.

En el segundo mecanismo, el heme formado podría ejercer un efecto inhibitorio pero no sobre la enzima formada, sino sobre su síntesis, aunque el mecanismo permanece no aclarado (80, 89, 96, 100).

Se ha propuesto un modelo mediante el cual el heme reaccionaría con una sustancia aporepresora para producir una sustancia represora, la cual impediría la síntesis de RNA que codifica para la síntesis de ALA-sintetasa (26, 77, 78).

La tercera posibilidad para un mecanismo regulador propone que el heme puede interferir con la transferencia de la enzima ALA-sintetasa sintetizada, desde los polirribosomas hasta la mitocondria (87).

La deficiencia en la síntesis de heme puede estimular la enzima ALA-sintetasa. Se conoce con certeza que existe una demanda

extramitocondrial de heme para la fabricación de enzimas que lo contienen, tales como catalasa, triptófano pirrolasa y las oxidasas microsomales de función mixta (P-450, P-448, b5). Estos compuestos están comprometidos en el metabolismo de drogas e hidroxilación de hormonas y su contenido total se aumenta considerablemente en respuesta a un gran número de agentes químicos. El heme se "gasta" en la fabricación de estas enzimas, induciéndose por tanto su síntesis (5, 59).

Existen muchos compuestos exógeno y endógenos que afectan ALA-sintetasa dentro de los cuales se destacan el hierro, la glucosa y las hormonas esteroides (10, 30, 31, 38, 43, 44, 60, 88).

Para nuestro caso, dado que se encontraron niveles altos de hierro luego de iniciado el consumo de la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida) por parte de los ovinos del grupo problema, se citará lo relacionado con este metal para establecer hipótesis posteriores.

El hierro quelado en la forma de citrato férrico ejerce un marcado efecto sinergista sobre la inducción de ALA-sintetasa hepática (88) se sugiere que el hierro ejerce un efecto estimulatorio sobre la síntesis de ALA-sintetasa, gracias a una degradación del heme, lo cual conduce a la derepresión de la enzima (19, 81).

El hierro, ejerce además un efecto inhibitorio sobre URO-decarboxilada. Esta enzima aparece inhibida en la porfiria cutánea tardía (46, 47) de cuyas manifestaciones clínicas, la excreción de uroporfirinas y coproporfirinas en altas cantidades coincide con los hallazgos de los ovinos que cons umieron la planta problema.

En las células eritroides se ha demostrado que el heme puede regular su propia síntesis mediante inhibición de la disociación del hierro dela transferrina, lo cual produce una inhibición de la entrada de hierro en los eritrocitos (70, 75).

Aunque la mayoría de mecanismos descritos funcionan tanto para la vía biosintética del heme hepático como eritrocítico, existen algunas diferencias : la hipoxia induce ALA-sintetasa eritrocítica pero no la hepática, lo mismo sucede con la eritropetina (11, 22).

Otra diferencia es que las drogas y químicos que inducen ALA -sintetasa hepática, no lo hacen en el tejido eritropoyético (98).

Por las alteraciones hepáticas determinadas mediante análisis de Gamma glutamil transferasa, las cuales corresponden a las alteraciones vistas al microscopio de luz, se deduce que nuestro caso corresponde a una alteración hepática, sin excluír totalmente una alteración en las células eritroides.

A nivel de ALA-dehidrasa (Figura 15) también pueden darse mecanismos de inducción-represión (9) y aunque no ha sido demostrado, los cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial ejercen mecanismos de control ya que la vía metabólica del heme presenta salida de la mitocondria en las etapas iniciales y entrada de sus metabolitos en las etapas finales (9) (Figura 15).

Se deduce que por algún mecanismo, un compuesto contenido en la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida) como tal, o luego de diversos procesos metabólicos produce una inhibición de la enzima Uroporfirinógeno-decarboxilasa, la cual cataliza la conversión de uroporfirinógeno a coproporfirinógeno; viene como consecuencia la acumulación deuroporfirinas y coproporfirinas y

su detección en la orina. Esta alteración no debe sucederse durante el proceso de "fabricación" de heme destinado a la síntesis de hemoglobina, puesto que no se observaron descensos críticos en sus niveles en los ovinos del grupo problema.

Existe la posibilidad de un efecto estimulatorio sobre la inducción de ALA-sintetasa, puesto que se encontraron altos niveles de hierro sérico, y está demostrado que el hierro tiene una acción sinergista sobre ALA-sintetasa hepática (19, 81, 88); de igual manera el hierro puede inhibir la uroporfirinógeno decarboxilasa.

Como consecuencia se produciría un exceso de metabolitos tipo uroporfirinógeno, cuya continuación en la vía metabólica se encuentra impedida. Los altos niveles de éstos metabolitos llegarían a la circulación gracias a la alteración de permeabilidad de las membranas celulares hepáticas, demostrada mediante determinación de Gamma - glutamil transferasa.

La insuficiencia en la fabricación de heme por una alteración enzimática como la descrita, estaría induciendo su síntesis mediante derepresión de la enzima ALA-sintetasa.

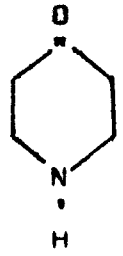
Existen mecanismos que no están completamente esclarecidos, aún en pacientes humanos que padecen una interferencia enzimática de la uroporfirinógeno decarboxilasa, altos niveles de profirinas en orina y materia fecal y presentan una síntesis de heme suficiente para satisfacer las demandas orgánicas (45).

Obviamente para nuestro caso, debe existir un mecanismo de retroalimentación, mediante el cual, una vez normalizada la síntesis de heme para satisfacer las necesidades orgánicas, el mismo heme se encargaría de ejercer un efecto inhibitorio sobre ALA-sintetasa,

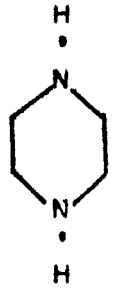
por cualquiera de los mecanismos descritos anteriormente. Ello explicaría los "picos" presentados en los niveles de porfirinas en la orina, pero no explicaría la regresión de la orina a su color normal al finalizar la tercera semana de iniciado el consumo de la planta problema, lo cual corresponde a un fenómeno independiente de la presencia de porfirinas ya que éstas solo se detectaron durante la segunda fase de pigmentación de la orina, entre la tercera y la sexta semana.

### 4.2.5.2 Posible mecanismo de acción de la planta Bunchosia pseudonítida de acuerdo con estudios fitoquímicos.

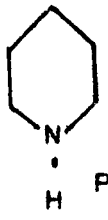
Según los estudios fitoquímicos efectuados por Cano y Mendoza (1982)(13), la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida) contiene un compuesto denominado 2,3, dehidro-4 piperidona. La fórmula química estructural del compuesto propuesta es la siguiente:



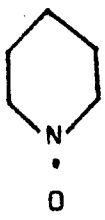

La piperidona se deriva de la piperazina y la pipedirina mediante sustituciones químicas según el esquema que se muestra a continuación:




Piperazina




Piperidina

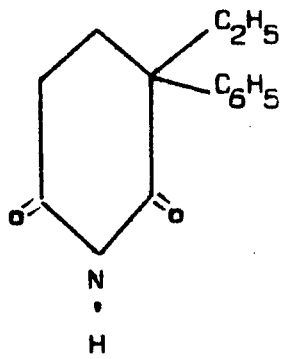



(1)

Existen tres compuestos con acciones farmacológicas que por contener el radical piperidona, se denominan piperinadionas o piperidinadionas. Estos compuestos se descubrieron como resultado de una síntesis sistémica y de investigaciones farmacológicas de compuestos estructuralmente relacionados con los barbitúricos (20). Estos compuestos son :

1. Glutetimida : nombre comercial : Doriden

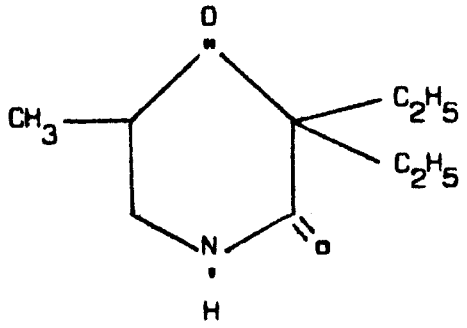
   Estructura química :




   3-etil, 3-fenil-2,6-piperidinediona

2. Metiprylon : nombre comercial : Noludar.

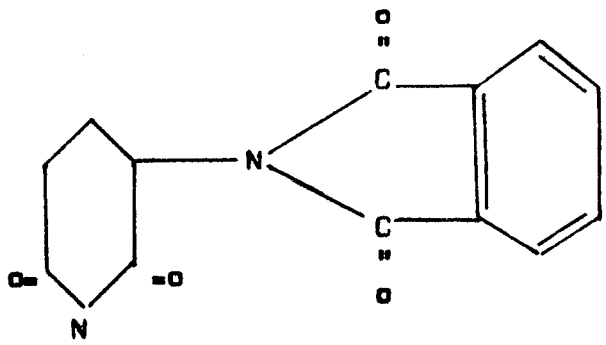
   Estructura química :




   3,3 dietil, 5-metil-2,4 - piperidinediona.

3. Talidomida : Nombre comercial : Talidomida

Estructura Química :



3-phthalimido-2,6-piperidinediona (20, 28, 55)

Se ha comprobado que tanto Glutetimida como Metiprilon tienen la propiedad de inducir ALA-sintetasa hepática; otro de los efectos tóxicos está relacionado con la producción de espasmos musculares tónicos (20, 28, 55).

La planta por tanto, tiene la posibilidad de que además de causar una disfunción hepática como la observada, induce ALA-sintetasa, lo que comprometería el consumo de la planta con los mecanismos descritos que inducen la presentación de un cuadro de porfiria.

4.2.5.3 Hipótesis sobre alteraciones de la actividad motora

Las alteraciones de la actividad motora observadas en los casos de campo y en reproducciones experimentales de Cromatosis no tienen como base una alteración morfológica y por lo tanto ello explica que no se encontraran lesiones histopatológicas, ni en el sistema nervioso ni en músculos esqueléticos.

Las alteraciones tienen una explicación fisiopatológica a nivel bioquímico.

De los metabolitos de la síntesis del heme, específicamente el ácido delta-aminolevulínico, produce cambios en la actividad motora (68), ataxia (85), alteraciones en la liberación de ácidos glutámico y gamma-aminobutírico en los sinaptosomas cerebrales de conejo (6) y reacciones con los receptores de ácido gamma-aminobutírico en la médula espinal (57). Esto explica las contracciones de carácter tónico observados en los animales de experimentación.

4.2.5.4 Ausencia de Fotosensibilización

No se encuentra un mecanismo que explique la ausencia de fotosensibilización para los casos de Cromatosis. La patogénesis del mecanismo de fotosensibilización inducida por las porfirinas no está bien entendida. Los síntomas en humanos difieren considerablemente, lo cual refleja diferencias fisicoquímicas de las porfirinas, tales como solubilidad, interacción con proteínas y localización subcelular en la piel (63).

En humanos, está comprobado que los casos de fotosensibilización por causa de porfirinas puede ser producida por éstas mismas o por conversión de porfirinógenos a porfirinas, directamente en la piel. Sin embargo no se ha encontrado explicación para la ausencia de fotosensibilización en pacientes con porfiria aguda intermitente (103).

4.3 NECROPSIA DE LOS OVINOS

Los animales de ambos grupos fueron sacrificados el día 45 de haber iniciado el consumo de la planta mamei-tomatillo (Bunchosia

pseudonítida).

El sacrificio se efectuó mediante electrocusión e inmediatamente se efectuó la necropsia. Los hallazgos de necropsia en los ovinos del grupo problema concuerdan con los observados en experimentaciones anteriores : pigmentación rosada o violeta de tejidos subcutáneos elásticos, aponeurosis, fascias, ligamentos, tendones, musculatura lisa y huesos. La pigmentación fue más intensa en tejidos de tipo elástico como ligamento cervical y aorta (Figura 25).

La pigmentación observada en los ovinos que consumieron la planta problema fue de menor intensidad, exceptuando el ligamento cervical y la aorta, que la observada en experimentaciones anteriores y en casos de campo en bovinos. Los ovinos son menos susceptibles de adquirir la pigmentación, exceptuando los tejidos citados.

En ningún caso se observó fluorescencia de los tejidos ante la luz ultravioleta.

## 4.4 ANALISIS HISTOPATOLOGICOS E HISTOQUIMICOS

Se observaron cambios histopatológicos en los ovinos del grupo problema con relación a los controles. Estos cambios se ubicaron en células hepáticas y ocasionalmente en células renales, en tejidos coloreados con Hematoxilina y Eosina (58).

Se presentó degeneración parenquimatosa en todos los ovinos, en células hepáticas y en células de los túbulos renales contorneados. Esto no se considera un cambio significativo y no puede interpretarse como una consecuencia del consumo de la planta ya que se presentó en los ovinos de ambos grupos. Se debe considerar

FIGURA Nº 25. Cromatosis. Reproducción experimental en ovinos.

Pigmentación violácea de la aorta y ligamento cervical (centro) correspondiente a ovinos del grupo problema. Comparación con aorta y ligamento cervical de ovinos control (extremos).

que todos los animales fueron sacrificados por electrocusión y que además en el proceso de la necropsia se tarda unos 20 minutos en tomar las muestras respectivas del hígado; éstos dos factores se pueden considerar responsables del fenómeno de degeneración parenquimatosa.

En los hepatocitos de los ovinos del grupo problema se observó degeneración hidrópica, ligera en dos de los animales y bastante marcada en los otros dos (Figuras 26 y 27).

Dentro del citoplasma de algunos hepatocitos y ocasionalmente dentro del citoplasma de células de Kupffer de los ovinos del grupo problema se observaron acúmulos de pigmento granular, pardo amarillento, abundante en uno de los ovinos y en menor proporción en los otros tres del grupo problema (Figuras 28 y 29). No hubo evidencia de presencia del pigmento en otros tejidos.

Dados los análisis de química sanguínea y los análisis de metabolitos del heme, los estudios histopatológicos con hematoxilina y eosina permitían plantear varias posibilidades en cuanto a la naturaleza del pigmento :

- Acúmulos de hierro férrico (hemosiderina)
- Acúmulos de hierro ferroso (hemoglobina, mioglobina, ferritina no cristalina).
- Bilirrubina
- Lipofucsina
- Pigmentos ceroides
- Porfirinas

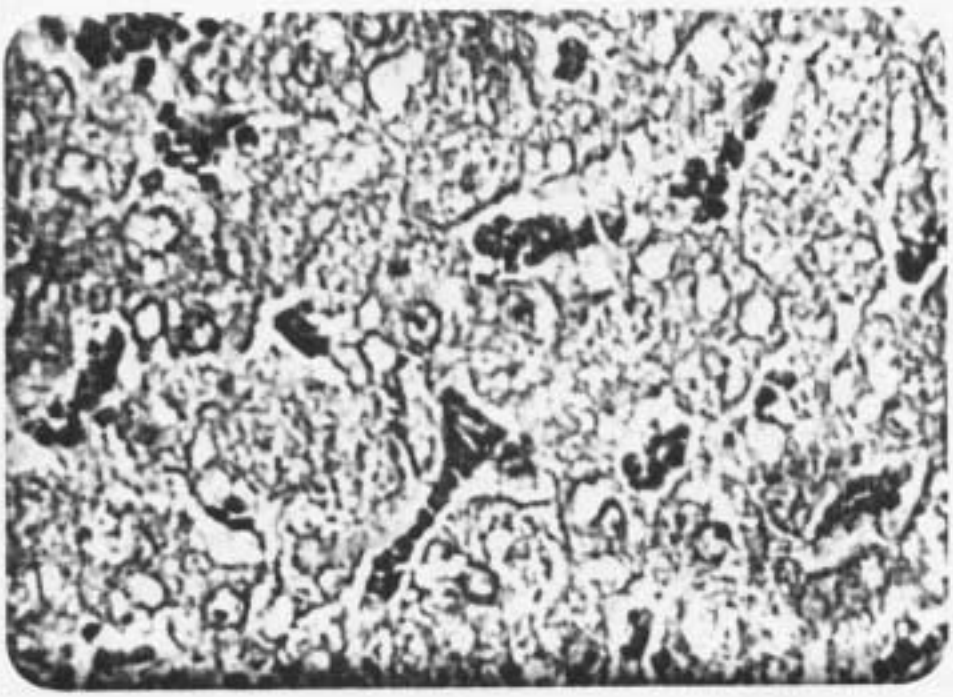


FIGURA Nº 26. Cromatosis. Reproducción experimental en ovinos.

Degeneración hidrópica en hepatocitos. La fotografía corresponde a un caso severo (H. y E. x 400)

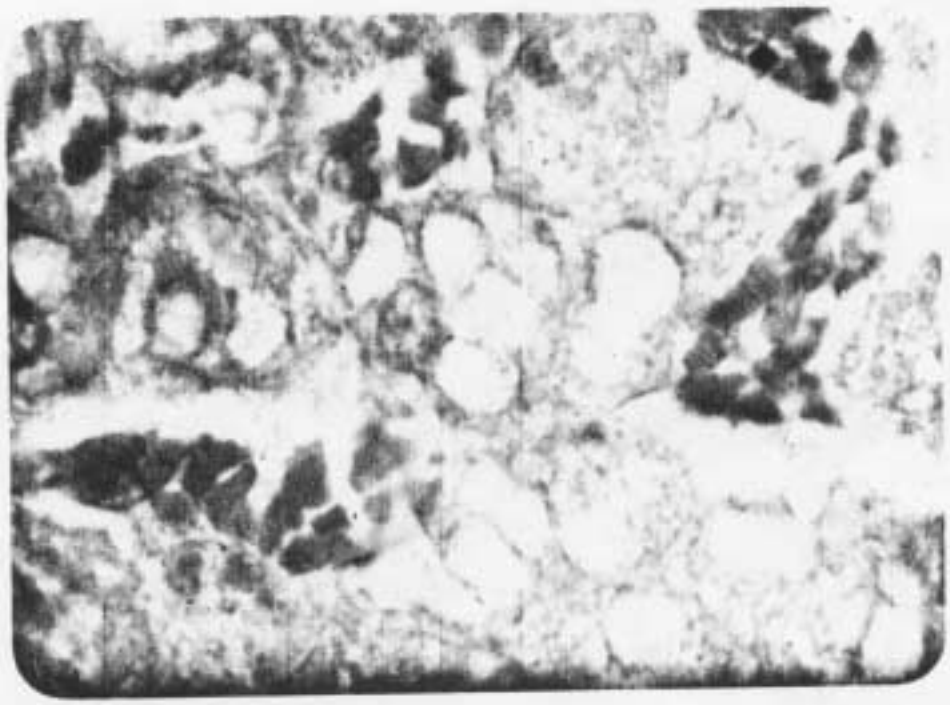


FIGURA Nº 27. Cromatosis. Reproducción experimental en ovinos.

Degeneración hidrópica en hepatocitos. La fotografía corresponde al caso más severo (H. y E. x 1.000)

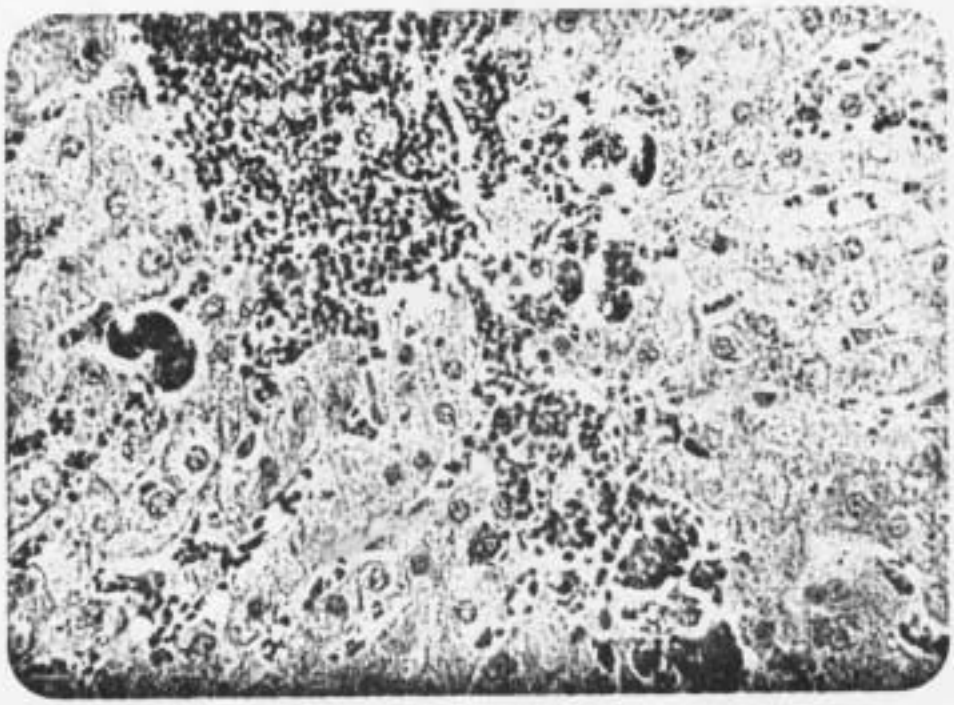


FIGURA Nº 28. Cromatosis. Reproducción experimental en ovinos.

Pigmento granular pardo-amarillento en el citoplasma de hepatocitos y ocasionalmente en células de Kupffer.
(H. y E. x 400)

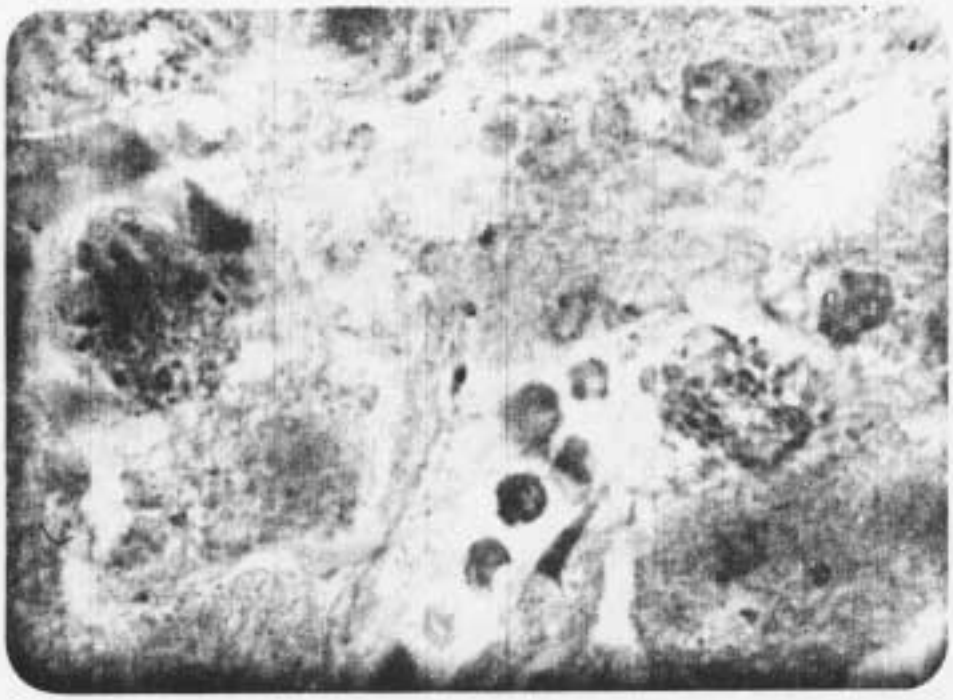


FIGURA Nº 29. Cromatosis. Reproducción experimental en ovinos.

Ampliación de la figura 28. Obsérvese el pigmento granular pardo amarillento en el citoplasma de células hepáticas (H. y E. x 1.000)

Los resultados de las respectivas coloraciones diferenciales para establecer la naturaleza del pigmento fueron :

- Perl's para hierro férrico : negativo
- Gomori para hierro férrico : negativo
- Johnson para hierro ferroso: parcialmente positivas (Figura 32)
- Halls para Bilirrubina : negativo
- McMans para glicógeno : positiva (Figura 30)
- Afip para lipofucsina : positivo (Figura 31)
- Giemsa y Ziehl-Neelsen para ceroides : negativo

Se puede concluír que el pigmento corresponde a lipofucsina (58).

Las coloraciones para hierro ferroso se realizaron luego de haber efectuado las coloraciones para determinar hierro férrico, dado que las técnicas son muy específicas y cabía la posibilidad de que el pigmento fuese un compuesto que tuviese hierro ferroso.

La Figura 32 muestra una de las células que da reacción positiva para hierro ferroso. El método comprende un proceso de microincineración y observación de la muestra al microscopio con campo oscuro. En caso de positividad, se observan cristales que dan refringencia de color naranja o rojo oscuro (58). Se debe anotar que solo ocasionalmente se encontró reacción positiva en algunas células.

Antes que una alteración hepática, se debe considerar en conjunto los cambios hepáticos observados como un problema de disfunción hepática, pues éstos cambios son reversibles a este punto, suspendiendo la causa.

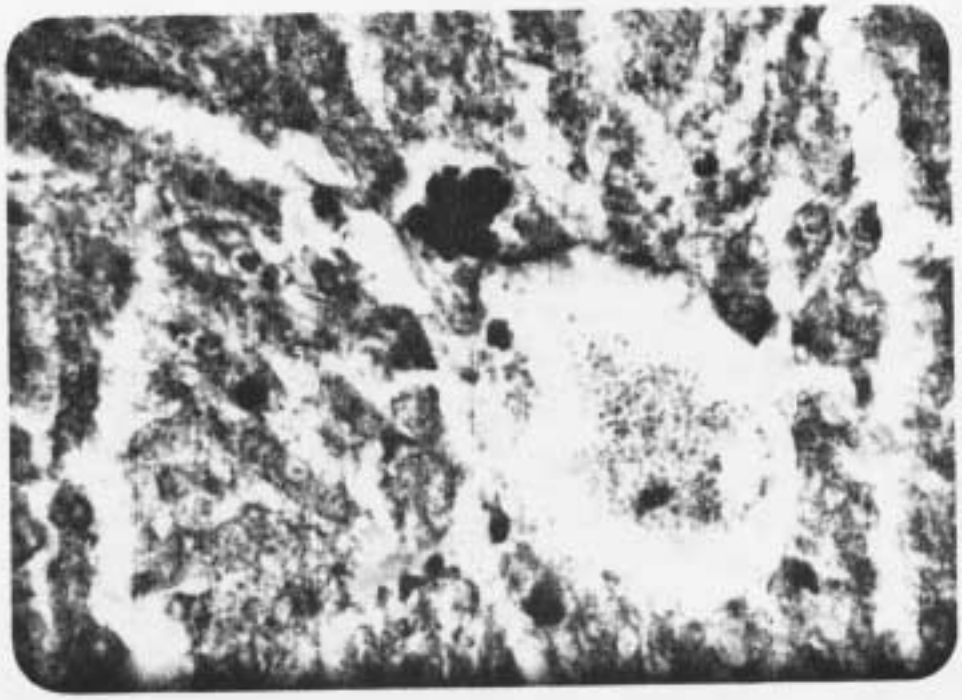


FIGURA Nº 30. Cromatosis. Reproducción experimental en ovinos.

Obsérvese la reacción McMans positiva del pigmento contenido dentro del citoplasma de ćelulas hepáticas (McMans x 400).

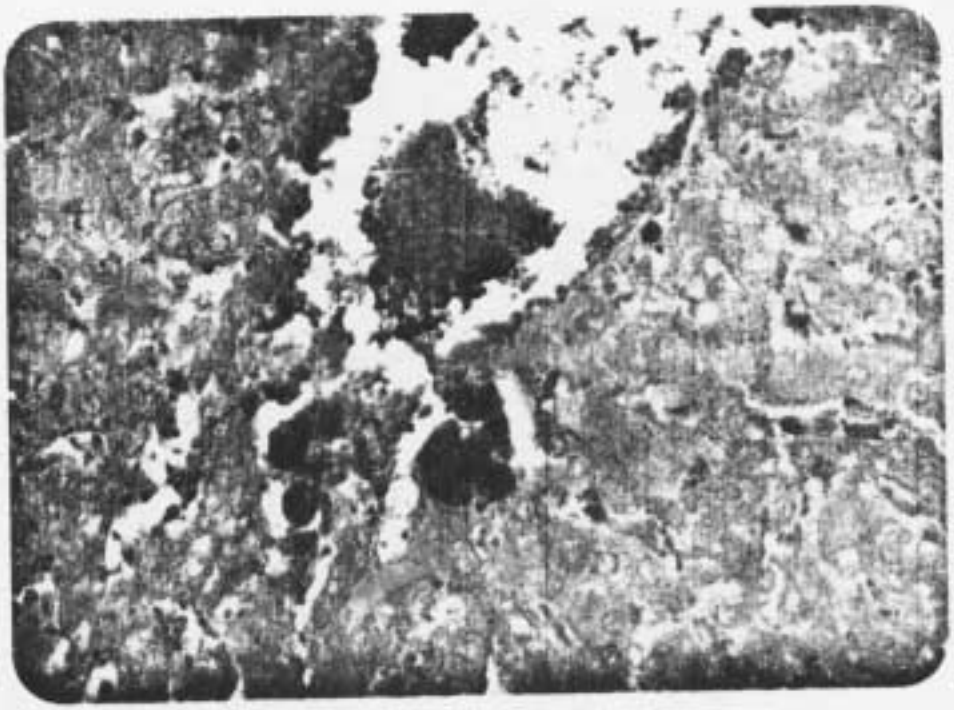


FIGURA Nº 31. Crometosis. Reproducción experimental en ovinos.

Coloración de Afip positiva para el pigmento descrito en secciones coloreadas con Hematoxilina y Eosina (Afip x 400).

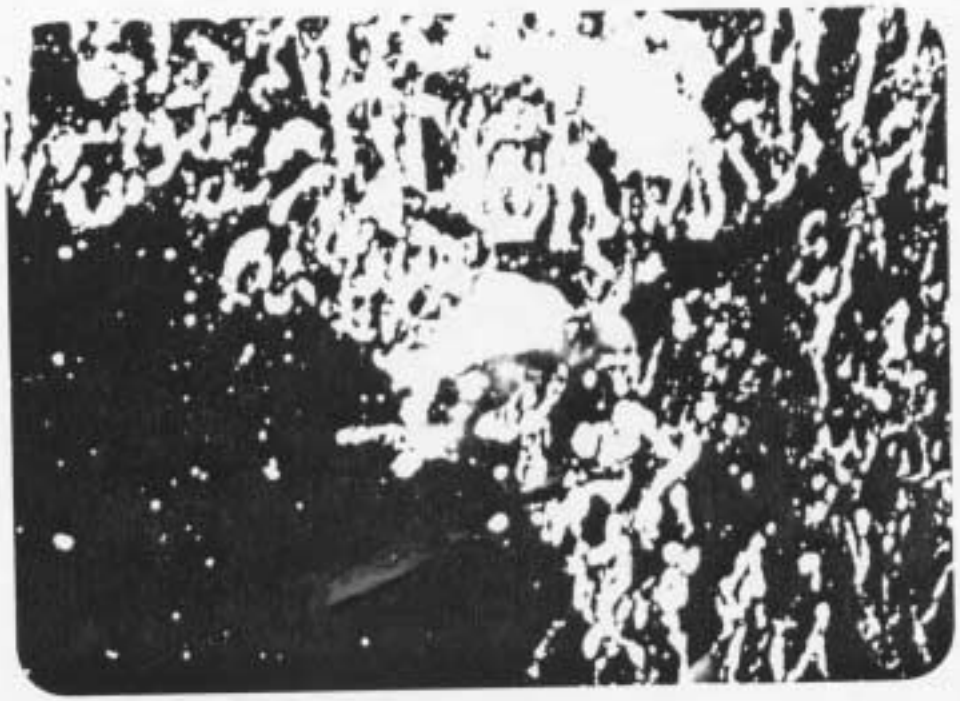


FIGURA Nº 32. Crometosis. Reproducción experimental en ovinos.

Los cristales de hierro ferroso presentan una refringencia naranja observados en campo oscuro; la presencia de hierro solo se observó ocasionalmente (Johnson x 400).

Los cambios observados en los análisis histopatológicos en el hígado están de acuerdo con los hallazgos de los estudios de química sanguínea que plantean que el aumento de los niveles de Gamma-glutamil transferasa como una alteración enzimática, permaneciendo estables las transaminasas, se pueden interpretar como un daño hepático, de carácter tóxico pasajero, no ictérico (7).

El pigmento correspondiente a lipofucsina observado en células hepáticas, según lo describen Essner y Novikoff, citados por Thompson, corresponde a depósitos dentro de lisosomas de residuos de un metabolismo celular alterfado, probablemente de lípidos que son sustrato para la acción de enzimas lisosomales (7).

Según Smith y Jones, la lipfucsina se cree que representa un grupo de pigmentos homogéneos que se derivan de la oxidación de lípidos tisulares insaturados o de lipoproteínas (79, 83).

La presencia de lipofucsina en células hepáticas de los ovinos sometidos al consumo de la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida) se puede interpretar como el resultado de cambios regresivos lentos correspondientes a una lesión de carácter crónico en el hígado.

Además de los incrementos en las concentraciones de hierro sérico, del tipo de porfirinas excretadas en la orina, la presencia de gránulos de lipofucsina coincide con los hallazgos que se observan en los casos de porfiria cutánea tardía, el cual es un tipo de porfiria adquirida.

En células de los túbulos renales, los estudios histopatológicos revelan cambios degenerativos de carácter hidrópico. Esta alteración no fue constante y solo se observó ocasionalmente en los

ovinos del grupo problema (Figuras 34 y 35).

Esta afección leve puede considerarse de carácter transitorio y reversible y no afectó los animales del grupo problema, pues los análisis urinarios no revelaron, aparte de la reacción Ehrlich positiva ningún tipo de alteración.

FIGURA Nº 33. Crometosis. Reproducción experimental en ovinos.

Células de los túbulos renales contorneados, correspon - dientes a un ovino control. (H. y E. x 1.000)

FIGURA Nº 34. Cromatosis. Reproducción experimental en ovinos.

Células de un túbulo renal contorneado. Obsérvese los cambios degenerativos de carácter hidrópico (H. y E. x 1.000).

5.4 La presencia de este cromógeno provoca en la orina de los animales que consumen la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida), una reacción Ehrlich positiva, independientemente de la presencia de porfobilinógeno, indol, sulfonamidas o procaína. El cromógeno por si mismo es Ehrlich positivo. La reacción positiva ante el reactivo de Ehrlich se presenta durante ambas fases de pigmentación de la orina descritas anteriormente.

5.5 Durante la segunda fase de pigmentación de la orina, la tonalidad púrpura se debe en ella a la presencia de porfirinas.

5.6 Estadísticamente se presentan los valores de los niveles de uroporfirinas y coproporfirinas como independientes del consumo de la planta problema mediante un análisis de varianza. El fenómeno, que tiene significación biológica, estadísticamente es no significativo debido al sistema de muestreo.

Se registraron diferencias estadísticamente significativas mediante un análisis de Duncan entre el promedio de los niveles de coproporfirinas, luego de iniciado el consumo de la planta problema, con respecto a los promedios de los niveles del grupo problema antes de iniciado el consumo con respecto a los promedios del grupo control.

5.7 Se plantea la hipótesis de una interferencia enzimática a nivel de la uroporfirinógeno decarboxilasa, una depresión de la enzima ácido delta-aminolevulínico sintetasa por acción de un compuesto contenido en la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida). Esta acción sobre las enzimas de la vía metabólica del heme, induce la acumulación de uroporfirinas y coproporfirinas, las cuales son excretadas en la orina.

5.8 Independientemente de la acción interferente sobre la uroporfirinógeno decarboxilasa, el compuesto puede tener acción inductora sobre ALA-sintetasa probablemente debido a la presencia en su estructura química de una piperidona. Esta posibilidad se plantea ya que existen compuestos farmacológicos que poseen este núcleo y son inductores de ALA-sintetasa.

5.9 Los análisis clínicopatológicos permiten establecer la hipótesis de que el consumo de la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida) induce un estado de porfiria a partir de la tercera semana de iniciado el consumo de la planta problema. Esta porfiria inducida es de carácter hepático.

5.10 La pigmentación de los tejidos de un color violeta, al igual que la reacción Ehrlich positiva de la orina, es independiente del estado de porfiria.

5.11 El estado de porfiria inducido por el consumo de la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida) explica el fenómeno de ataxia observado en casos de campo y casos experimentales, probablemente a causa de alteraciones en la liberación de ácidos glutámico y gamma-aminobutírico lo cual causaría contracciones de carácter tónico.

5.12 No se pueden plantear por el momento una hipótesis que explique la ausencia de fotosensibilización. Podría plantearse la posibilidad de presentación de isómeros no fotodinámicos de porfirinas.

5.13 El estado de porfiria inducido por el consumo de la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida) se aparta de los modelos de comportamiento clínicopatológico observado para

los estados de porfiria existentes en humanos y de los estudiados hasta el momento para animales.

5.14 Se plantea la posibilidad de realizar análisis enzimáticos de la vía metabólica del heme y de la determinación exacta del tipo de porfirinas encontradas en los casos de Cromatosis.

## 6. RESUMEN

Se reprodujo experimentalmente la cromatosis bovina en 4 ovinos Rommey Marsh suministrándoles 5 g/kg de peso corporal por día de hojas de la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida), durante 45 días. Se planteó como objetivo establecer alteraciones clínico-patológicas que permitieran plantear hipótesis sobre procesos fisiológicos alterados, para contribuír al estudio de la patogénesis del problema.

Dos ovinos se emplearon como controles. Se realizaron estudios hematológicos, urinarios e histopatológicos, de acuerdo con hallazgos de experimentaciones anteriores. La orina excretada por los ovinos que consumieron la planta problema, presentó cambios cíclicos en su coloración: verde-amarillento hacia las 24 horas de iniciado el consumo de la planta, progresó hacia un color pardo rojizo y regresó al color normal hacia la tercera semana. Entre la tercera y la sexta presentó cambios similares pero con una tonalidad púrpura hacia la mitad del período.

Los animales presentaron ataxia ligera del tren posterior y las lesiones descritas en experimentaciones anteriores. Se determinó la presencia de porfirinas en la orina, concentraciones elevadas de hierro sérico y de gammaglutamil transferasa. Se observaron lesiones degenerativas de carácter leve a nivel hepático. Se plantea la posibilidad de una interferencia enzimatica en la vía metabólica del heme a nivel hepático. La planta contiene un cromógeno que probablemente pigmenta los tejidos, independientemente del estado de porfirinuria.

## 7. SUMMARY

The entity named bovine chromatosis was wxperimentally induced by feeding 4 Rommey Marsh ewes with the leaves of "mamei-tomatillo" (Bunchosia pseudonítida) in daily doses of 6 gm/kg during 45 days. The aims of the study were to descri be the clinical and pathological changes in order to state some hypothesis wich might explain the physiologic processes altered that in turn could lead the understanding of the pathogenesis of the disease, two non treated sheeps were used as a control group. Based on previous experimental findings, hematologic studies, urinary analysis and histophatologic studies were perfomed.

The urine from the experimental animals exhibited cyclic changes in color as follows: about 24 hour after the treatment was started, the urine had a green-yellowish, then the urine had a red-brown discoloration and after three weeks the urine had a normal color. Between 3 and 6 weeks, similar changes were observed but the urine was purple at the midle of this period.

The experimental animals showed slight ataxia of the rear legs and the lesions were described previously. Porphyrins were detected in the urine and increased serum concentration of iron and gammaglutamyl transferase were observed. An enzimatic interference in the metabolic pathway of the heme molecule was suspected. Disregard the porphyrinuria, the plant has a chromogen that probably stains the tissues.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS


1. ALDRICH, CHEMICAL. Piperazine, piperidine, 2-piperidona Catalog handbook of fine chemicals. 1982-1983 Milkwaukee, 1982. p. 954 - 956

2. ALVAREZ, A.; SILVA, F.; VELASQUEZ, E. Reproducción experimental de Cromatosis en bovinos empleando la planta "pateperro" o "mamei-tomatillo". (Bunchosia pseudonítida). Ibagué, Universidad del Tolima, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia 1981. 64 p. (Tesis M.V.Z.).

3. ARANDA, A.; LOZANO, F. Investigación preliminar de Cromatosis bovina en Roncesvalles, Tolima. Ibagué, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Tolima, 1981 59 p. (Tesis M.V.Z.).

4. ARAYA, D.; WITIWER, F.; CONTRERAS, P.; GONZALEZ, S. Porfiria congénita eritropoyética (Diente rosado) en un ternero overo negro en Chile. Archivos de Medicina Veterinaria (Chile) v. no. 4, no. 2, p. 58-59. 1972.

5. BARON, J.; TEPHLY, T. R. Effect of 3-amino-1,2,4-triazole on the stimulation of hepatic microsomal heme synthesis and induction of hepatic microsomal oxidases produced by phenobarbital. Molecular Pharmacology (Estados Unidos) v. 5 no. 1, p. 10-20. 1969.

6. BECKER, D.M.; VILJOEN, J.D.; KRAMER, S. Porphyrin precursors and their effects in vitro of some aspects of hene function En: _____; _____; _____. Porphyrins in human diseases New York, M. Doss, 1976. p. 163-172.

7. BOEHRINGUER MANNHEIM. Iron. En: Clinical chemical investigations; the foundation of diagnosis. Boehringuer, Boehringuer Mannheim Diagnostic Division, 1982. p. 44-46.

8. BOHINSKY, R.C. Bioquímica. 2 ed. Bogotá, Fondo Educativo Interamericano, 1978. p. 534-535.

9. BONDY, P.K.; ROSENBERG, L.E. Porphyrin: Metabolism and the porphyrias. En: _____; _____ Metabolic control and disease 8 ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1980. p. 939-942, 953-986.

10. BONKOWSKY, H.L.; COLLINS, A.; DOHERTY, J.M.; TSCHUDY, D.P. The glucose effect in rat liver: studies of deltaaminolevulinate synthetase and tyrosine aminotransferase. Biochimica et Biophysica Acta (Holanda) v. 320 no. 2, p. 561-568. 1973.

11. BOTTOMLEY, S.S.; SMITHEE, G.A. Effect of erytropoietin on bone marrow del-aminolevulinic acid synthetase. Journal of Laboratory and Clinical Medicine (Estados Unidos) v. 74 no. 3, p. 445-452. 1969.

12. BOWMAN, W.C.; RAND, M.J. Texbook of Pharmacology 2 ed. London, Blackwell Scientific, 1980. p. 21.28 - 21.29, 26.38 - 26.45.

13. CANO, V.; MENDOZA, M. Contribución al estudio fitoquímico de la Bunchosia pseudonítida. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, 1982. 76 p. (Tesis Q.F.).

14. CHASE, M.S.; GUBLER, C.J.; CARTWRIGHT, G.E.; WINTROBE, M.M. Studies on copper metabolismo IV. The influence of copper on the absorption of iron. Journal of Biological Chemistry (Estados Unidos) v. 199 p. 757-763. 1952.

15. _____; _____; _____; EINTROBE, M.M. Studies on copper metabolism. V. Storage of iron of copper deficient rats. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine (Estados Unidos) v. 80, no. 4, p. 749-755. 1952.

16. CHURCH, D.C. Digestive physiology and nutrition of ruminants. New York, Academic Press, 1971. v. 2 Nutrition. p. 401-481.

17. COLES, H.E. Patología y diagnóstico Veterinario. México, Interamericana, 1967. p. 85-95.

18. DEL RIO, I.; VELASQUEZ, L.; GUTIERREZ, L. Cromatosis de orígen vegetal del tejido conjuntivo en bovinos. Bogotá, Instituto Colombiano Agropecuario, 1974. 6 p. (mecanografiado).

19. DE MATTEIS, F.; SPARKS, R. G. Iron. Independent loss of liver cytochrome p. 450 haem in vivo and in vitro. Federation of European Biochemical Societies, Letters (Holanda) v. 29 no. 1, p. 141-146. 1973.

20. DIPALMA, J.R. Drill's pharmacology in medicine. 3 ed. New York, McGraw-Hill, 1965. p. 178-182.

21. ECHEVERRY, R. Estudio de la flora de las regiones afectadas de Cromatosis en el departamento del Huila. Ibagué, Universidad del Tolima, Facultad de Agronomía, 1979. 19 p. (mecanografiado).

22. FALK, J.E.; PORRA, R.J. The effects of oxigen concentration on porphyrin biosynthesis in chicken erytrocits preparations. Biochemical Journal (Inglaterra) v. 90 no. 1, p. 66-74.

23. FREE, A.H.; FREE, H.M. Urianálisis, critical discipline of clinical science. Critical Reviews in clinical laboratory Sciences (Estados Unidos) v. 3 no. 4, p. 481-531, 1972.

24. GALITZER, S.J.; DEHME, F.W. Fotosensitization: a literature review. Veterinary Science Communications (Holanda) v. 2 no. 2, p. 225-230. 1978.

25. GANONG, W.F. Review of medical physiology. 6 ed. California, Lange Medical Publications, 1971. p. 355-365, 385.

26. GILBERT, W.; MULLER-HILL, B. The lac operator is DNA. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America v. 58 no. 6, p. 2415-2421. 1967

27. GONZALEZ, Y.M.; GARCIA, G.E.; CORREA, J.B. Porfiria congénita eritropyética en terneros mellizos Holstein Friesian. Agricultura Técnica (Chile) v. 39 no. 2, 63-65. 1969.

28. GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. Bases farmacológicas de la terapéutica. 5 ed. México, Interamericana, 1978. p. 112-115.

29. GRANICK, S. The induction in vitro of the synthesis of delta-aminolevulinic acid synthetase in chemical porphyria: a response to certain drugs, sex hormones and foreign chemicals. The Journal of Biological Chemistry (Estados Unidos). v. 241 no. 5, p. 1359-1364. 1966.

30. _____.; KAPPAS, A. Steroid control of porphyrin and heme biosynthesis: a new biological function of steroid hormone metabolites. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America v. 57 no. 5, p. 1463-1467. 1967.

31. _____: _____. Steroid induction of porphyrin synthesis in liver cell culture. I. Structural basis and possible physiological role. The Journal of Biological Chemistry (Estados Unidos) v. 242 no. 13, p. 4587-4592. 1967.

32. _____; _____. Delta-aminolevulinic acid synthetase from chick embryo liver mitochondria. II. Inmunochemical correlation between and activity in inductional repression. The Journal of Biological Chemistry (Estados Unidos) v. 251 no. 5, p. 1347-1355. 1976.

33. _____.; SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid synthetase and the control of heme and chlorophyll synthesis. En: Vogel, H.J. ed. Metabolic Regulation. New York, Academic Press, 1971. p. 77-78.

34. GRANICK, S.; URATE, G. Increase in activity in delta-aminolevulinic acid synthetase in liver mitochondria induced by feeding of 3,5-dicarbetoxy-1,4- dihydrocollidine. The Journal of Biological Chemistry (Estados Unidos). v. 238. no. 2, p. 821-827. 1963.

35. HARPER, H.A. Review of physiological chemistry. 14 ed. New York, Mc Graw-Hill, 1978 p. 342-345.

36. HOUSER, R.H.; FICK, K.R.; McDOWELL, L.R. Simposio Latinoamericano sobre investigaciones en nutrición mineral en los rumiantes en pastoreo. Belo Horizonte 1976. Gainsville, Florida University, Department of Animal Science, 1978. p. 93-105, 124-133.

37. ICHIJO, S., KONISHI, T.A. A case of bovine congenital porphyria. Japanese Journal of Veterinary Science. v. 42 no. 2, p. 725-729. 1980.

38. INCEFY, G.S.; KAPPAS, A. Enhancement of RNA synthesis in avian liver cell culture by 5-beta-steroid metabolite during induction of delta-aminolevulinate synthetase. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of América v. 71 no. 6, p. 2290-2294. 1974.

39. INSIITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO. DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS. BOGOTA (COLOMBIA). Informe de Actividades 1980. Bogotá, 1980. 120. p.

40. INSTITUTO GEOGRAFICO AGUSTIN CODAZZI. BOGOTA (COLOMBIA). Monografía del departamento del Huila. Bogotá, 1974. 120 p.

41. JOHNSON, A.; JONES, O.T.G. Enzymic formation of hemes and other metalloporphyrins. Biochemica et Biophysica Acta. (Holanda). v. 93 no. 1, p. 171-173. 1964.

42. JONES, M.S.; JONES, O.T.G. The structural organization of haem synthesis in rat liver mitochondria. Biochemical Journal (Inglaterra). v. 113 no. 1, p. 507-510. 1969.

43. KAPPAS, A.; SONG, C.S.; SACHSON, R.A.; LEVERE, R.E.; GRANICK, S. Induction of delta-aminolevulinic acid synthetase in vivo in chick embryo liver cell by natural steroids. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América v. 61 no. 2, p. 509-513. 1975.

44. KIM, H.J.; KIKUCHI, G. Mechanism of Allylisopropylacetamide induced increase of delta-aminolevulinate synthetase in liver mitochondria: effects of administration of glucose, CAMP and some hormones related to glucose metabolism. Archives of Biochemistry and Biophysics. (Estados Unidos) v. 164 no. 1, p. 293-299. 1974.

45. KUSHNER, J.P.; BARBUTO, A.J.; LEE, G.R. An inherited enzymatic defect in porphyria cutanea tarda: decreased uroporphyrinogen decarboxilase activity. The Journal of Clinical Investigation (Estados Unidos) v. 58 no. 5, p. 1089-1097. 1976.

46. _____; LEE, G.R.; NATCH, S. The role of iron in the pathogenesis of porphyria cutanea tarda: I. And in vitro model. The Journal of Clinical Investigation (Estados Unidos) v. 51 no. 12, p. 3044-3051. 1972.

47. KUSNER, J.P.; STEINMULLER, D.P.; LEE, G.R. The role of iron in the pathogenesis of porphyria cutanea tarda. II. Inhibition of uroporphyrinogen decarboxylase. The Journal of Clinical Investigation (Estados Unidos) v. 56 no. 3, p. 661-667. 1975.

48. LABBE, R.F.; HUBBARD, N. Preparation and properties of iron protoporhyrin chelating ensyme. Biochimica et Biophysica Acta (Holanda) v. 41 no. 1, p. 185-196. 1960.

49. _____; _____. Metal specificity of the iron protoporphyrin chelating enzyme form a rat liver. Biochimica et Biophysica Acta (Holanda) v. 52 no. 1, p. 130-142. 1961.

50. _____; _____; CAUGHNEY, W.S. Porphyrin specificity of protoporhyrin chelatase from rat liver. Biochemistry (Estados Unidos) v. 2 no. 1, p. 372-375. 1963.

51. LEE, G.R.; CARTWRIGHT, G.E.; WINTROBE, M.M. Heme biosynthesis in copper defficient swine. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine (Estados Unidos) v. 127 no. 4, p. 997-981. 1968.

52. _____; ANTCH, S.; LUKENS, J.M.; CARTWRIGHT, G.E. Iron metabolism in copper defficient swine. The Journal of Clinical Investigation (Estados Unidos) v. 46 no. 9, p. 2058-2069. 1968.

53. LEHNINGER, A. Bioquímica, biosíntesis de porfirinas. Barcelona, Omega, 1973. p. 596-597.

54. LEVIN, E. Comparative aspects of porphyria in man and animals. Annals New York Academy of Sciences v. 241 no. 1, p. 347-360. 1974.

55. LITTER, M. Farmacología experimental y clínica. 5 ed. Buenos Aires, El Ateneo, 1978. p. 268-288.

56. LOCHHEAD, A.D.; KRAMER, S.; GOLDBERG, A. Quantitative measurement of the iron incorporating enzyme in relation to marrow cells and liver tissue in the rabbit. British Journal of Haematology v. 9 no. 1, p. 39-40. 1963.

57. LOORS, J.M.; BECKER, D.M.; MEYER, B.J.; GOLDSTUCK, N.; KRAMER, S. The effect of porphyrin precursors on mono-synaptic reflex activity in the isolated hemisected frog spinal cord. Journal of Neural Transmission (Austria) v. 36 no. 1, p. 71-81. 1975.

58. LUNA, L.G. Manual of histological staining methods Armed Forces Institute of Pathology. USA. 3 ed. New York, Mc Graw-Hill, 1968. 258 p.

59. MARVER, H.S. The role of heme in the synthesis and repression of microsomal proteine. En: Gillette, J.R.; Conney, A.H. ed. Microsomes and drug oxidations. New York, Academic Press, 1969. p. 495-504.

60. _____; COLLINS, A.; TSCHUDY, D.P.; RECHCIGL, M. D- a-aminolevulinic acid synthetase. II. Induction in rat liver. The Journal of Biological Chemistry (Estados Unidos) v. 241 no. 12, p. 4323-4328. 1966.

61. MARVER, H.S.; TSCHUDY, D.P.; PERLOTH, M.G.; COLLINS, A. Delta-aminolevulinic acid synthetase I. Studies in liver homogenates. Journal of Biological Chemistry (Estados Unidos) v. 241 no. 10, p. 3803-3808. 1966.

62. McDOWELL, L.R.; HOUSER, R.H.; FICK, K.R. Hierro, Manganeso y zinc en la nutrición de rumiantes. En: Simposio Latinoamericano sobre investigaciones en nutrición mineral de bs rumiantes en pastoreo. Memorias. Belo Horizonte 1976. Gainsville, Florida University, Department of Animal Science, 1978. p. 93-105, 124-133,

63. McGILLON, F.B.; THOMPSON, G.G.; MOORE, M.R.; GOLDBERG, Z. The passage of delta-aminolevulinic acid across the blood brain barrier of the rat; the effect of ethanol. Biochemical Pharmacology (Inglaterra) v. 23 no. 2, p. 472-474. 1974.

64. McKAY, R.; DRUYAN, R.; GETZ, G.S.; RABINOWITZ, M. Intramitochondrial localization of delta-aminolevulinate synthetase and ferrochelatase in rat liver. Biochemical Journal (Inglaterra) v. 114 no. 2, p. 455-461. 1969.

65. MEDWAY, W.; PRIER, J.; WILKINSON, J. Veterinary clinical pathology. Baltimore, The Williams and Wilkins, 1969. p. 48-49, 61-64.

66. MEJIA, A.B. Cromatosis del tejido conjuntivo en bovinos del departamento del Huila. En: Instituto Colombiano Agro - pecuario, División de Ciencias Veterinarias Ibagué (Colombia). Informe de actividades. 1980. Ibagué, 1980. 10 p.

67. MEYER, A.U.; SCHMID, R. The porphyrias. En: Bondy, P.K.; Rosemberg, L.E. The metabolic basis of inherited disease 4 ed. New York, McGraw-Hill, 1978. p. 1166-1225.

68. MOORE, M.R.; McGILLON, R.B.; GOLDBERG, A. Some pharmacological and behavioral effects of delta-aminolevulinic acid. En: Doss, M. ed. Porphyrins in human disease. New York, S. Karger, 1976. p. 148-154.

69. MUSSMAN, H.C.; RAVE, V.G. Patología clínica veterinaria. Bogotá, ICA, 1978. 97 p.

70. NEUWIRT, J.; PONKA, P., BOROVA, J. The role of heme in the regulation of delta-aminolevulinic acid and heme synthesis in rabbit reticulocites. European Journal of Biochemistry (Alemania) v. 9 no. 1, p. 36-42. 1969.

71. PATTON, G.M.; BEATTLE, D.S. Purification and properties of delta-aminolevulinic acid synthetase in rat liver mitochondria. En: Doss, M. Porphyrins in human disease. New York, S. Karger, 1976. p. 98-104.

72. PEÑA, S. Cromatosis del tejido conjuntivo en bovinos del departamento del Huila. En: Instituto Colombiano Agropecuario, División de Ciencias Veterinarias. Bogotá (Colombia), Informe de actividades. 1976. Bogotá. 1977. p. 138.

73. PEÑA, N. Contribución al estudio de la epidemiología de la Cromatosis bovina en algunos municipios del departamento del Huila. Bogotá, UNC-ICA, 1981. 38 p. (Tesis Mag. Sci.).

74. PEÑA, N.; TORRES, J.; YEPES, H.; DE JIMENO, M.; ECHEVERRY, R. Cromatosis bovina. Informe preliminar. Bogotá, ICA, 1980 3 p. (Documento de trabajo).

75. PONKA, P.; NEUWIRT, J.; BOROVA, J. The role of heme in the release of iron from transferrin in reticulocites. Enzyme (Suiza) v. 17 no. 1, p. 92-96. 1973.

76. PORRA, R.T.; JONES, O.Y. Studies on ferrochelatase. I. Assay and properties of ferrochelatase from a pig liver mitochondrial extract. Biochemical Journal (Inglaterra) v. 87 no. 2, p. 87-181. 1967.

77. PTASHNE, M. Isolation of the lamloda phague repressor. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America v. 57 No. 2, p. 306-313. 1967.

78. _____. Specific binding of lambda DNA. Nature (Inglaterra) v. 214 no. 1, p. 232-237. 1967.

79. ROBBIN, S.L. Patología estructural y funcional. Madrid, Interamericana, 1975. p. 46-47, 270-277. 1975.

80. SASSA, S.; GRANICK, S. Induction of delta-aminolevulinic acid synthetase in chick embryo liver cell in culture. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America v. 67 no. 2, p. 517-522. 1970.

81. SCHACTER, B.A.; MARVER, H.S.; MEYER, D.A. Heme and hemoprotein metabolism during stimulation of microsomal lipid peroxidation. Drug Metabolismi and disposition: The Biological Fate of Chemicals (Estados Unidos) v. 1 no. 1, p. 268-292. 1973.

82. SCHWARTZ, S.B.; BOSSENMAIER, I.; DINSMORE, H. Determination of porphyrins in biological materials; methods of biochemical analysis. New York, Interscience, 1970 v. 3, p. 249.

83. SMITH, H.A.; JONES, C.T.; HUNT, D.R. Veterinary pathology 4 ed. Phyladelphia, Lea and Febiger, 1972. p. 82-84.

84. STAMBURY, J.B.; WYNGARDEN, J.B.; FREDRICKSON, D.S. The methabolic basis of inherited disease. 4 ed. New York, McGraw-Hill, 1978. p. 1171-1193.

85. STANLEY, B.C.; PERCY, B.A.; NEETHLING, A.C. Neurochemistry of acute porphyria. En: Doss, M. Porphyrins in human disease. New York, S. Karger, 1976. p. 155-162.

86. STANLEY, S.R. Medical Laboratory technology. 3 ed. Philadelphia, Saunders, 1976. p. 372-373.

87. STARCHE, B. Molybdenum, studies with sheep. The Journal of Nutrition (Estados Unidos). v. 97 no. 2, p. 321-328.

88. STEIN, J.A.; TSCHUDY, D.P.; CORCORAN, P.L.; COLLINS, A. Delta-aminolevulinic acid synthetase III. Synergistic effect of chelated iron on induction. The Journal of Biological Chemistry (Estados Unidos) v. 245 no. 8, p. 2213-2222. 1970.

89. STRAND, L.J.; MANNING, J.; MARVER, H.S. The induction of delta-aminolevulinic acid synthetase in cultured liver cells; the effect of end produft and inhibitors of heme synthesis. The Journal of Biological Chemistry (Estados Unidos) v. 247 no. 9, p. 2820-2827. 1972.

90. THOMAS, J.W. Metabolism of iron and manganese. Journal of Dairy Science (Estados Unidos) v. 53 no. 9, p. 1107-1115.

91. TORRES, J.E.; ECHEVERRY, R.; MEJIA, A.B.; PEÑA, B.N. Cromatosis de los bovinos o "Vaca morada" en Colombia I Parte. Carga Ganadera (Colombia). v. 20 no. 6, p. 53-60. 1983.

92. _____; _____; _____; PEÑA, B. N. Cromatosis de los bovinos o "Vaca morada" en Colombia. II Parte. Carta Ganadera (Colombia) v. 20 no. 7, p. 63-68. 1983.

93. _____.; MEJIA, A.B.; ECHEVERRY, R.; DE AGUIAR, M. Reproducción experimental de cromatosis en conejos por medio del suministro de la planta mamei-tomatillo ( Bunchosia pseudonítica). Revista ICA, (Colombia) v. 7 no. 2, p. 73-78. 1982.

94. _____; _____; _____; DE AGUIAR, M. Reproducción experimental de Cromatosis en ovinos suministrando la planta mamei-tomatillo (Bunchosia pseudonítida). Revista Acovez (Colombia) v. 6 no. 19, p. 15-19. 1982

95. _____ ; PEÑA, N ; YEPES, H ; DE JIMENO. M ; ECHEVERRY, R. MONTAÑO, J. Cromatosis bovina. Informe preliminar. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias v. 2 no. 1, p. 109-121. 1981.

96. TYRREL, D.L.; KARKS, G.S. Drug-induced porphyrin biosynthesis. V. Effect of protohemin on the transcriptional and postrans criptional phases of delta-aminolevulinic acid synthetase induction. Biochemical Pharmacology (Inglaterra) v. 21 p. 2077-2081.

97. UNDERWOOD, D. J. Trace elements in human and animal nutrition. New York, Academic Press, 1971. 180 p.

98. WADA, O.; SASSA, S.; TAKAKU, F.; YAND, Y.; URATA, G.; NAKAO, K. Different responses of the hepatic and eritropoietic delta-aminolevulinic acid synthetase of mice. Biochimica et Biophysica Acta (Holanda) v. 148 no. 2, p. 585-594. 1967.

99. WAGNER, G.D.; DINAMARCA, M.L.; TEPHLY, T.R. Studies on ferrochelatsasa activity: role in regulation of hepatic biosynthesis. En: Doss, M. Porphyrins in human disease. New York, S. Karger, 1976. p. 89.

100. WHITING, M.J. Synthesis of delta-aminolevulinate synthase by isolated live polirribosomes. Biochemical Journal (Inglaterra) v. 158 no. 2 p. 391-400. 1976.

101. WIDMAN, F.K. Interpretación clínica de las pruebas de laboratorio. 2 ed. Barcelona, Jims, 1981, p. 37-41, 329-330, 344-345,350-351, 533-536.

102. YEPES, H. Cromatosis bovina. En: Congreso Panamericano de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 8o. Santo Domingo, 1-6 Agosto 1977. Santo Domingo, Asociación Panamericana de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 1978. p. 375-378.

103. ZUYDERHOUD, F.M.J.; BORST, P.; HUISINJ, J. Intra-mitochondrial localization of 5-delta-aminolevulinate synthase induced in rat liver by allyl-isopropylacetamide. Biochimica et Biophysica Acta (Holanda) v. 178 no. 1 p. 408-411. 1969.