



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Hepatotoxicidad en la especie canina y daño hepático inducido por cobre

Hepatotoxicity in dogs and copper induced hepatic damage

Autor/es

Laura Mendoza Jordà

Director/es

Natalia Guillén Monzón

Facultad de Veterinaria

2021

ÍNDICE

1. Resumen	2
2. Introducción	3
2.1. El hígado	3
2.1.1. Histología y anatomía hepática	3
2.1.2. Funciones del hígado	6
2.1.3. Tipos de daño hepático asociado a tóxicos	8
2.1.4. Pruebas de funcionalidad hepática y marcadores de daño hepático	11
2.2. Hepatotóxicos en perros	13
2.2.1. Hepatotóxicos farmacológicos	13
2.2.2. Hepatotóxicos químicos	14
2.2.3. Hepatotóxicos biológicos	15
3. Justificación y objetivos	15
4. Metodología	16
5. Resultados y discusión	16
5.1. Hepatitis asociada a cobre en perros	16
5.1.1. El cobre como metal esencial	16
5.1.2. Toxicocinética del cobre	17
5.1.3. Alteraciones en el metabolismo del cobre en perros y humanos	19
5.1.4. Diagnóstico	22
5.1.4.1. Diagnóstico clínico y laboratorio	22
5.1.4.2. Citología hepática y ecografía abdominal	25
5.1.4.3. Biopsia hepática	26
5.1.5. Tratamiento	29
6. Conclusiones	34
7. Valoración personal	36
8. Bibliografía	37

1. RESUMEN

El hígado es un órgano de vital importancia en la detoxificación y excreción de sustancias de deshecho y agentes tóxicos. Por ello, está expuesto a sufrir daño. Existen gran variedad de sustancias de diferente naturaleza que pueden causar daño hepatotóxico, entre ellas se encuentra el cobre, un metal esencial necesario para muchas funciones, pero capaz de lesionar el hígado si se acumula en exceso. La hepatitis asociada a cobre es una enfermedad causada por un defecto en la excreción del cobre que puede presentarse en humanos y en perros. Aunque se conoce la participación de factores genéticos en algunas razas, como la delección del exón 2 del gen *COMMD1* en el *bedlington terrier* o la mutación del *ATP7B* en el *labrador retriever*, aún se desconoce el grado de participación de otros factores no identificados en la etiopatogenia de esta enfermedad.

Actualmente el método de elección para el diagnóstico y seguimiento de la hepatitis asociada a cobre es la evaluación histológica y cuantificación de cobre de una muestra de biopsia hepática. Según el estadio de la enfermedad, el tratamiento puede basarse en una dieta baja en cobre y sales de zinc, cuando aún no han aparecido signos clínicos o histológicos, o en quelantes de cobre, cuando la enfermedad ya está avanzada y los niveles de cobre hepático son muy elevados.

ABSTRACT

The liver is extremely important in the detoxification and excretion of many waste products and toxic agents. Therefore, it is very exposed to damage. There is a great variety of substances of various nature that can lead to hepatotoxic damage, among of which is copper. Copper is an essential metal necessary to carry out many functions, but also capable of damaging the liver if it accumulates in excess. Copper-associated hepatitis is a disease caused by a defect in copper excretion that can be presented in humans and dogs. The participation of genetic factors is known in some breeds, such as the deletion of exon 2 of *COMMD1* gene in bedlington terriers or the *ATP7B* mutation in labrador retrievers, however the extent of involvement of other unidentified factors in the etiopathogenesis of this disease remains unknown.

Currently, the diagnosis and follow-up of copper-associated hepatitis is achieved by histological examination and copper determination of liver biopsy samples. The treatment may be based on a low copper diet and zinc salts when clinical or histological signs have not yet appeared, or based on copper chelators if the disease is advanced and high hepatic copper levels are present.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El hígado

El hígado es uno de los órganos de mayor tamaño del organismo de los vertebrados, pesando aproximadamente un 3% del peso corporal. Cumple numerosas funciones metabólicas de biosíntesis y vertido de numerosos compuestos en el plasma sanguíneo y en la bilis. El hígado tiene una gran capacidad de regeneración. Esta característica hace que el daño hepático pueda pasar inadvertido, ya que solamente se expresan síntomas clínicos cuando un 70-80% o más del parénquima hepático está afectado. Además, la enfermedad hepática, sobre todo en perros, suele cursar con síntomas inespecíficos que dificultan el diagnóstico de la patología concreta. El hígado también puede verse afectado de forma secundaria como consecuencia de su importante papel en el metabolismo y detoxificación (Kolb, 1987; Dillon, 1990).

2.1.1 Histología y anatomía hepática

El hígado está compuesto principalmente por **hepatocitos** (60-80% del parénquima): células epiteliales de gran tamaño (20 a 30 μm), poligonales, con un núcleo central, a veces doble, abundante citoplasma eosinófilo (indicando gran cantidad de mitocondrias), y una prominente red de Golgi y retículo endoplasmático que le permite sintetizar gran variedad de proteínas. Los hepatocitos se organizan en cordones que emanan desde la vena centrolobulillar, formando **lobulillos hepáticos** hexagonales que constituyen la unidad estructural básica. Entre los cordones de hepatocitos aparecen los **capilares sinusoidales**, cuya pared está formada por una capa discontinua de células endoteliales fenestradas carentes de membrana basal que favorecen en intercambio de sustancias, y que comunican los vasos del espacio porta con la vena central (Washabau, 2013).

En los canales de Hering, donde convergen los canalículos biliares con el conducto biliar, se localizan las **células ovals**: células madre hepatocíticas que dan lugar a los hepatocitos y a células del epitelio biliar (colangiocitos) (Bischoff, et al., 2018). Los **colangiocitos** conforman el tracto biliar y secretan agua, bicarbonato y cationes a la bilis primaria secretada por los hepatocitos. Además, también pueden actuar como células presentadoras de antígeno cuando hay daño hepático (Washabau, 2013).

Tipo celular	Función
Hepatocitos	Actividades metabólicas
Células ovals	Generar hepatocitos y colangiocitos
Células de Kupffer	Fagocitosis de patógenos y partículas
Células NK	Acción antineoplásica
Células estrelladas	Almacenaje de lípidos y vitamina A
Colangiocitos	Conformación del tracto biliar y secreción
Células endoteliales	Conformación de vasos sanguíneos y linfáticos
Musculatura lisa	Regulación de la microcirculación

Tabla 1. Resumen de los tipos celulares del hígado, adaptado de (Washabau, 2013).

Entre las células del endotelio sinusoidal se encuentran las **células de Kupffer**, con función fagocítica y presentadora de antígenos. También pueden estar involucradas en la destrucción de células neoplásicas metastáticas y tienen la capacidad de almacenar minerales o metales, como el cobre. En los sinusoides también residen las **células NK** (natural killer), con funciones antineoplásicas. Las **células estrelladas** almacenan lípidos y vitamina A, y se encuentran en el espacio de Disse, un compartimento localizado entre los hepatocitos y las células endoteliales que drena la linfa hacia los vasos linfáticos portales. Además, en situaciones patológicas, las células estrelladas se activan y producen colágeno que participa en la fibrosis del hígado (Piñeiro-Carrero & Piñeiro, 2004; Bischoff, et al., 2018).

Entre los vértices de lobulillos contiguos se encuentran los espacios porta, conformados por tejido conectivo y las denominadas **tríadas portales**, constituidas por una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta y un conducto biliar. También contienen vasos linfáticos y fibras nerviosas. Todo el hígado está recubierto por una cápsula de tejido conectivo fibroso (cápsula de Glisson), que profundiza en el parénquima y lo divide en dichos lóbulos y lobulillos (Megías, et al., 2019; Bischoff, et al., 2018; Washabau, 2013).

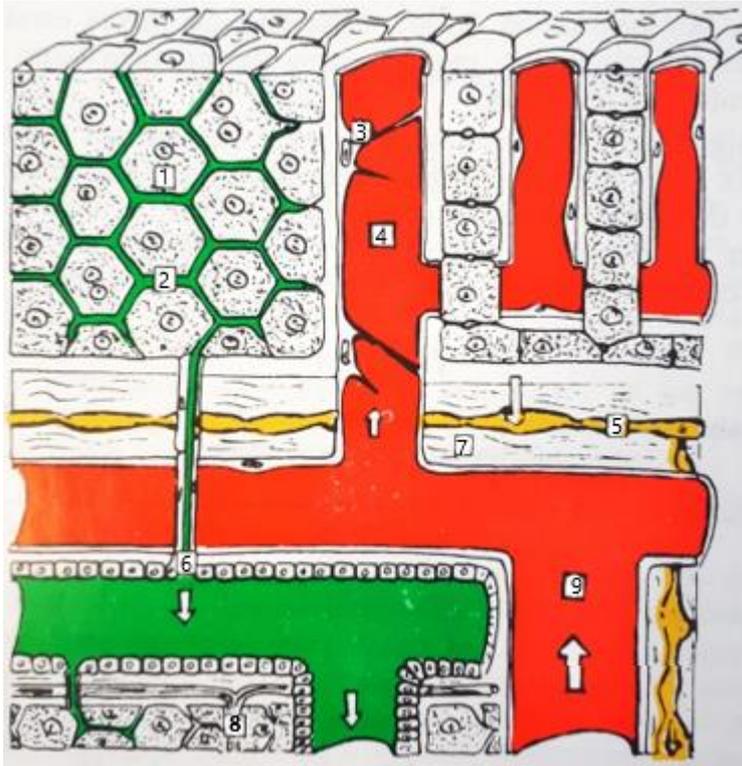


Figura 1. Representación gráfica de la estructura del hígado (Kolb, 1987):

Hepatocito (1), canalículo biliar (2), célula de Kupffer (3), capilar sanguíneo (4), vaso linfático (5), canal biliar (6), tejido conjuntivo (7), nervio (8), vena porta (9).

El lobulillo hepático se puede dividir en tres zonas según la distancia a la que se encuentra de la tríada portal, donde llega la sangre arterial. La zona 1 corresponde a la **región periportal**, donde los hepatocitos reciben sangre muy oxigenada. Estos hepatocitos son los primeros que entran en contacto con las toxinas que llegan al hígado. La zona 3 corresponde a la **región centrilobular**, donde se encuentran los hepatocitos más próximos a la vena central, que reciben mucho menos oxígeno. En esta zona los hepatocitos son ricos en citocromos P450, enzimas responsables de metabolizar xenobióticos, por los que están más especializados en reacciones de biotransformación. Finalmente, la zona 2 (media) está intercalada entre la zona 1 y 3 (Piñeiro-Carrero & Piñeiro, 2004; Washabau, 2013; Bischoff, et al., 2018).

El hígado se irriga mediante la arteria hepática y el retorno venoso se produce a través de la vena porta hepática (Dillon, 1990). La **vena porta** cubre un 70-75% del flujo sanguíneo y aporta sangre poco oxigenada y rica en compuestos procedentes del tracto gastro-intestinal, bazo y páncreas. Por otro lado, la **arteria hepática** contribuye aproximadamente en un 25% al riego total y transporta sangre oxigenada proveniente de la arteria aorta. La **vena central** de cada lóbulo drena las sustancias de deshecho del metabolismo de los hepatocitos. Las venas centro lobulillares confluyen dando lugar a las venas hepáticas y estas terminan en la vena cava inferior (Megías, et al., 2019).

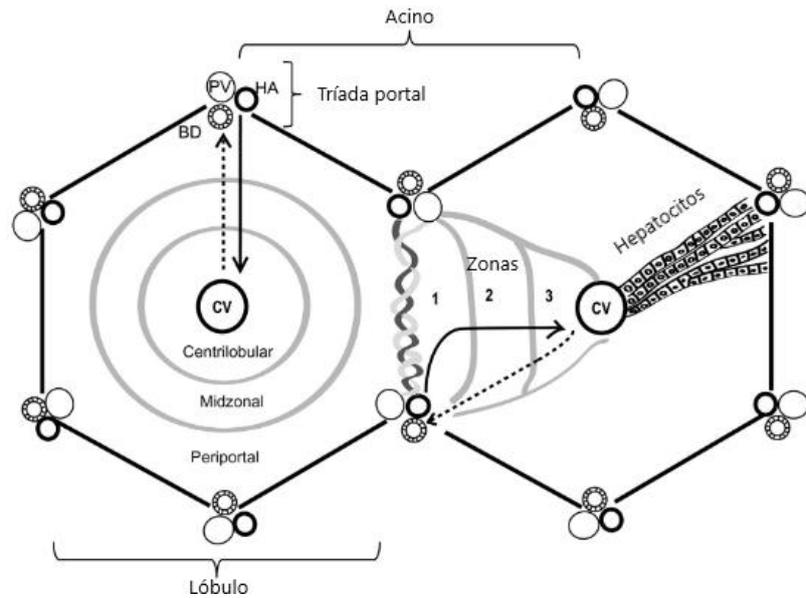


Figura 2. Esquema de la estructura hepática. Se observa la tríada portal, con la vena portal (PV), arteria hepática (HA) y conducto biliar (BD). La flecha continua indica la dirección del flujo sanguíneo y la discontinua de la bilis. Se indican las tres zonas según su distancia de la vena central (CV): centrilobular (zona 3), media (zona 2) y periportal (zona 1) (Bischoff, et al., 2018)

Entre los hepatocitos nacen **canalículos biliares**, que recogen la bilis. La **bilis** es una solución acuosa que contiene principalmente ácidos biliares, aunque también transporta productos de deshecho como excreciones endógenas y conjugados de glucurónido y glutatión de muchos xenobióticos, así como sustancias que ayudan a la digestión como las sales biliares, proteínas, colesterol y hormonas. La bilis se transporta de los canalículos a los conductos biliares, y de estos al conducto cístico hasta la vesícula biliar. Allí se almacena temporalmente hasta que se evacua a través del conducto biliar común hacia el duodeno, por donde se elimina en las heces (Megías, et al., 2019; Washabau, 2013).

2.1.2 Funciones del hígado

El hígado es un órgano responsable de casi 1500 funciones de gran importancia para la salud de los animales (Washabau, 2013). Las células hepáticas son responsables de la secreción endocrina de numerosas proteínas del plasma sanguíneo como albúminas, lipoproteínas, glicoproteínas, protrombina y fibrinógeno. Sirven de almacén y modifican vitaminas como la A, la D o la K, y hormonas como la hormona del crecimiento. Otras hormonas, como la insulina y el glucagón, se degradan en el hígado (Megías, et al., 2019; Bischoff, et al., 2018). Los hepatocitos también participan en el metabolismo de los carbohidratos (gluconeogénesis y glucogenólisis) y de los lípidos (síntesis de triglicéridos y colesterol). Además, es el lugar donde se eliminan un 20% de los glóbulos rojos envejecidos (el resto se elimina en el bazo), que son fagocitados por las células

de Kupffer. Otras funciones de importancia que se llevan a cabo en el hígado son: secreción de la bilis, degradación de grasas, síntesis de proteínas como ácido úrico y alantoína, formación de depósitos de oligoelementos, etc. (Kolb, 1987; Piñeiro-Carrero & Piñeiro, 2004).

Mecanismos de detoxificación

Una de las principales funciones del hígado es la detoxificación y eliminación de productos del catabolismo y sustancias exógenas. Algunos de los agentes xenobióticos que llegan al hígado son lipofílicos. Debido a que la excreción de estas sustancias es principalmente en orina o bilis, el hígado debe biotransformarlas para hacerlas solubles en agua. Los hepatocitos tienen dos estrategias para conseguirlo: el metabolismo de fase I (reacciones de modificación) y metabolismo de fase II (reacciones de conjugación). Los metabolitos de las reacciones de fase I suelen ser el sustrato de las reacciones de fase II, aunque no siempre (Washabau, 2013; Johnson, 2013).

Las **reacciones de fase I** consisten en oxidaciones, reducciones e hidrólisis de los compuestos a detoxificar. Las enzimas que participan en estas reacciones se encuentran principalmente en los hepatocitos centrilobulares. La oxidación es la reacción más importante de esta fase y la lleva a cabo el sistema enzimático denominado citocromo P450. Los sustratos que se usan son mayormente hormonas esteroideas, ácidos biliares, vitaminas liposolubles y casi todos los fármacos. Las reacciones de oxidación pueden generar epóxidos altamente reactivos, que se detoxifican rápidamente mediante una reacción de conjugación de fase II o una hidrólisis enzimática. Si la exposición al xenobiótico es demasiado elevada, los mecanismos se saturan y los metabolitos reactivos de fase I se acumulan, produciendo daño hepatocelular. Otras reacciones de fase I incluyen la reducción de compuestos nitrogenados a aminas o la hidrólisis de compuestos con enlaces amida y éster (Bischoff, et al., 2018).

Las **reacciones de fase II** participan principalmente en la conjugación de agentes tóxicos. Estas reacciones consisten en añadir un grupo polar a un grupo hidroxilo, carboxilo, amino o sulfhidrilo del sustrato. Estas moléculas polares incluyen ácido glucurónico (conjugan sustratos de alto peso molecular), sulfatos, acetatos, glutatión (secuestra radicales libres y recicla antioxidantes como las vitaminas E y C), metilos y aminoácidos como la glicina o cisteína (Washabau, 2013). Los radicales libres pueden generar especies de oxígeno reactivo (EOR) al interactuar con otras moléculas y reaccionar con los fosfolípidos de las membranas del hepatocito, induciendo la muerte celular, por lo que es importante que se neutralicen (Bischoff, et al., 2018).

Hay estudios que sugieren que existe un sistema transportador de fase III, que consiste en el uso de transportadores hepáticos empleados para la absorción de sustancias químicas

como método para excretar xenobióticos. En muchas razas de perros es común la presencia de una delección en el gen *ABCB1* para la p-glicoproteína, que participa en el transporte a través del epitelio canalicular. Por lo que esta mutación podría causar un defecto en la excreción de xenobióticos (Merola y Eubig, 2014).

El ciclo de la urea también es un proceso de detoxificación muy importante que tiene lugar en el hígado. El amoníaco resultado del catabolismo de las proteínas es muy tóxico, por eso los hepatocitos lo convierten en urea o ácido úrico para disminuir su toxicidad y poder eliminarlo. Una insuficiencia hepática puede afectar este mecanismo, produciendo un aumento del amoníaco en sangre y provocando una encefalopatía hepática (Washabau, 2013).

2.1.3 Tipos de daño hepático asociado a tóxicos

Aunque el hígado está dotado de una gran capacidad de regeneración, si el daño que se inflige es severo puede que su habilidad para regenerarse se vea afectada y se desarrolle una insuficiencia hepática, que puede terminar con la vida del animal.

Muerte celular

La **necrosis** es la forma predominante de muerte celular por exposición a tóxicos. Durante la necrosis celular, se pierde la homeostasis osmótica y se hinchan el retículo endoplasmático y las mitocondrias. Eventualmente, las membranas celulares se rompen y se vierte el contenido de la célula, incluidas sus enzimas citosólicas, provocando la inflamación del parénquima. La funcionalidad hepática se ve afectada dependiendo del grado de extensión de la necrosis (Shehu, et al., 2017). Las zonas de necrosis se distribuyen de diferentes formas, pudiendo afectar desde hepatocitos individuales hasta lóbulos enteros. La necrosis puede ser primaria, causada por intermediarios reactivos, o secundaria a la infiltración de células inflamatorias. Un mecanismo alternativo de necrosis es la inhibición de síntesis proteica, como es el caso de la *Amanita* spp y otros hongos, que inhiben la acción de la ARN polimerasa y, como resultado, la síntesis de mRNA. (Bischoff, et al., 2018).

La **apoptosis** es la “muerte programada” de las células, pero a veces puede ser inducida por xenobióticos. Las células apoptóticas sufren una degradación controlada por parte de las enzimas proteolíticas caspasas. Estas se encogen, condensan su núcleo y cromatina, y son inmediatamente eliminadas por los fagocitos. Este tipo de muerte celular no se asocia a inflamación ya que el contenido celular no se libera al exterior (Shehu, et al., 2017). Aunque la necrosis y la apoptosis son dos fenómenos distintos, se puede considerar que representan dos extremos del ciclo de la muerte celular (Bischoff, et al., 2018).

Esteatosis hepática y esteatohepatitis

La esteatosis hepática es un tipo de degeneración que consiste en la acumulación de vacuolas lipídicas dentro de los hepatocitos. Es una respuesta común ante gran variedad de hepatotóxicos, como por ejemplo las aflatoxinas, los fósforos amarillos y el etanol. Aunque es una lesión potencialmente reversible y benigna, se conoce que puede progresar hasta fibrosis e incluso cirrosis si no se trata. El hígado adquiere un aspecto engrosado, friable y con una coloración aclarada muy característica (Bischoff, et al., 2018).

La esteatosis se denomina microvesicular cuando las vacuolas lipídicas son pequeñas y no desplazan el núcleo, y se suele asociar con un proceso crónico. La esteatosis macrovesicular consiste en una vacuola grande que desplaza el núcleo del hepatocito hacia la periferia del citoplasma, e indica un desajuste en la absorción de ácidos grasos y secreción de lipoproteínas secundario a la movilización excesiva de triglicéridos, disminución de oxidación de ácidos grasos u otras anomalías metabólicas. La intensidad de la manifestación clínica depende en mayor grado de la diseminación de la necrosis hepatocelular que de la presencia de grasa. La necrosis y la infiltración grasa son procesos separados; cada uno tiene una patogenia diferente y puede resolverse de forma independiente (Dillon, 1990).

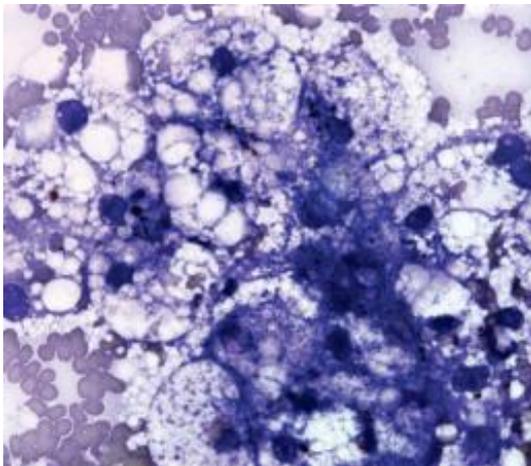


Figura 3. Aspirado con aguja fina de hígado de gato con esteatosis hepática. Se observan hepatocitos con vacuolas microvesiculares y macrovesiculares (Lidbury & Steiner, 2013).



Figura 4. Imagen laparoscópica de un hígado con cirrosis de un perro tratado a largo plazo con fenobarbital para la epilepsia (Johnson, 2013).

La esteatohepatitis suele ser el resultado de una esteatosis sin tratar. Consiste en el acúmulo de lípidos dentro de los hepatocitos junto con inflamación del parénquima hepático. Las células inflamatorias que aparecen suelen ser neutrófilos y leucocitos mononucleares. La distribución suele ser aleatoria y multifocal. Las causas suelen ser las mismas que provocan la esteatosis en perros (Bischoff, et al., 2018).

Fibrosis y cirrosis hepática

La **fibrosis** es una lesión inespecífica resultante de una inflamación crónica en la que se sustituyen hepatocitos muertos por tejido fibroso. Suele localizarse cerca del espacio portal, en el espacio de Disse y alrededor de venas centrales. La fibrosis periportal puede producir hipertensión portal. La **cirrosis** es el estadio terminal de la enfermedad hepática. El hígado presenta cambios irreversibles caracterizados por un exceso de depósitos de colágeno formando tejido fibroso. El pronóstico a partir de este punto es reservado (Bischoff, et al., 2018; Johnson, 2013).

Acumulación de pigmentos

Existen varias sustancias que pueden acumularse dentro de los hepatocitos o células de Kupffer y dar coloraciones visibles microscópicamente. A veces incluso pueden teñir el hígado macroscópicamente, como por ejemplo el pigmento biliar, que da una coloración amarillo-verdosa al hígado cuando se acumula en el hígado. También se puede acumular hierro en forma de hemosiderina, y cobre, que se puede visualizar microscópicamente con una tinción específica, como la rodamina. En muchas ocasiones es necesario el uso de tinciones especiales para poder identificar histológicamente la sustancia en cuestión (Bischoff, et al., 2018).

Neoplasias

Las neoplasias inducidas por químicos pueden originarse a partir de hepatocitos, epitelio biliar, y muy raramente de endotelio sinusoidal. Suelen aparecer al cabo de meses o años tras la exposición al tóxico (Piñeiro-Carrero & Piñeiro, 2004). Algunos agentes no genotóxicos que pueden llegar a producir neoplasias incluyen herbicidas fenoxiácidos y fármacos hipolipidímicos. Los hemangiosarcomas derivan del epitelio sinusoidal y son raros pero muy letales. Se han descrito casos de hemangiosarcoma por exposición a cloruro de vinilo y arsénicos inorgánicos, entre otros (Bischoff, et al., 2018).

Megalocitosis

Se puede observar en animales de edad avanzada, pero también es una lesión característica de intoxicaciones por aflatoxinas y alcaloides de pirrolizidina (toxinas naturales de algunas plantas). La megalocitosis se produce por un error en la división celular que da lugar a células hepáticas más grandes de lo normal. Los alcaloides de pirrolizidina tienen efectos antimitóticos, pero no inhiben la síntesis de ADN, de forma que aumentan de tamaño, pero no pueden dividirse. La toxicosis crónica por pirrolizidina también suele acompañarse de fibrosis hepática, así como hiperplasia biliar, además de megalocitosis (Bischoff, et al., 2018).

2.1.4 Pruebas de funcionalidad hepática y marcadores de daño hepático

Las pruebas de funcionalidad hepática y de daño hepatocelular permiten detectar una posible enfermedad del hígado y pueden ser de utilidad para determinar el tipo de disfunción hepática, valorar la gravedad y evaluar la respuesta al tratamiento. Su medición puede ayudar a establecer un diagnóstico acertado así como a establecer un plan terapéutico adecuado.

Marcadores de daño hepático

Aminotransferasas: La alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) son enzimas hepáticas marcadoras de **daño hepatocelular**. Se consideran marcadores sensibles, pero no son específicos del hígado ya que también se producen en otros tejidos. La actividad de AST es mayor en el riñón, corazón y músculo esquelético que en hígado, mientras que la actividad de la ALT es mayor en el hígado. La duración y elevación de la actividad de estas enzimas puede dar una idea de la severidad del daño hepático, pero no debe ser considerado como diagnóstico (Bischoff, et al., 2018; González & Peña, 2021; Agrawal, et al., 2016; Lidbury & Steiner, 2013).

Fosfatasa alcalina (FA): Esta enzima se origina principalmente en el hígado y hueso, pero puede estar presente en muchos otros tejidos. Esto hace que presente una alta sensibilidad pero muy baja especificidad por el hígado, lo que puede dificultar la interpretación si no se dispone de una biopsia hepática. Un aumento en su actividad puede indicar colestasis, pero no puede diferenciar si el origen es intra o extrahepático (González & Peña, 2021; Bischoff, et al., 2018; Lidbury & Steiner, 2013).

Gammaglutamil transpeptidasa (GGT): La GGT es una glicoproteína de membrana con un importante papel en la detoxificación celular. Esta enzima se localiza en mayor concentración en el riñón y páncreas, en menor medida en el hígado y otros tejidos. Un aumento en la actividad de la GGT puede indicar colestasis, por lo que puede ser de utilidad para confirmar una causa intrahepática cuando la FA también está alterada (Giannini, et al., 2005; Bischoff, et al., 2018; Agrawal, et al., 2016).

Prueba	Origen	Indicador	Sensibilidad y especificidad
ALT	Hígado	Daño hepatocelular	↑S, ↑E
AST	Corazón, músculo esquelético, riñón, hígado	Daño hepatocelular	↑S, ↓E
FA	Hígado, hueso, placenta, intestino, leucocitos, riñón	Colestasis	↑↑S, ↓↓E
GGT	Riñón, páncreas, hígado, bazo, corazón, cerebro.	Colestasis	↑S, ↓E

Tabla 2. Pruebas de daño hepático.

Pruebas de funcionalidad hepática

Albumina: Es una proteína sérica que participa en muchas funciones del organismo, como el transporte molecular. La albúmina solo se sintetiza en el hígado, de manera que su disminución suele indicar una disfunción hepática. No es un buen indicador de enfermedad hepática aguda o crónica leve puesto que su vida media en suero es larga (unos 8 días). La concentración de albúmina sérica suele correlacionarse con el pronóstico de la hepatopatía crónica (Agrawal, et al., 2016). Debe tenerse en cuenta que bajos valores de albúmina también pueden estar influidos por otros factores no hepáticos que cursen con pérdida proteica (González & Peña, 2021; Lidbury & Steiner, 2013).

Bilirrubina: La bilirrubina es un pigmento derivado de la hemoglobina que se libera como resultado de la degradación de hematíes y se excreta en la bilis, para terminar siendo eliminada en la orina o heces. Un aumento en la bilirrubina sérica produce ictericia (prehepática, hepática o posthepática) al acumularse en los tejidos (Agrawal, et al., 2016; González & Peña, 2021). La hiperbilirrubinemia prehepática está producida por un aumento en la hemólisis y suele ir acompañada de anemia. La hiperbilirrubinemia hepática está causada por insuficiencia hepática y/o colestasis y suele ir acompañada de un aumento en las enzimas marcadoras tanto de daño hepatocelular como de colestasis. Por último, la hiperbilirrubinemia posthepática se debe a una obstrucción extrahepática de los conductos biliares, por ejemplo por una pancreatitis o una neoplasia (Lidbury & Steiner, 2013).

Tiempo de protrombina (TP): El tiempo de protrombina mide el tiempo que tarda la protrombina en pasar a trombina. Para ello se requieren los factores de coagulación II, V, VII y X, que son principalmente sintetizados en el hígado. Por esto, un TP prolongado refleja un fallo funcional del hígado. Además, como los factores de coagulación tienen un tiempo de vida medio corto (≤ 1 día), se puede detectar daño hepático agudo ya que la prolongación del TP se instaurará con mayor rapidez (González & Peña, 2021). Es importante distinguir el TP prolongado causado por enfermedad hepatocelular del causado por colestasis crónica asociada a malabsorción de grasas por un déficit de vitamina K (Agrawal, et al., 2016).

Ácidos biliares (AB): Los ácidos biliares son derivados del colesterol que se sintetizan en el hígado y se eliminan en la bilis vía orina o heces (Briozzo, et al., 2005). Un aumento en los ácidos biliares suelen sugerir una pérdida de funcionalidad del hígado, que puede ser debida a disminución del parénquima hepático, colestasis o shunt portosistémico. Sin embargo, no son específicos de ninguna enfermedad hepática concreta (Dirksen, et al., 2017; Bischoff, et al., 2018; Lidbury & Steiner, 2013).

Prueba	Indicador	Interpretación de su elevación
Bilirrubina	Disfunción hepática	Insuficiencia hepática, colestasis
Albúmina	Disfunción hepática	Valor predictivo de enfermedad hepática crónica
TP	Disfunción hepática	Enfermedad hepática aguda o malabsorción por deficiencia de vitamina K
Ácidos biliares	Disfunción hepática	Disminución del parénquima, colestasis o shunt portosistémico

Tabla 3. Marcadores de funcionalidad hepática.

2.2. Hepatotóxicos en perros

Existe gran variedad de compuestos que pueden causar hepatotoxicidad, ya sean fármacos, suplementos dietéticos o herbales, sustancias químicas o toxinas biológicas. La hepatotoxicidad de algunas sustancias está bien descrita y es previsible (intrínseca), mientras que las de otras es impredecible (idiosincrática). Las reacciones idiosincráticas no dependen del tiempo o de la dosis, y ocasionan daño hepático a un individuo o un pequeño grupo de individuos de la población expuesta, mientras que el resto no experimenta ningún tipo de efecto adverso. La relación causa-efecto entre el fallo hepático y la exposición a fármacos o toxinas por lo general es difícil de establecer, de manera que a menudo el diagnóstico de hepatotoxicidad es un hallazgo circunstancial (Sherding, 1990; Johnson, 2013).

2.2.1 Hepatotóxicos farmacológicos

La acción de los fármacos terapéuticos sobre la funcionalidad hepática en los perros está influida por dos parámetros: el efecto de los fármacos sobre el hígado (en condiciones normales y patológicas) y el efecto de la disfunción hepática sobre el metabolismo del fármaco. Los fármacos hepatotóxicos también pueden clasificarse en función de la lesión que producen. Por un lado, se encuentran los que causan daño agudo, que pueden ocasionar lesión citotóxica (degeneración, necrosis y esteatosis), colestásica o daño mixto. Por otro lado, se encuentra la hepatopatía crónica inducida por fármacos, que puede dar lugar a cirrosis, fibrosis, esteatosis o neoplasias. La enfermedad crónica por lo general es el resultado de un tratamiento mínimo de 6 a 9 meses o años sin presentación de enfermedad aguda. El estado del hígado suele mejorar en estos casos después de suspender la administración del fármaco nocivo (Dillon, 1990).

Fármaco	Reacción adversa
AINEs ^{2,4}	Elevación de enzimas hepáticas
Amiodarona ⁴	Elevación de enzimas hepáticas, hepatitis
Aspirina ^{1,2}	Hepatitis
Butamisol ¹	Ictericia

Dietilcarbamazina ¹	Ictericia
Doxiciclina ⁴	Elevación de enzimas hepáticas
Fenazopiridina ⁵	Elevación de enzimas hepáticas
Fenilbutazona ¹	Elevación de enzimas hepáticas
Fenobarbital ⁴	Hepatitis crónica, cirrosis
Fenoitina ^{1,7}	Elevación de enzimas hepáticas, hepatitis, cirrosis
Glicobiarsol ¹	Ictericia
Glucocorticoides ^{4,7}	Hepatitis esteroidea vacuolar
Ketamina ¹	Esteatosis hepática
Ketoconazol ^{3,4}	Elevación de enzimas hepáticas, ictericia
Mebendazol ¹	Hepatitis
Paracetamol ²	Ictericia, coagulopatía
Prednisolona ¹	Elevación de enzimas hepáticas
Primidona ^{1,7}	Elevación de enzimas hepáticas, hepatitis, cirrosis
Sulfonamidas ⁴	Hepatitis aguda
Tetraciclina ⁷	Lipidosis hepática
Tiacetarsamida ^{1,7}	Ictericia, elevación de enzimas hepáticas.
Trazodona ⁶	Elevación enzimas hepáticas

Tabla 4. Reacciones adversas de algunos fármacos hepatotóxicos ¹(Sherding, 1990), ²(ASPCA), ³(Macho, et al., 2020), ⁴(Johnson, 2013), ⁵(Holahan, et al., 2010), ⁶(Arnold, et al., 2021), ⁷(Papich & Davis, 1985).

2.2.2 Hepatotóxicos químicos

Muchos compuestos industriales, solventes orgánicos, pesticidas y metales pesados se asocian con daño hepático inducido que puede resultar en necrosis o degeneración hepatocelular y hepatitis aguda. La exposición a sustancias químicas hepatotóxicas puede ser rápidamente fatal en algunos casos, mientras que en otros la lesión hepática se resuelve y la recuperación es completa (Sherding, 1990). Esto depende de diferentes factores como la forma química del compuesto, la dosis, la vía de exposición, la duración de la exposición al tóxico, la toxicidad del compuesto, la edad y género del individuo expuesto, su genética y su estado de salud general, entre otros (Merchán et al., 2008).

El cobre es un metal que se encuentra en trazas en la comida y el agua de manera natural, y que es necesario para realizar muchas funciones del organismo. Sin embargo, es altamente tóxico para las células hepáticas si se encuentra en estado libre, ya que induce estrés oxidativo, resultando en necrosis e inflamación hepática. Algunas razas o cruces de perros están predispuestos a acumularlo, y desarrollan una hepatitis crónica caracterizada por el acúmulo excesivo de gránulos de cobre en los hepatocitos debido a un defecto de excreción, que puede progresar a cirrosis (Rodrigues, et al., 2020; Nakaichi, et al., 2021; Wu, et al., 2016). La acumulación por cobre es actualmente la causa más común de hepatitis crónicas tóxicas en perros (Johnson, 2013).

Compuesto	Fuente	Reacción adversa
Metaldehído	Molusquicida	Daño hepático y cirrosis
Hierro	Suplementos, fertilizantes	Elevación de enzimas hepáticas, coagulopatía
Cobre	Agua y pienso	Hepatitis crónica, cirrosis
Paradiclorobenceno	Insecticida	Daño hepático
Xilitol	Edulcorante	Necrosis hepática

Tabla 5. Algunos compuestos con efecto hepatotóxico en perros recogidos por la organización *American Society for the Prevention of Cruelty to Animals* (ASPCA).

2.2.3 Hepatotóxicos biológicos

En la naturaleza existen muchas toxinas biológicas que pueden causar daño al hígado. Los perros suelen ingerirlas accidentalmente o por su sabor, resultando en cuadros potencialmente graves de hepatotoxicidad. En la siguiente tabla se resumen las toxinas más habituales.

Toxina	Reacción adversa
Aflatoxina ^{1,2} (<i>Aspergillus flavus</i>)	Necrosis aguda, lipidosis crónica
Lectinas ¹ (Ricino, <i>Robinia pseudoacacia</i> , Muérdago)	Ictericia, hepatitis
Aceites esenciales ¹	Ictericia, hepatitis
Cicasina ^{1,3} (<i>Cycas</i> spp.)	Fallo hepático
Alcaloides de pirrolizidina ³ (fitotoxina)	Fallo hepático
Algas verde azuladas ^{1,2} (<i>Microcystis</i> spp., <i>Nodularia</i> spp., <i>Oscillatoria</i> spp., <i>Anabena</i> spp.)	Hepatitis aguda, fallo hepático
Amanitina ^{1,2,3} (<i>Amanita</i> spp., <i>Galerina</i> spp., <i>Conocybe</i> spp., <i>Lepiota</i> spp.)	Fallo hepático
Endotoxinas bacterianas ²	Necrosis, esteatosis, colestasis

Tabla 6. Algunas hepatotoxinas de origen biológico ¹(ASPCA), ²(Sherding, 1990), ³(Bischoff, et al., 2018).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El hígado es el primer órgano en recibir la sangre del sistema digestivo debido a su proximidad, por lo que constituye el primer filtro de muchas sustancias ingeridas y el principal lugar de metabolización de xenobióticos. Como consecuencia de ello, las células hepáticas pueden estar expuestas a altas concentraciones de determinados compuestos con capacidad de provocar daño hepatocelular, disfunción o incluso fallo hepático. El hígado, además, debido a sus numerosas funciones y múltiples tipos celulares, puede responder de diferentes formas a la exposición aguda o crónica. Por todo lo anterior es necesario tener un conocimiento básico de sus funciones, de su estructura, etc.

Respecto al cobre, el hígado es imprescindible en su homeostasis y su almacenaje. En determinadas circunstancias, las células hepáticas pueden acumular grandes cantidades de cobre, resultando en daño hepático. Esto sucede por ejemplo en la hepatitis asociada a cobre canina, una enfermedad muy extendida pero aún muy desconocida. Actualmente los casos notificados van en aumento y parece que se amplía el rango de razas afectadas. Por ello, es

importante tratar de recopilar información para llegar a un mejor entendimiento de dicha patología.

Los objetivos de este trabajo son abordar la hepatotoxicidad, analizar el papel del hígado como detoxificador y revisar algunos de los hepatotóxicos más comúnmente descritos en perros prestando especial atención al desarrollo de la hepatitis asociada a cobre en perros, así como a su etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento. También se pretende identificar los últimos hallazgos científicos relacionados con esta enfermedad.

4. METODOLOGÍA

La información utilizada para realizar esta revisión bibliográfica sobre la hepatotoxicidad y hepatitis asociada a cobre en perros ha sido obtenida mediante la búsqueda exhaustiva de artículos científicos, libros y páginas web. Se han consultado diferentes fuentes bibliográficas para obtener información contrastada, veraz y lo más precisa posible principalmente de bases de datos científicas como *Pubmed* y *Google Académico*, utilizando los siguientes criterios de búsqueda: artículos más actuales (2000 hasta la actualidad, con alguna excepción), artículos relacionados o citados en otros artículos y uso de la combinación de palabras clave: *copper*, *hepatotoxicity*, *liver*, *dog*, *bedlington terrier*, *labrador retriever*, *COMMD1*, *diagnosis*, *treatment*. La búsqueda se la realizado principalmente en inglés, ya que es la lengua universal del campo científico, pero también en castellano. La mayoría de artículos utilizados han sido revisiones sistemáticas y ensayos clínicos. También se ha recopilado información de libros cedidos por el servicio de la biblioteca de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Para facilitar el manejo de las referencias se ha usado el gestor bibliográfico Mendeley.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Hepatitis asociada a cobre en perros

5.1.1 El cobre como metal esencial

El cobre es un oligoelemento esencial para muchas funciones vitales del organismo, incluyendo la respiración mitocondrial, la defensa antioxidante, síntesis de neurotransmisores, formación de tejido conectivo, pigmentación y metabolismo del hierro. Este metal también es cofactor de numerosas enzimas, proteínas de transporte de electrones y de moléculas antioxidantes. Sin embargo, cuando se encuentra libre es un ion tóxico debido a su potencial de generar especies de oxígeno reactivo (EOR). Por ello, la absorción, distribución y excreción de cobre están estrictamente reguladas (Dirksen & Fieten, 2017; Fieten, et al., 2012a).

5.1.2 Toxicocinética del cobre

El cobre se encuentra en todos los piensos caninos en mayor o menor medida, de manera que la exposición primaria es vía el tracto digestivo. Una vez ingerido, el cobre se absorbe principalmente en el intestino delgado a través de los enterocitos. La absorción entérica está mediada por transportadores. En los enterocitos, el cobre se encuentra principalmente en el citosol unido a proteínas. A continuación, el cobre pasa a la circulación portal, donde se une a proteínas transportadoras que lo acompañan hasta el hígado (Fuentealba & Aburto, 2003). En los hepatocitos, el cobre realiza sus funciones y el exceso es secuestrado en lisosomas y excretado en la bilis. Parte del cobre hepático se distribuye a través de la sangre a tejidos periféricos (Rolfe & Twedt, 1995; Thornburg, 2000).

La absorción entérica de cobre está mediada principalmente por el transportador de cobre 1 (CTR1), que presenta una alta afinidad por el cobre (Kruitwagen, et al., 2019). La ATPasa transportadora de cobre alfa (ATP7A) se localiza en la membrana basal de los enterocitos y facilita el transporte del cobre hacia la circulación portal. En la sangre portal, el cobre se une principalmente a la albúmina y entra al citosol hepatocelular a través del CTR1 apical (Dirksen & Fieten, 2017). Después de entrar en el hepatocito, el cobre se une inmediatamente a proteínas para prevenir daño oxidativo. Estas proteínas son las primeras en ligar y almacenar el cobre e incluyen la metalotioneína (MT) y el glutatión (GSH), entre otras.

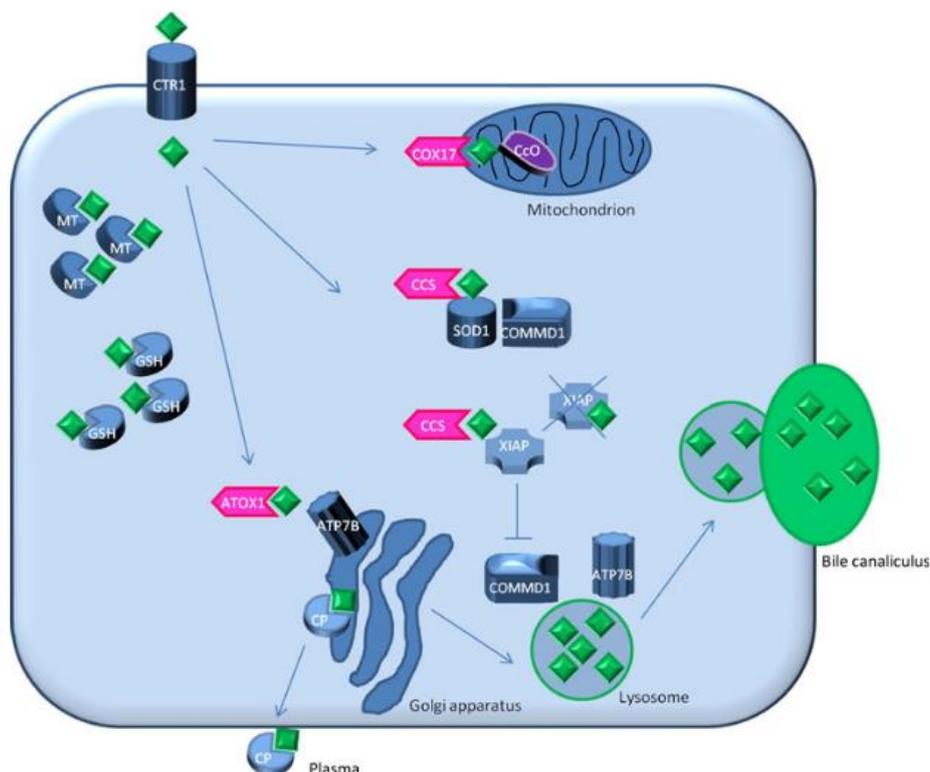


Figura 5. Esquema gráfico del metabolismo del cobre en el hepatocito (Fieten, et al., 2012a). Cobre (rombos verdes); transportador de cobre 1 (CTR1); metalotioneína (MT) y glutatión (GSH); chaperonas (COX17, CCS y ATOX1); citocromo c oxidasa (CcO); superóxido dismutasa (SOD1); ceruloplasmina (CP).

Las chaperonas de cobre son proteínas especiales de distribución que aseguran la llegada segura del cobre a su destino específico, protegiéndole de los mecanismos de detoxificación celular (Bravo-Gómez, et al., 2015). Se han descrito tres vías de distribución de cobre que requieren de la acción de las chaperonas. La ciclooxigenasa 17 (COX17) es la chaperona de cobre para la citocromo c oxidasa (CCO), que reside en la membrana interna mitocondrial. La CCO es la enzima terminal en la cadena respiratoria mitocondrial y juega un papel importante en la respiración celular. La chaperona de cobre para la superóxido dismutasa (CCS) cede el cobre a la superóxido dismutasa (SOD1), una enzima que utiliza este metal como cofactor para llevar a cabo su función antioxidante (Bravo-Gómez, et al., 2015). La chaperona de cobre antioxidante 1 (ATOX1) es la chaperona para los transportadores de cobre, ATP7A y ATP7B (ATPasa transportadora de cobre alfa y beta) (Dirksen & Fieten, 2017; Wu, et al., 2016).

Ambas transportadoras se ubican en la red del trans-Golgi (RTG) cuando hay concentraciones normales de cobre. Cuando los niveles de cobre intracelular aumentan, los transportadores se alejan de la RTG hacia sus destinos respectivos. En la RTG, la ATP7B carga 6 átomos de cobre a la ceruloplasmina, y se secretan a la circulación. La ceruloplasmina es la principal proteína transportadora de cobre en la circulación sanguínea. La ATP7B también se responsabiliza de la excreción del exceso de cobre a la bilis mediante exocitosis lisosomal en la membrana apical del hepatocito. La excreción biliar de cobre constituye hasta el 95% de la excreción total del cobre. (Kruitwagen, et al., 2019). Anteriormente, se creía que el papel principal de la ATP7A era la absorción de cobre en el intestino, pero recientemente se ha demostrado que también tiene una importante participación en la movilización y redistribución de cobre hepático en caso de deficiencia de cobre periférico (Wu, et al., 2016).

La proteína COMMD1 interacciona con el amino terminal de la ATP7B y supuestamente facilita la excreción biliar del exceso de cobre. Además, la COMMD1 está involucrada en el control de estabilidad y calidad de las dos ATPasas transportadoras. También se sugiere una interacción entre COMMD1 y la proteína XIAP (inhibidora de la apoptosis). El cobre se une a la XIAP y produce un cambio conformacional que induce una disminución del umbral de apoptosis. Este fenómeno puede explicar parte de la patogenia de la hepatitis asociada a cobre, que empieza con acúmulo de cobre y es seguida de apoptosis hepatocelular. De forma que puede que el estrés oxidativo producido por el cobre libre no sea el único desencadenante, lo cual podría tener repercusiones en relación con las intervenciones terapéuticas (Dirksen & Fieten, 2017; Fieten, et al., 2012a).

5.1.3 Alteraciones del metabolismo del cobre en perros y humanos

Un defecto en el metabolismo del cobre hace que este se acumule en el hígado, donde induce la muerte celular de los hepatocitos resultando en una hepatitis que puede progresar a cirrosis y fallo hepático (Wu, et al., 2016). La hepatitis asociada a cobre se puede dividir en primaria o secundaria en base a la causa subyacente. La hepatitis primaria asociada a cobre se debe a un defecto genético que altera el metabolismo de este metal. El *bedlington terrier*, *labrador retriever*, *Dóberman*, *Dálmata*, *cocker spaniel*, *west highland terrier* y *skye terrier* son razas con predisposición a este tipo de hepatitis (Johnson, 2013). La hepatitis secundaria asociada a cobre puede aparecer como consecuencia de una obstrucción del flujo biliar que impide la excreción de cobre o por una ingesta excesiva de cobre en la dieta. Tanto la hepatitis primaria como la secundaria resultan en niveles aumentados de cobre intra-hepático, aunque los niveles observados en la hepatitis primaria parecen ser mayores (Rodrigues, et al., 2020).

Recientemente se ha observado un aumento de los casos en perros no predispuestos genéticamente, como por ejemplo el Pastor Alemán o el *Cocker Spaniel*. Por esto, actualmente se considera que es una enfermedad multifactorial, ya que todavía hay muchos factores epidemiológicos desconocidos implicados en el desarrollo de esta hepatopatía (Wu, et al., 2016; Rodrigues, et al., 2020).

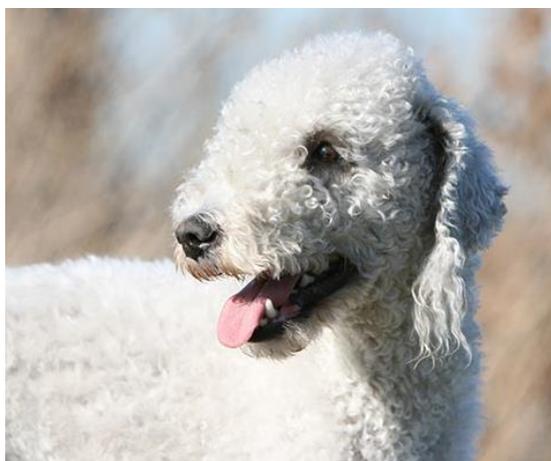


Figura 6. *Bedlington terrier*. Fuente: American Kennel Club (2021).



Figura 7. *Labrador retriever*. Fuente: Zooplus magazine (2021).

Bedlington terrier

El *bedlington terrier* fue la primera raza canina en la que se estudió la hepatitis asociada a cobre y es la única raza en la que se ha identificado una mutación causal mediante estudios de mapeo genómico. La identificación de la mutación fue un hallazgo muy importante para comprender la homeostasis del cobre en mamíferos y en el uso de razas puras para la identificación de genes

causantes de enfermedad. La mutación causal consiste en una delección en el exón 2 del gen *COMMD1*, que da lugar a una hepatitis asociada a un defecto en la excreción de cobre y presenta un carácter autosómico recesivo (Dirksen & Fieten, 2017; Wu, et al., 2016; Kruitwagen, et al., 2019).

Esta mutación se encontró mediante una estrategia de clonación posicional en la que se consiguió identificar una delección genómica abarcando aproximadamente el exón 2 del gen originalmente llamado *MURR1*. Se desconocía hasta el momento que este gen estuviera involucrado en el metabolismo del cobre, y tampoco se conocían funciones relacionadas con el cobre de la proteína codificada por dicho gen. Al descubrir nueve proteínas más relacionadas con la proteína *MURR1*, el gen se renombró “gen del Metabolismo del Cobre *MURR1* que contiene el Dominio 1” (*COMMD1: Copper Metabolism gene MURR1 containing Domain 1*). Se realizaron pruebas con homogeneizados de hígado de *bedlington terriers* afectados por esta enfermedad y no se pudo detectar la presencia de la proteína *COMMD1*, lo que sugería que la delección del exón 2 de *COMMD1* daba lugar a una pérdida de función completa de la *COMMD1* (Fieten, et al., 2012a; Fieten, et al., 2014a).

Gracias al desarrollo de pruebas de ADN, la prevalencia de hepatitis asociada a cobre en poblaciones de *bedlington terriers* ha disminuido significativamente. Recientemente se han detectado casos de hepatitis no relacionadas con el gen *COMMD1* en algunos *bedlington terrier*. Mediante estudios de asociación genómica y secuenciación, se ha descubierto una asociación significativa de esta enfermedad con el gen *ABCA12* en *bedlington terriers* con hepatitis por cobre no asociada con el gen *COMMD1*. El gen *ABCA12* tiene una estrecha relación funcional con la *ATP7B*, responsable de la enfermedad de Wilson en humanos. Es necesaria mayor investigación al respecto (Haywood, et al., 2016).

Labrador retriever

El *labrador retriever* es la segunda raza más estudiada en relación con la hepatitis asociada al cobre. En esta raza, la enfermedad presenta una herencia compleja de la que se conoce la participación de factores genéticos, así como dietéticos. Un estudio de asociación genómica demostró una correlación significativa entre concentraciones elevadas de cobre hepático y una mutación en el gen *ATP7B*, el mismo que causa la enfermedad de Wilson en humanos. Además, también se observó que la presencia de una mutación en el gen *ATP7A* parece atenuar la acumulación de cobre hepático sin dar lugar a desórdenes de deficiencia de cobre. Aproximadamente el 12% de la heredabilidad total de la enfermedad se puede explicar con estas dos mutaciones conocidas (Dirksen & Fieten, 2017).

Por otro lado, un estudio de Fieten et al. (2012b) demostró que los niveles de cobre y zinc en piensos comerciales pueden influir en las concentraciones de cobre hepático, representando un factor de riesgo para el desarrollo de hepatitis asociada a cobre en *labrador retrievers* con predisposición genética. Además, otro estudio probó la eficacia de una dieta baja en cobre y alta en zinc para la prevención de la progresión de la enfermedad, apoyando la importancia de la dieta recalcada en el anterior estudio (Fieten, et al., 2012a). La predisposición al acúmulo de cobre hepático puede ser influenciada por factores medioambientales u otras mutaciones genéticas no identificadas. Los caracteres de acumulación de cobre pueden presentar hasta un 85% de heredabilidad (Fieten, et al., 2016; Hoffmann, et al., 2008). Tanto en el *labrador retriever* como en el dóberman se ha observado una fuerte predisposición en el caso de las hembras, mientras que en otras razas afecta por igual a ambos sexos (Fieten, et al., 2014a).

Humanos

Así como en el *labrador retriever*, los humanos también pueden padecer hepatitis asociadas a cobre debidas a defectos genéticos que interfieren en el metabolismo del cobre. Una mutación en la ATP7A produce un desorden de deficiencia de cobre llamado enfermedad de Menke. Esta enfermedad cursa con severos síntomas neurológicos y alta mortalidad a edades tempranas. Por otro lado, mutaciones en el transportador ATP7B provocan un acúmulo excesivo de cobre hepático denominado enfermedad de Wilson. Esta enfermedad desarrolla hepatitis asociadas a altas concentraciones de cobre hepático y también puede dar lugar a síntomas nerviosos. Varias mutaciones en la proteína ATP7B pueden dar lugar a esta patología y no hay una clara asociación entre fenotipo y genotipo, por lo que es probable que haya otros factores involucrados como el ambiente u otros genes desconocidos (Wu, et al., 2016).

Otras razas caninas

La hepatitis asociada a cobre puede afectar a muchas otras razas. Análisis de pedigrís realizados en varias razas con diferentes formas de hepatitis asociada a cobre incluyendo el dóberman, *west highland white terrier* y dálmata, han confirmado la existencia de algún tipo de mecanismo hereditario no identificado. En estas razas la susceptibilidad a acumular cobre está determinada por el genotipo, mientras que en la expresión fenotípica de la enfermedad influyen factores ambientales, como la dieta (Kruitwagen, et al., 2019; Fieten, et al., 2014a).

La hepatitis crónica de los dóberman es una enfermedad de la que aún se sabe poco. La acumulación de cobre puede ser primaria o secundaria debida a colestasis prolongada (Hardy, 1990). En un estudio sobre una población de dóberman, algunos de los perros afectados

presentaron antígenos de expresión de moléculas tipo complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II, lo que sugiere que esta enfermedad en el dóberman podría ser de carácter autoinmune. La fuerte predisposición en hembras, muy presente en esta raza, es común en enfermedades autoinmunes tanto en humanos como en perros (Fieten, et al., 2012a). Actualmente se están haciendo estudios genómicos para comprender mejor los mecanismos de la hepatitis asociada a cobre en esta raza. También se han identificado casos de hepatitis asociada a cobre en otras razas en las cuales la causa subyacente no está muy clara, incluyendo el *skye terrier*, el Pastor Anatoliano, el *pembroke welsh corgi*, el *cardigan welsh corgi* y el *clumber spaniel* (Dirksen & Fieten, 2017).

En un estudio reciente, se recopilieron datos de 17 casos de perros diagnosticados de hepatitis asociada a cobre, entre los cuales había: 5 pastores alemanes, 4 *terriers* (2 *american staffordshire terrier*, 1 *jack russel terrier* y 1 *west highland white terrier*), 4 *spaniels* (2 *cavalier king charles spaniel* y 2 *cocker spaniel*), 2 *labrador retrievers*, 1 Dálmata y 1 perro mestizo (Rodrigues, et al., 2020). La edad media de presentación fue a los 8 años. Este estudio describió casos de hepatitis asociada a cobre por primera vez en dos nuevas razas: el *american staffordshire terrier* y el Beauceron (Rodrigues, et al., 2020). Se sugiere que existen muchas otras razas, e incluso cruces, afectadas por esta enfermedad.

Aunque en todas las razas citadas este fenómeno se desarrolla como una inflamación que finalmente evoluciona a cirrosis, existen diferencias fenotípicas en cuanto a la cantidad de cobre acumulada, predisposición según el sexo, y la severidad con que se desarrolla de una raza a otra (Fieten, et al., 2012a). Según Dirksen & Fieten (2017), es improbable que los factores ambientales, como la composición de la dieta, puedan explicar la acumulación de cobre y la hepatitis asociada en perros genéticamente sanos. Estos autores opinan también que la mayoría de las razas afectadas deben tener algún tipo de defecto hereditario aún desconocido implicado en su metabolismo del cobre. Para comprender mejor la etiología de esta enfermedad son necesarias investigaciones futuras.

5.1.4 Diagnóstico

5.1.4.1 Diagnóstico clínico y laboratorial

La cantidad de cobre hepático necesaria para desarrollar signos clínicos asociados depende de la predisposición genética y del consumo de cobre dietético, y puede variar entre razas e individuos (Dirksen & Fieten, 2017). La edad y el sexo parece tener relevancia en algunas razas específicas, como se ha mencionado anteriormente. Además, las hembras de *labrador retriever* en periodo de postparto parecen tener mayor riesgo a desarrollar signos clínicos ya que la

funcionalidad del hígado se puede deteriorar con el incremento de hormonas y/o estrés que se produce durante la gestación y lactación; no obstante, esta hipótesis todavía no ha sido demostrada (Fieten, et al., 2012a). En los *labrador retrievers*, los signos clínicos suelen aparecer hacia los 6 años de media (Rodrigues, et al., 2020).

La fase subclínica de esta enfermedad en los perros suele ser prolongada por dos razones. En primer lugar, la acumulación de cobre hepático precede el desarrollo de cambios histológicos en el hígado. En segundo lugar, los signos clínicos solo aparecen cuando gran parte del parénquima hepático está afectado. Debido a la gran capacidad regenerativa del hígado, esto suele ocurrir hacia el estadio final de la hepatopatía, cuando ya se ha establecido una hepatitis crónica o cirrosis (Dirksen & Fieten, 2017).

Signos clínicos

Los primeros signos en aparecer son inespecíficos, incluyendo anorexia, letargia, náuseas, vómitos y pérdida de peso. Cuando la enfermedad progresa, aparecen signos más específicos de insuficiencia hepática, como ascitis, encefalopatía hepática, poliuria/polidipsia e ictericia (Dirksen & Fieten, 2017; Dirksen, et al., 2017). En un estudio en el cual se recopilaron 17 casos clínicos de perros con hepatitis asociada a cobre, los signos que se observaron incluían signos gastrointestinales (13/17), anomalías en el hemograma (6/17), signos neurológicos (1/17), ictericia (2/17) y ascitis (1/17) (Rodrigues, et al., 2020). Aunque no es frecuente, en el *bedlington terrier* se ha descrito el desarrollo de una crisis hemolítica aguda debida a la liberación masiva de cobre al torrente circulatorio (Fieten, et al., 2014a). En perros no se han descrito alteraciones neurológicas más allá de cambios comportamentales en dóberman, labradores y *bedlington terriers*. Sin embargo, esto no ha sido contrastado por otros autores. Sería necesaria la realización de más estudios para poder concluir si la acumulación de cobre en el cerebro puede influenciar estos cambios en el comportamiento (Fieten, et al., 2012a).

Los primeros indicadores de daño hepatocelular son un aumento en la ALT y una leve disminución de la albúmina sérica. Ante un daño más severo, se produce un aumento y disminución más pronunciados de la ALT y albúmina respectivamente, y pueden aumentar la FA, ácidos biliares y amoníaco. Sin embargo, estas alteraciones no son específicas de la hepatitis asociada a cobre, sino que son comunes en varias hepatopatías (Fieten, et al., 2014a). En un estudio reciente de Rodrigues *et al.* (2020) en un grupo de perros diagnosticados de hepatitis asociada a cobre, se observó que todos los pacientes presentaban un incremento generalizado de la ALT y FA. Los aumentos en la GGT y AST eran menos habituales. Las proteínas totales aparecían disminuidas aproximadamente en la mitad del grupo de perros, y algunos de ellos también presentaban hipoalbuminemia. Por otro lado, Dirksen et al. (2017), entre los años 2003

y 2015, recopilaron valores de ALT, FA y AB de 242 *labrador retrievers* clínicamente sanos, para valorar la especificidad y sensibilidad de estos parámetros a la hora de detectar hepatitis subclínicas. Los resultados mostraron que la ALT presenta una alta sensibilidad (71%) para la detección de hepatitis crónicas, mientras que la FA y AB revelaron una baja sensibilidad, sugiriendo que no son apropiados para la detección temprana de hepatitis primaria. Ninguno de los marcadores presentó buena sensibilidad para la detección de hepatitis agudas. Estas observaciones sugieren que la actividad de las enzimas hepáticas, sobretodo la ALT, nos pueden dar información sobre el daño hepático, pero no se correlacionan con la acumulación de cobre, por lo cual son insuficientes para detectar hepatitis subclínicas asociadas a cobre (Dirksen, et al., 2017).

Otros indicadores laboratoriales incluyen un incremento en los ácidos biliares, amoníaco, bilirrubina, tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activado, y disminución del fibrinógeno y del volumen celular. En perros, la concentración de cobre sérico no está correlacionada con la concentración de cobre hepático (Johnson, 2013). En la enfermedad de Wilson en humanos, una disminución en la ceruloplasmina es diagnóstico. Sería de interés investigar las concentraciones de ceruloplasmina sérica en el *labrador retriever* con hepatitis asociada a cobre debida a una mutación en el gen *ATP7B*.

Se ha identificado el desarrollo de síndrome de Fanconi en un *clumber spaniel*, un *west highland white terrier* y 9 *labrador retrievers* con hepatitis asociada a cobre (Langlois, et al., 2013). En estos perros, el acúmulo de cobre en el epitelio de los túbulos renales proximales produce una disfunción tubular proximal, que cursa con baja densidad urinaria, proteinuria y glucosuria (Dirksen & Fieten, 2017; Fieten, et al., 2014a).

Aunque hay muchas similitudes entre fenotipos de hepatitis asociada a cobre entre razas, existen diferencias en la presentación clínica y en los niveles de cobre hepático. En el *bedlington terrier*, la excreción defectuosa de cobre en la bilis por una mutación en el exón 2 del gen *COMMD1* resulta en un acúmulo masivo de cobre en el hígado, obteniendo los valores más altos de todas las razas que padecen esta hepatopatía. Se han llegado a registrar valores de cobre hepático de hasta 2.000 µg/g de hígado en peso seco (hps) en perros de 1 año de vida, que es 5 veces el límite máximo de referencia de cobre hepático en perros (400 µg/g de hps). Sin embargo, no suelen presentar signos histológicos de hepatitis hasta los 3 años de media, cuando aparecen los signos clínicos inespecíficos. Si no se trata, los niveles de cobre hepático tienden a aumentar hasta 10.000 e incluso 15.000 µg/g de hps, en casos extremos. El resto de razas con mecanismos complejos de hepatitis asociada a cobre también tienden a presentar niveles elevados de cobre a edades tempranas, pero no suelen sobrepasar los 5.000 µg/g de hps. Sin embargo, se pueden observar lesiones inflamatorias a nivel histológico más severas a

niveles más bajos de cobre que en el *bedlington terrier* (Fieten, et al., 2012a; Fieten, et al., 2014a).

En los dóberman se han notificado formas muy severas de hepatitis y cirrosis, casi exclusivas de las hembras y con un pronóstico fatal si no se tratan. En esta raza se han descrito concentraciones elevadas de cobre hepático y predominancia de infiltrado monocelular en el hígado. Los signos clínicos observados en esta raza son los típicos de una insuficiencia hepática con poliuria, polidipsia, pérdida de peso, ascitis e ictericia. Se suele diagnosticar cuando la enfermedad ya está avanzada de forma que el tratamiento no suele alargar mucho la vida del animal. El diagnóstico precoz en los estadios asintomáticos probablemente sea el único método para mejorar el éxito terapéutico (Hardy, 1990; Johnson, 2013).

Las características clínicas de la hepatitis asociada a cobre en dálmatas incluyen como signos principales su desarrollo a una edad temprana, signos gastrointestinales como vómitos y diarrea, progresión rápida de los signos clínicos y grandes cantidades de cobre acumulado en el hígado (Nakaichi, et al., 2021). En las biopsias se pueden observar regiones con necrosis e inflamación en hepatocitos cargados de cobre y células de Kupffer. Además de los Estados Unidos, también se han notificado varios casos en los Países Bajos y Alemania, de forma que también se presenta en dálmatas europeos. Recientemente se describió el primer caso de hepatitis asociada a cobre en dálmatas de Japón (Nakaichi, et al., 2021).

5.1.4.2 Citología hepática y ecografía abdominal

La aspiración con aguja fina y citología de hepatocitos es un método no invasivo que puede servir para detectar la presencia de cobre en hepatocitos individuales. El cobre no se tiñe con la tinción rutinaria hematoxilina-eosina (HE), de modo que se tiene que emplear una tinción específica para poder detectar el cobre hepático, como por ejemplo el ácido rubeánico o la rodamina. Esta técnica tiene limitaciones como la imposibilidad de evaluar la distribución zonal del cobre en los lóbulos, el grado de daño hepatocelular y la determinación de la cantidad exacta de cobre total hepático. Es necesario realizar estudios complementarios ya que la distribución del cobre en el hígado es zonal, y podría obtenerse una muestra falsamente negativa por citología de un perro afectado por hepatitis asociada a cobre (Dirksen & Fieten, 2017).

El uso de la ecografía puede ser útil como prueba complementaria a la biopsia, pero por sí solo no es suficiente para obtener un diagnóstico definitivo. Con el método ecográfico se puede evaluar el tamaño, ecodensidad y estructura del hígado, y además es necesaria para la realización de la biopsia percutánea (Fieten, et al., 2014a). En un estudio de Rodrigues *et al.* (2020) en el que se analizaron 17 casos de perros con hepatitis asociada a cobre, se destacaron

como hallazgos ecográficos más importantes el aspecto abigarrado heterogéneo, hepatomegalia, nódulos hipoecoicos, microhepatía y linfadenomegalia hepática.

5.1.4.3 Biopsia hepática

Para el diagnóstico definitivo de la hepatitis asociada a cobre se requiere una biopsia hepática, a excepción del *bedlington terrier*, la única raza para la que hay disponibles pruebas genéticas (VetGen, Ann Arbor, MI) (Fieten, et al., 2014a; Lidbury & Steiner, 2013). Estas pruebas se basan en la presencia de un marcador de ADN (CO4107, alelo 2) localizado cerca del *COMMD1* y puede identificar perros normales, portadores o afectados con un 90% de precisión (vetGen, 2021). Sin embargo, estos resultados deben ir respaldados por un análisis del pedigrí, ya que pueden haber discrepancias entre la prueba de ADN y los resultados histológicos en algunos casos donde la etiopatogenia de la hepatitis asociada a cobre no vaya asociada al gen *COMMD1* (Johnson, 2013). La biopsia también es esencial para establecer un pronóstico y un plan de tratamiento para el paciente. El diagnóstico temprano es preferible para enlentecer, si no prevenir, la progresión de la enfermedad hasta el estadio final, que cursa con cirrosis (Rodrigues, et al., 2020).

Métodos cualitativos: histopatología

La evaluación histopatológica de una biopsia de hígado es actualmente la prueba estándar para diagnosticar una hepatitis asociada a cobre (Dirksen & Fieten, 2017). Las muestras se pueden obtener mediante laparotomía, laparoscopia o vía percutánea con una aguja ecoguiada.

Los hepatocitos con exceso de cobre primero sufren apoptosis y luego son fagocitados por células inflamatorias, de modo que el cobre se acumula en las células fagocíticas de Kupffer (Dirksen & Fieten, 2017; Fieten, et al., 2012a). La histopatología se caracteriza por una inflamación progresiva, necrosis y áreas de fibrosis entre zonas centrilobulares afectadas, que terminan progresando a cirrosis irreversible.

La hepatitis asociada a cobre puede mostrar una distribución periportal (zona 1), centrilobular (zona 3) o multifocal según el patrón de tinción con rodamina del cobre hepático. En las formas primarias, el cobre se distribuye alrededor de las venas centrales en el lóbulo hepático, mientras que en la acumulación de cobre por colestasis se localiza en las zonas periportales de los hepatocitos (Fieten, et al., 2012a). En un estudio en el que se obtuvieron 17 biopsias de diferentes perros afectados por hepatitis asociada a cobre se observaron 8 perros con patrón centrilobular, indicando una mayoría de hepatitis primaria. Este patrón es un hallazgo recurrente en razas en que la causa hereditaria ha sido confirmada. Por otro lado, se observó patrón periportal en 3 perros (Rodrigues, et al., 2020). Esto podría explicarse por la presencia de inflamación periportal, que obstaculiza el flujo biliar produciendo colestasis e

impide la excreción de cobre. De forma que la acumulación de cobre en estos perros probablemente sea secundaria a una obstrucción del flujo biliar. Finalmente, se observaron 6 perros con patrón multifocal, que según este estudio se atribuye a una mala calidad muestral y a una tinción de estructuras disminuida debida a fibrosis del tejido. Se puede concluir que el cobre se puede distribuir preferentemente en la zona 1 o 3, dependiendo de la causa subyacente y ocasionalmente resultar multifocal debido a una mala calidad en la muestra de biopsia o a un estado avanzado de la enfermedad.

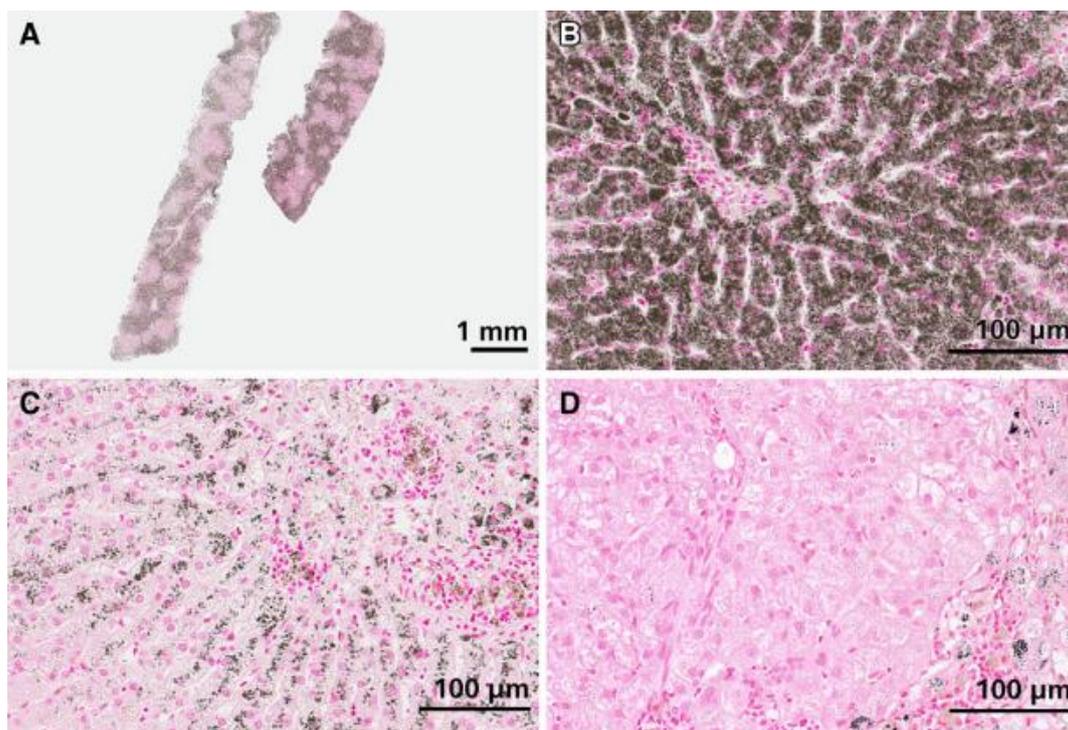


Figura 8. Muestras de biopsia hepática teñidas hematoxilina y ácido rubeánico (el cobre se ve de color negro) de diferentes perros (Fieten, et al., 2012a). **A)** *Bedlington terrier* con distribución del cobre hepático centrilobular. **B)** *Bedlington terrier* de 3 años con gran cantidad de gránulos de cobre acumulados en hepatocitos. Se observa la vena central en el centro de la imagen. **C)** *Labrador retriever* hembra de 5 años con presencia de gránulos de cobre en hepatocitos y macrófagos en la zona centrilobular. **D)** Dóberman hembra de 6 años con presencia de macrófagos con gránulos de cobre en la zona centrilobular (abajo a la derecha).

En hígados con enfermedad terminal puede resultar difícil diferenciar zonas del lóbulo hepático debido a la severa cirrosis, necrosis extensa y colapso lobular existente. Además, en estados avanzados de la enfermedad, los hepatocitos necróticos han liberado su carga de cobre, y los hepatocitos recién formados en el proceso de regeneración no contienen cobre en una primera instancia. Tampoco contiene cobre el tejido fibroso, diluyendo aún más el total de contenido de cobre en la transición hacia los estadios finales de la enfermedad. Por esto, siempre se deben tener en cuenta tanto los resultados del examen histológico como las determinaciones cuantitativas de cobre (Dirksen & Fieten, 2017; Fieten, et al., 2012a).

En la búsqueda de una alternativa no invasiva para determinar las concentraciones de cobre, se evaluó la excreción de cobre y zinc en orina en relación con el cobre hepático en *beagles* normales, cruces de *beagle* con *bedlington terrier* con valores altos de cobre hepático, y *labrador retrievers* con valores de cobre normal y elevado. El ratio cobre/zinc de la orina correlacionó significativamente en una de las muestras de *labrador retrievers* con las concentraciones de cobre hepático, pero su valor diagnóstico resultó ser limitado ya que en el resto se solapaban los resultados entre perros sanos y afectados. Sin embargo, los autores del estudio concluyeron que este método tiene potencial como parámetro de seguimiento en hepatitis asociadas a cobre en *labrador retrievers* (Fieten, et al., 2013a).

Métodos cuantitativos: determinación de cobre hepático

La cantidad de cobre hepático se puede determinar mediante la irradiación de pequeñas piezas de hígado y la medida de la radioactividad inducida por el cobre en estas. Para ello, se requiere una biopsia distinta a la usada para la histología de al menos 5 mg, que se liofiliza antes del análisis para determinar la cantidad de cobre en el hígado en peso seco (Dirksen & Fieten, 2017). También se puede cuantificar mediante métodos de espectrometría, como espectroscopía de absorción atómica (AA) o espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) (Meucci, et al., 2020). Las concentraciones hepáticas normales en perros se consideran por debajo de 400 mg/kg de hps. En perros con hepatitis asociada a cobre, las concentraciones suelen estar por encima de 800 mg/kg hps y pueden alcanzar valores de 10.000 mg/kg hps (Dirksen & Fieten, 2017). Las lesiones inflamatorias suelen aparecer a valores de cobre hepático por encima de 2.000 mg/kg hps, aunque se pueden dar casos de algunos perros con concentraciones de cobre mayores y una histología normal (Thornburg, 2000).

Las muestras también se pueden calificar mediante un método semicuantitativo, que consiste en atribuir un número del 0 al 5 según la cantidad de cobre teñido que se observe en los hepatocitos y macrófagos. Este método no es muy preciso ya que cada calificación incluye un rango muy amplio de concentraciones de cobre (Dirksen & Fieten, 2017; Meucci, et al., 2020).

Ante la necesidad de encontrar nuevos métodos para determinar las concentraciones de cobre hepático en perros, un estudio reciente trató de aplicar y validar un protocolo simple para la medición de concentraciones de cobre y plomo en una biopsia hepática mediante una digestión simple de las muestras seguida de un análisis electroquímico de *stripping* (voltamperometría de redisolución anódica). Los resultados de dicho estudio concluyeron que este método puede ser de gran utilidad para el diagnóstico y cuantificación de cobre hepático debido a la simplicidad y bajo coste del procedimiento. Además, ha demostrado ser un método de alta sensibilidad y de rápida ejecución (unas 2h para completarlo) (Meucci, et al., 2020).

5.1.5 Tratamiento

El objetivo del tratamiento de la hepatitis canina asociada a cobre es crear un balance de cobre negativo. Esto puede llevarse a cabo restringiendo el consumo de cobre e incrementando la excreción urinaria de cobre usando quelantes de cobre. Es importante empezar el tratamiento tan pronto como sea posible, idealmente en la fase subclínica, ya que se obtienen los mejores resultados cuando el daño hepatocelular es limitado (Dirksen & Fieten, 2017).

Actualmente se desconoce la concentración de cobre exacta a la que empieza el daño hepatocelular y cuando se debería iniciar la terapia con quelantes. En perros, se considera patológico un nivel de cobre hepático mayor a 400 mg/kg de hps. En general, los perros clínicamente enfermos o aquellos con daño hepatocelular evidente y niveles de cobre hepático aumentados deberían ser tratados con quelantes de cobre y dicho tratamiento debería ser monitorizado mediante biopsias hepáticas durante el seguimiento (Dirksen & Fieten, 2017).

En perros sin signos clínicos, con enzimas hepáticas normales y con un aumento moderado de la concentración de cobre hepático, cambiar a una dieta baja en cobre y alta en zinc podría ser suficiente para normalizar los valores de cobre hepático. Sin embargo, existe una variación individual en respuesta a la dieta y puede que no se detenga el aumento de cobre hepático. Como actualmente no es posible predecir la respuesta individual de cada perro, una segunda biopsia es siempre necesaria a los 6 meses tras el diagnóstico inicial y el cambio dietético (Dirksen & Fieten, 2017).

D-penicilamina (DPA)

La DPA es el agente quelante de cobre más usado en perros con hepatitis asociada a cobre (Fieten, et al., 2014a). Se trata de un producto de la degradación de la penicilina altamente soluble que se excreta vía renal. Liga 1 átomo de cobre a su grupo sulfhidrilo y facilita la excreción de cobre en la orina (Dirksen & Fieten, 2017; Hardy, 1990). La D-penicilamina es uno de los quelantes de cobre más potentes y también es capaz de formar complejos con otros metales como el zinc o el hierro. La dosis recomendada para uso en perros es de 10-15 mg/kg/12h vía oral. Para aumentar su biodisponibilidad y maximizar su concentración en plasma, se debe dar en ayunas. Los efectos adversos que aparecen normalmente se limitan a cuadros gastrointestinales, como la anorexia o vómitos. Suelen desaparecer bajando temporalmente la dosis de DPA o se pueden evitar administrando antieméticos una hora antes de la dosis de DPA (Dirksen & Fieten, 2017).

En humanos, este fármaco puede producir severos efectos inmunológicos, pero no se han descrito casos frecuentes en perros. Se conocen dos casos en los cuales se desarrollaron efectos secundarios inmunológicos en perros supuestamente relacionados con la

administración de DPA. Una hembra de 4 años de *springer spaniel* desarrolló una nefroglomerulopatía con severa pérdida proteica, que resultó en una hipoalbuminemia y ascitis unos 4 meses tras iniciar un tratamiento con DPA. La proteinuria e hipoalbuminemia se resolvieron a las 2 semanas después de interrumpir el tratamiento. Por otro lado, un *west highland white terrier* presentó severas lesiones dermatológicas al poco tiempo de iniciar un tratamiento con DPA, que desaparecieron rápida y completamente después de detener el tratamiento. Aunque en ambos casos resulta difícil probar la relación entre el tratamiento y los efectos secundarios, existe una sospecha de efectos secundarios inmunológicos relacionados con la administración de DPA (Dirksen & Fieten, 2017).

Una terapia prolongada con DPA puede provocar una deficiencia de cobre y zinc debida a la excreción urinaria de estos metales. A pesar de que se diera un caso de deficiencia de cobre inducida por el tratamiento con DPA en un *bedlington terrier*, los perros afectados de esta raza suelen necesitar terapia quelante a lo largo de toda su vida (Seguin & Bunch, 2001). En muchos de ellos, no se consiguen normalizar los valores de cobre hepático con el tratamiento, pero se evita la progresión de la enfermedad. En otras razas, no se recomienda tratar con DPA a lo largo de toda su vida. Un tratamiento intermitente con biopsias de seguimiento cada 1 o 2 años previene la acumulación de cobre, así como las deficiencias de zinc y cobre (Dirksen & Fieten, 2017; Fieten, et al., 2014a).

Un estudio reciente definió la tendencia con la que se excreta el cobre hepático en *labrador retrievers* cuando son tratados con DPA. Se observó que la disminución de cobre sigue una tendencia no lineal y que el tiempo necesario de tratamiento depende de las concentraciones iniciales de cobre hepático. Se demostró que los *labrador retrievers* con concentraciones iniciales de cobre hepático >1500 mg/kg de hps necesitan un tratamiento mínimo de 10 meses para llegar a las concentraciones normales de cobre.

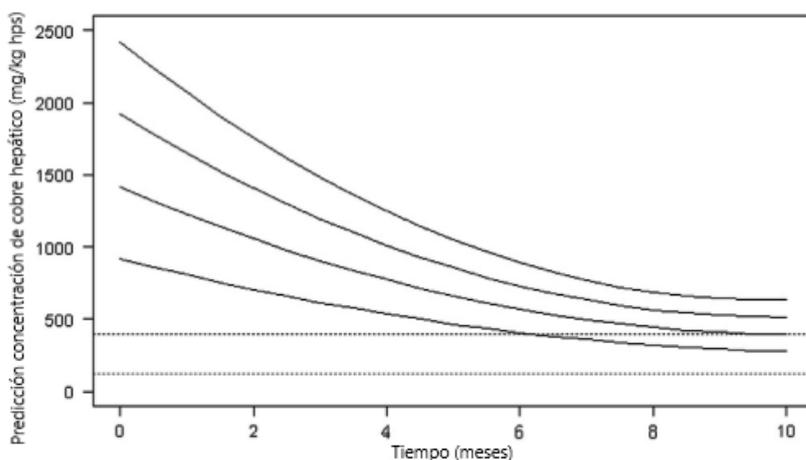


Figura 9. Predicción de la disminución de cobre hepático en Labradores tratados con DPA. Las líneas continuas indican las predicciones en diferentes *labrador retrievers* según el valor de cobre hepático inicial. Las discontinuas horizontales indican los valores máximos y mínimos de concentraciones normales de cobre hepático (Fieten, et al., 2013b).

Este modelo se puede usar como guía para calcular la duración necesaria de tratamiento con DPA según los niveles de cobre hepático, para monitorizar la efectividad del tratamiento y para evitar los efectos de un sobretreatmento. Es probable que también pueda ser usado en otras razas con formas complejas de hepatitis asociada a cobre y con concentraciones de cobre hepático en intervalos similares. El tratamiento debería continuarse hasta llegar a concentraciones de cobre hepático normales (Fieten, et al., 2013b).

Trientina (2,2,2-tetramina)

Este quelante inicialmente se introdujo como sustituto del tratamiento con DPA en humanos que habían padecido efectos secundarios. Igual que la DPA, la trientina es un promotor de la excreción urinaria de cobre, aunque parece ser que también produce efecto quelante en cobre de otras regiones del cuerpo. En humanos, se identificaron menos efectos secundarios que con la DPA, mientras que en perros no se ha notificado ningún caso de efectos adversos, aunque los estudios en perros son escasos. La dosis recomendada en perros es de 15 mg/kg/12h (Dirksen & Fieten, 2017).

2,3,2-Tetramina

Se trata de otro quelante de cobre que ha sido descrito como mejor excretor urinario de cobre que la trientina. Parece ser que se realizó un estudio con este agente quelante en 5 *bedlington terriers* con hepatitis asociada a cobre. Después de 200 días de tratamiento, las concentraciones de cobre habían disminuido un 55%, sin desarrollo de efectos secundarios. No obstante, actualmente no existen más datos sobre este fármaco y no se comercializa (Dirksen & Fieten, 2017).

Tetratiomolibdato de amonio (TTM)

Es un agente quelante de cobre que forma un triple complejo con cobre y proteínas del intestino, plasma, e hígado. Estos complejos se excretan a la bilis y sangre, disminuyendo los niveles de cobre hepático. Ha demostrado ser efectivo para el tratamiento de la enfermedad de Wilson en humanos, intoxicación por cobre en ovejas y acumulación de cobre en roedores. Aunque actualmente este fármaco no se usa para el tratamiento de la hepatitis canina asociada a cobre, un estudio reciente evaluó el efecto de la administración de TTM durante 6 semanas en un grupo de 10 perros de razas distintas con esta enfermedad. Los resultados revelaron un descenso del cobre hepático en 8 de los 10 perros estudiados, indicando una efectividad bastante elevada. Se observaron signos gastrointestinales leves en casi todos los perros como efecto adverso de la terapia. Aunque aún está poco estudiado, parece tener potencial como tratamiento alternativo a la DPA en el futuro (Langlois, et al., 2019).

Sales de zinc

La administración oral de sales de zinc (acetato de zinc, gluconato de zinc, y sulfato de zinc), a diferencia de los quelantes de cobre, no promueve la excreción de cobre por orina, sino que bloquea su absorción en el intestino. Por esta razón suele usarse para la prevención en pacientes presintomáticos o como terapia de mantenimiento (Fieten, et al., 2012b). El zinc induce la unión de la metalotioneína con el cobre cuando es absorbido por los enterocitos, formando un complejo que permanece en el citosol del enterocito y no pasa a la circulación portal, es almacenado y finalmente eliminado por las heces. Además de evitar la absorción del cobre dietético, las sales de zinc impiden la reabsorción del cobre endógeno secretado (Brewer, 1998).

El acetato, gluconato y sulfato de zinc han sido todos probados en perros como tratamiento de intoxicación por cobre. Parece que las sales de acetato y gluconato se toleran mejor que las de sulfato, pero existen diferencias en las respuestas individuales. Las concentraciones normales de zinc en plasma varían entre 90 y 120 µg/dL. Para suprimir la absorción intestinal de cobre, se requiere una concentración mínima de zinc en plasma de 200 a 300 µg/dL. La dosis recomendada para conseguir esa concentración es de 5-10 mg/kg/12h de zinc elemental o bien 200 mg/día en dosis divididas. Para una mayor efectividad, conviene su administración en ayunas. Unas concentraciones plasmáticas por encima de 1000 µg/dL de zinc podrían resultar en hemólisis, por lo que deben ser monitorizadas durante el tratamiento. Esta terapia no se recomienda como tratamiento único en perros con clínica evidente, ya que los resultados terapéuticos empiezan a verse tras unos 3 meses después de empezar la administración de zinc (Dirksen & Fieten, 2017).

Manejo dietético

El consumo de cobre dietético tiene un impacto significativo en la acumulación de cobre hepático, por lo que una dieta baja en cobre y alta en zinc puede ser de utilidad en el manejo de perros con hepatitis asociada a cobre, sobre todo aquellos con un mecanismo complejo de presentación como el *labrador retriever*. Una dieta con estas características puede ser beneficiosa para prevenir la progresión de la enfermedad o posponer la reacumulación de cobre en perros que han sido tratados previamente con quelantes. El manejo dietético también puede ser útil en perros subclínicos con un acúmulo moderado de cobre hepático. Se realizó un estudio para evaluar los efectos a largo plazo de una dieta baja en cobre y alta en zinc en un grupo de *labrador retrievers* diagnosticados de hepatitis asociada a cobre. Para ello, primero se les administró DPA hasta que sus concentraciones de cobre hepático se normalizaron y luego empezaron con la dieta para mantener esos niveles. Las concentraciones de cobre hepático se mantuvieron en valores normales aproximadamente en la mitad de los perros solamente con la

dieta, lo que sugiere que el manejo dietético puede ser una alternativa al tratamiento con DPA en aquellos perros de esta raza que necesiten tratamiento toda su vida. Aun así, algunos individuos continuaron acumulando cobre durante la terapia dietética (Fieten, et al., 2014b). Esa variabilidad en la respuesta a la dieta entre individuos puede venir influenciada por factores hereditarios (Kruitwagen, et al., 2019). Aunque una dieta baja en cobre puede ayudar a evitar la progresión de la hepatitis asociada a cobre en labradores, no se ha observado el mismo efecto en los *bedlington terrier* (Fieten, et al., 2012a). Debido a la variabilidad de la respuesta a este tratamiento dietético, se deberían evaluar regularmente las concentraciones de cobre hepático y repetir una biopsia con tinción para cobre y cuantificación de este (Dirksen & Fieten, 2017).

Hacer pruebas para evaluar el efecto de la dieta en las concentraciones de cobre hepático en pacientes caninos puede ser de gran utilidad, ya que permite realizar biopsias durante años y observar la variación en cada individuo. Además, la comida de perro se puede estandarizar fácilmente y también resulta sencillo controlar el consumo de pienso del paciente, lo que facilita realizar un seguimiento y analizar cómo afecta cada parámetro al acúmulo de cobre hepático. Esto no era posible en los modelos con roedores debido a su corta vida y al pequeño tamaño de su hígado, que no permitía tomar más de una muestra para su seguimiento. Esta investigación en perros podría servir como modelo para describir componentes dietéticos potencialmente beneficiosos para pacientes humanos con la enfermedad de Wilson (Wu, et al., 2016).

Trasplante de hígado

En humanos, el trasplante de hígado es una opción terapéutica indicada para pacientes en los que la terapia quelante no es efectiva o para pacientes con fallo hepático fulminante. Las complicaciones de este procedimiento son la disponibilidad limitada de trasplantes de hígado aptos, la invasividad severa de la operación y el riesgo de rechazo del injerto. Una alternativa para el trasplante del órgano completo es la terapia basada en células, incluyendo el trasplante de hepatocitos maduros o células madre adultas. El trasplante de hepatocitos primarios se ve obstaculizado por la falta de suministro suficiente de células viables, debido a su rápida pérdida de viabilidad y desdiferenciación en cultivos celulares. Para investigar y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas basadas en el trasplante de células madre, se requieren modelos animales que padezcan una enfermedad parecida para probar la eficacia y seguridad de estos tratamientos (Wu, et al., 2016).

La causa genética del acúmulo de cobre hepático en el *bedlington terrier* está bien descrita y aunque no es la misma que causa la enfermedad de Wilson, existe una interacción entre ambas (proteínas COMMD1 y ATP7B) que pueden explicar las similitudes entre estas dos enfermedades. En un estudio reciente se demostró que era posible corregir la acumulación de

cobre hepático en perros con deficiencia de proteína COMMD1 mediante el trasplante de hepatocitos autólogos modificados genéticamente para corregir el gen *COMMD1* usando transducción lentiviral (Kruitwagen, et al., 2019). Este estudio tiene limitaciones como por ejemplo que en el estudio se tiene control de todos los parámetros que pueden influir en los resultados mientras que en la realidad no siempre es así, o la duda sobre si el mejor modelo es el *bedlington terrier* o el *labrador retriever*, pero supone un potencial modelo para extrapolar estas estrategias a los pacientes con enfermedad de Wilson.

6. CONCLUSIONES

Debido a su participación en gran cantidad de procesos orgánicos, el hígado es muy susceptible a sufrir daños de muchas maneras distintas, especialmente por parte de sustancias y compuestos que se detoxifican y excretan a través suyo. Aunque se han descrito gran cantidad de sustancias hepatotóxicas en los perros, en muchos casos la información sobre los efectos que producen en el hígado y sus mecanismos de acción es escasa, ya sea por falta de casos clínicos notificados o por la acción mecanismos idiosincráticos desconocidos.

La hepatitis asociada a cobre es una enfermedad que puede presentarse en humanos y en perros de una forma muy parecida. Aunque la etiología en humanos ha sido muy estudiada, en los perros todavía hay un gran desconocimiento sobre los factores que están involucrados en su presentación. Sin embargo, parece que cada vez se notifican más casos y que el abanico de razas afectadas se expande, empezando a afectar también a cruces de perros.

El descubrimiento del gen *COMMD1* en el *bedlington terrier* fue un gran paso para el diagnóstico de perros afectados o portadores de la mutación mediante pruebas de ADN y logró reducir la incidencia de cachorros afectados. No obstante, aún hay muchas incógnitas por resolver. Hay una minoría de *bedlington terriers* afectados por la enfermedad que no presentan la mutación del gen *COMMD1*. Es probable que el complejo metabolismo de la regulación del cobre aún no se conozca al completo y parece posible que existan genes no identificados que contribuyen en este. Sería de interés hacer más estudios de asociación del genoma completo en diferentes razas de perro con alta prevalencia de hepatitis asociada a cobre. El hecho de ser poblaciones muy homogéneas supondría una ventaja para descifrar la genética de enfermedades con etiologías complejas.

Otro desafío que presenta la hepatitis asociada a cobre en perros es la falta de opciones diagnósticas. Actualmente la única manera de diagnosticar esta patología es mediante evaluaciones histológicas y cuantificaciones de cobre hepático a partir de muestras de biopsia hepática. La biopsia es un método muy invasivo que requiere de la anestesia general del

paciente, lo cual supone un riesgo, sobre todo para aquellos pacientes que padecen otras afecciones o pacientes geriátricos. Además, estas evaluaciones deben repetirse en el tiempo para poder valorar la efectividad del tratamiento, lo que aumenta el riesgo y el coste económico del procedimiento. Esto complica el seguimiento y dificulta la toma de decisiones sobre el enfoque del plan terapéutico, como por ejemplo si debe iniciarse un tratamiento agresivo con quelantes de cobre, o si probar con una dieta baja en cobre. Es por esto que más estudios deben dirigirse hacia la búsqueda de biomarcadores no invasivos para evaluar el cobre hepático de forma rápida y continuada. Además, la duración del tratamiento viene determinada por los niveles de cobre hepático, y un sobretratamiento podría ser perjudicial para el paciente y resultar en un déficit de cobre a largo plazo. Esto podría ayudar a identificar a perros con riesgo de padecer hepatitis asociada a cobre antes de la aparición de signos clínicos y a instaurar un tratamiento temprano para evitar o limitar la progresión de la enfermedad.

La falta de información acerca de opciones terapéuticas también supone una limitación para el tratamiento de la hepatitis asociada a cobre. Actualmente el tratamiento de elección para esta enfermedad es la DPA. Sin embargo, este quelante de cobre es muy potente y puede producir efectos adversos si se administra en exceso. Solo se recomienda la administración a *bedlington terriers*, ya que suelen necesitar tratamiento toda su vida y expresan valores de cobre hepático muy elevados. Sería de interés encontrar un tratamiento más seguro que la DPA.

CONCLUSIONS

Due to its participation in a large number of organic functions, the liver is very susceptible to damage in many different ways, especially by substances and compounds that are detoxified and excreted through it. Although many hepatotoxic agents have been described in dogs, in many cases the information recollected on their effects and mechanisms of liver damage is scarce, either due to the lack of clinical case reports or unknown idiosyncratic mechanisms.

Copper-associated hepatitis is a disease that affect both humans and dogs in a similar way. Even though the etiology in humans has been thoroughly studied, there is still a great lack of knowledge about the factors involved in its presentation in dogs. However, increasing number of cases are being reported involving a wide range of affected breeds, including crossbreeds.

The discovery of the deletion in exon 2 of *COMMD1* gene causing copper toxicosis in Bedlington terriers was a great step towards the diagnosis of affected or carriers dogs, and the use of DNA tests managed to reduce the incidence of affected puppies. However, there are still many unknown facts about this disorder. There is a minority of Bedlington terriers affected by this disease that lacks the *COMMD1* mutation. It seems likely that coppers complex regulation

is not fully understood yet, and it seems possible that there are still unidentified genes that take part in its development. Pure breed dog populations show a very homogeneous genome, which would be advantageous in deciphering the genetics of complex diseases. It would be of interest to perform more genome-wide association studies in different dog breeds with high prevalence of copper-associated hepatitis.

Another challenge faced by copper-associated hepatitis in dogs is the shortage of diagnostic options. Currently, histological examinations and copper determinations performed on liver biopsy samples are the only way to diagnose this disease. Biopsy is a very invasive method that requires general anaesthesia of the patient, which poses a risk, especially for those patients suffering from other affections or elderly dogs. In addition, this procedure must be repeated over time in order to assess the effectiveness of the treatment, which increases the risks as well as the economic cost of the procedure. Therefore, follow-up becomes harder and so it does the decision making regarding the treatment plan, such as whether to start an aggressive copper chelator treatment or start a low-copper diet. This is why more studies should be focused on the search of non-invasive biomarkers to easily evaluate hepatic copper concentrations. Furthermore, treatment durations are determined by hepatic copper levels, and an overtreatment could be detrimental to the patient, resulting in long-term copper deficiency. Non-invasive biomarkers could help identify dogs at risk of developing copper-associated hepatitis before the instauration of clinical signs and initiate an early treatment to prevent or limit disease progression.

The lack of information about therapeutic options is also a limitation for the copper-associated hepatitis treatment. The current treatment of choice is D-penicillamine (DPA). However, this copper chelator has a strong effect that can result in adverse effects if given in excess. Life-long treatment with DPA is only recommended in Bedlington terriers due to chronic elevated hepatic copper concentrations. It would be of interest to find a safer yet efficient alternative to DPA.

7. VALORACIÓN PERSONAL

Este trabajo me ha servido para mejorar mis habilidades en relación con la búsqueda de información contrastada y veraz, así como a mejorar mi comprensión lectora a la hora de leer artículos científicos complejos. También me ha ayudado a mejorar mi capacidad de síntesis y a saber identificar las partes relevantes de textos muy extensos. Considero que estos aprendizajes me pueden ayudar mucho en la salida al mundo laboral a la hora de poder contrastar informaciones y forjar un criterio propio.

La realización de este trabajo también me ha servido para poner a prueba mis conocimientos sobre el hígado y su funcionalidad, así como para expandirlos y comprender este órgano tan importante con mayor profundidad. Además, he aprendido sobre la importancia del cobre como metal esencial y como agente tóxico, que desconocía en profundidad hasta la realización de este trabajo y que me parece importante conocer ante el aumento de casos de hepatitis asociada a tóxicos que se observa actualmente.

Finalmente, agradecerle a mi tutora Natalia Guillén su paciencia y dedicación.

8. BIBLIOGRAFÍA

- American Kennel Club (2021). Bedlington Terrier. Disponible en: <https://www.akc.org/dog-breeds/bedlington-terrier/> [Consultado 05-09-2021]
- Arnold, A., Davis, A., Wismer, T., Lee, J. A. (2021). "Suspected hepatotoxicity secondary to trazodone therapy in a dog". *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 31(1), pp. 112-116. DOI: 10.1111/vec.13028
- Bischoff, K., Mukai, M. & Ramaiah, S. K. (2018). "Liver Toxicity". *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles: Third edition*, pp. 239-257. DOI: 10.1016/B978-0-12-811410-0.00015-5
- Bravo-Gómez, M. E., Espinoza-Guillén, A., Castillo Blum, S., Barba Behrens, N. (2015). "Metalochaperonas: escoltas personales en el tráfico intracelular de iones metálicos". *Educación Química*, 26(1), pp. 26-37. DOI: 10.1016/s0187-893x(15)72095-1
- Brewer, G. J. (1998). "Wilson disease and canine copper toxicosis". *American Journal of Clinical Nutrition*, 67(5), pp. 1087-1090. DOI: 10.1093/ajcn/67.5.1087S
- Briozzo, G., Perego, M. d. C., González, M. M. (2005). "Valores de referencia de los ácidos biliares séricos en embarazadas del tercer trimestre". *Revista del Hospital Materno Infantil Ramón Sardá*, 24(1), pp. 7-11. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91201103> [Consultado 31-08-2021]
- Dillon, R. (1990). "El hígado en la enfermedad sistémica: un espectador inocente". *Clinicas Veterinarias de Norteamérica*, pp. 121-148.
- Dirksen, K., Burgener, I. A., Rothuizen, J., van den Ingh, T. S. G. A. M., Penning, L. C., Spee, B., Fieten, H. (2017). "Sensitivity and Specificity of Plasma ALT, ALP, and Bile Acids for Hepatitis in Labrador Retrievers". *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(4), pp. 1017-1027. DOI: 10.1111/jvim.14716
- Dirksen, K., Fieten, H. (2017). "Canine Copper-Associated Hepatitis". *Veterinary Clinics of North America - Small Animals*, 47(3), pp. 631-644. DOI: 10.1016/j.cvsm.2016.11.011
- Fieten, H., Biourge, V. C., Watson A. L., Leegwater, P. A. J., van den Ingh, T. S. G. A. M., Rothuizen, J. (2014b). "Nutritional management of inherited copper-associated hepatitis in the Labrador retriever". *The Veterinary Journal*, 199(3), pp. 429-433. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.12.017
- Fieten, H., Dirksen, K., van den Ingh, T. S. G. A. M., Winter, E. A., Watson, A. L., Leegwater, P. A. J., Rothuizen, J. (2013b). "D-penicillamine treatment of copper-associated hepatitis in Labrador retrievers". *The Veterinary Journal*, 196(3), pp. 522-527. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.12.013

- Fieten, H., Gill, Y., Martin, A. J., Concilli, M., Dirksen, K., van Steenbeek, F. G., Spee, B., van den Ingh, T. S. G. A. M., Martens, E. C. C. P., Festa P., Chesi, G., van de Sluis, B., Houwen, R. H. J. H., Watson, A. L., Aulchenko, Y. S., Hodgkinson, V. L., Zhu, S., Petris, M. J., Polishchuk, R. S., Leegwater, P. A. J., Rothuizen, J. (2016). "The Menkes and Wilson disease genes counteract in copper toxicosis in Labrador retrievers: A new canine model for copper-metabolism disorders". *DMM Disease Models and Mechanisms*, 9(1), pp. 25-38. DOI: 10.1242/dmm.020263
- Fieten, H., Hooijer-Nouwens, B. D., Biourge, V. C., Leegwater, P. A. J., Watson, A. L., van den Ingh, T. S. G. A. M., Rothuizen, J. (2012b). "Association of Dietary Copper and Zinc Levels with Hepatic Copper and Zinc Concentration in Labrador Retrievers". *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(6), pp. 1274-1280. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2012.01001.x
- Fieten, H., Hugen, S., van den Ingh, T. S. G. A. M., Hendriks, W. H., Vernooij, J. C. M., Bode, P., Watson, A. L., Leegwater, P. A. J., Rothuizen, J. (2013a). "Urinary excretion of copper, zinc and iron with and without D-penicillamine administration in relation to hepatic copper concentration in dogs". *The Veterinary Journal*, 197(2), pp. 468-473. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.03.003
- Fieten, H., Leegwater, P. A. J., Watson, A. L., Rothuizen, J. (2012a). "Canine models of copper toxicosis for understanding mammalian copper metabolism". *Mammalian Genome*, 23(1-2), pp. 62-75. DOI: 10.1007/s00335-011-9378-7
- Fieten, H., Penning, L. C., Leegwater, P. A., Rothuizen, J. (2014a). "New canine models of copper toxicosis: Diagnosis, treatment, and genetics". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1314(1), pp. 42-48. DOI: 10.1111/nyas.12442
- Fuentealba, C., Aburto, E. M. (2003). "Animal models of alcoholic liver disease". *Comparative Hepatology*, 28(6), pp. 729-736. DOI: 10.1159/000324280
- Giannini, E. G., Testa, R., Savarino, V. (2005). "Liver enzyme alteration: a guide for clinicians". *Cmaj*, 172(3), pp. 367-379. DOI: 10.1503/cmaj.1040752
- González, M. S., Peña, G. A. (2021). "Interpretación de las pruebas de funcionamiento hepático y el panel viral". En: Cisneros, L. E., Flores, N. C., Pérez-Hermández, J. L. (Coord.). *Primera Hepatotriología 2021*. Ciudad de México: Editorial Arquitónica, pp. 19-29.
- Hardy, R. M., (1990). "Hepatitis crónica: un síndrome emergente en los perros". En: *Clinicas Veterinarias de Norteamérica*, pp. 169-188.
- Haywood, S., Boursnell, M., Loughran, M. J., Trafford, J., Isherwood, D., Liu, X., Olohan, L., Carter, S. D. (2016). "Copper toxicosis in non-COMMD1 Bedlington terriers is associated with metal transport gene ABCA12". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 35, pp. 83-89. DOI: 10.1016/j.jtemb.2016.01.015
- Hoffmann, G., Heuven, H. C. M., Leegwater, P. A. J., Jones, P. G., van den Ingh, T. S. G. A. M., Bode, P., Rothuizen, J. (2008). "Heritabilities of copper-accumulating traits in Labrador retrievers". *Animal Genetics*, 39(4), pp. 454. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2008.01722.x
- Holahan, M. L., Littman, M. P., Hayes, C. L. (2010). "Presumptive hepatotoxicity and rhabdomyolysis secondary to phenazopyridine toxicity in a dog". *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(3), pp. 352-358. DOI: 10.1111/j.1476-4431.2010.00541.x
- Johnson, S. E. (2013). "CHAPTER 61: Liver". En: R. J. Washabau, M. J. Day. (Coord.). *Canine and Feline Gastroenterology*. Saunders, pp. 849-957. DOI: 10.1016/B978-1-4160-3661-6.00061-4

- Kolb, E. (1987). "XIII. Fisiología del hígado". En: **Fisiología Veterinaria**. Acribia, pp. 674-691.
- Kruitwagen, H. S., Fieten, H., Penning, L. C. (2019). "Towards Bioengineered Liver Stem Cell Transplantation Studies in a Preclinical Dog Model for Inherited Copper Toxicosis". **Bioengineering**, 6(4). DOI: 10.3390/bioengineering6040088
- Langlois, D. K., Querubin, J. R., Schall, W. D., Nelson, N. C., Smedley, R. C. (2019). "Ammonium tetrathiomolybdate treatment of copper-associated hepatopathy in dogs". **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 33(3), pp. 1336-1343. DOI: 10.1111/jvim.15474
- Langlois, D., Smedley, R., Schall, W., Kruger, J. (2013). "Acquired proximal renal tubular dysfunction in 9 labrador retrievers with copper-associated hepatitis (2006-2012)". **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 27(3), pp. 491-499. DOI: 10.1111/jvim.12065
- Lidbury, J. A., Steiner, J. M. (2013). "CHAPTER 61: Liver". En: Washabau, R. J., Day, M. J. (Coord.). **Canine and Feline Gastroenterology**. Saunders, pp. 849-957. DOI: 10.1016/B978-1-4160-3661-6.00061-4
- Agrawal, S., Dhiman, R. K., Limdi, J. (2016). "Evaluation of abnormal liver function tests". **Postgraduate Medical Journal**, 79, pp. 307-312. DOI: 10.1136/postgradmedj-2015-133715
- Macho, L. P., Center, S. A., Randolph, J. F., Dumars, L., Rush, S. E., Cameron M. K., Lucy, J. M., Hall-Fonte, D. L., McDonough, S. P., Peters-Kennedy, J., Marinoff, J., Harrison, J., Sabatino, B., Deitz, K. (2020). "Clinical, clinicopathologic, and hepatic histopathologic features associated with probable ketoconazole-induced liver injury in dogs: 15 cases (2015–2018)". **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 256(11), pp. 1245-1256. DOI: 10.2460/JAVMA.256.11.1245
- Megías, M., Molist, P., Pombal, M. (2019). "Órganos Animales". En: **Atlas de Histología Vegetal y Animal**. URL: <https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/digestivo-higado.php> [Consultado 28-07-2021]
- Merchán, R., Santos, E., Pastor, I. J., Fuertes, A. (2008). "Factores de riesgo y mecanismos de toxicidad hepática". **Medicine**, 10(10), pp. 611-618. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0211-3449\(08\)73125-4](https://doi.org/10.1016/S0211-3449(08)73125-4)
- Merola, V., M., Eubig, P. A. (2014). "Toxicology of Avermectins and Milbemycins (Macrocyclic Lactones) and the Role of P-Glycoprotein in Dogs and Cats". **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 42(2), pp. 313-336. DOI: 10.1016/j.cvsm.2011.12.005.
- Meucci, V., Battaglia, F., Marchetti, V., Gori, E., Intorre, L. (2020). "Rapid and simultaneous electrochemical method to measure copper and lead in canine liver biopsy". **MethodsX**, 7. DOI: 10.1016/j.mex.2020.101154
- Nakaichi, M., Iseri, T., Horikirizono, H., Komine, M., Itoh, H., Sunahara, H., Nemoto, Y., Itamoto, K., Tani, K. (2021). "Copper-associated Hepatitis in Dalmatian". **The Journal of Veterinary Medical Science**, 83(6), pp. 911-915. DOI: 10.1292/jvms.21-0061
- Nyland, T. G., Moon Larson, M., Mattoon, J. S. (2015). "Chapter 9 – Liver". En: **Small Animal Diagnostic Ultrasound**, pp. 332-399.
- Papich, M. G., Davis, L. E. (1985). "Drugs and the Liver". En: **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, pp. 77-95.

- Piñeiro-Carrero, V. M., Piñeiro, E. O. (2004). "Liver". *Pediatrics*, 113(4), pp. 1097-1106. Disponible en: https://pediatrics.aappublications.org/content/113/Supplement_3/1097 [Consultado 07-09-2021]
- Rodrigues, A., Leal, R. O., Girod, M., Dally, C., Guery, E., Gomes, E., Hernandez, J. (2020). "Canine copper-associated hepatitis: A retrospective study of 17 clinical cases". *Open Veterinary Journal*, 10(2), pp. 128-134. DOI: 10.4314/ovj.v10i2.2
- Rolfe, D. S., Twedt, D. C. (1995). "Copper-associated hepatopathies in dogs". *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 25(2), pp. 399-417. DOI: 10.1016/S0195-5616(95)50034-8
- Seguin, M. A., Bunch, S. E. (2001). "Iatrogenic copper deficiency associated with long-term copper chelation for treatment of copper storage disease in a Bedlington Terrier". *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218(10), pp. 10-14. DOI: 10.2460/javma.2001.218.1593
- Shehu, A., Ma, X., Venkataramanan, R. (2017). "Mechanisms of Drug-Induced Hepatotoxicity". *Clinics in Liver Disease*, 21(1), pp. 35-54. DOI: 10.1016/j.cld.2016.08.002
- Sherding, R. G. (1990). "Insuficiencia hepática aguda". En: *Clinicas Veterinarias de Norteamérica*, pp. 149-168.
- Thornburg, L. P. (2000). "A perspective on copper and liver disease in the dog". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12(2), pp. 101-110. DOI: 10.1177/104063870001200201
- VetGen (2021). VetGen: Veterinary Genetic Services. Disponible en: <https://www.vetgen.com/canine-ct-marker.html> [Consultado 09-09-2021].
- Washabau, R. J. (2013). "Chapter 61: Liver". En: Washabau, R. J., Day, M. J. (Coord.). *Canine and Feline Gastroenterology*. Saunders, pp. 849-957. DOI: 10.1016/B978-1-4160-3661-6.00061-4
- Wu, X., Leegwater, P. A., Fieten, H. (2016). "Canine models for copper homeostasis disorders". *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), pp. 1-14. DOI: 10.3390/ijms17020196
- Zooplus magazine (2021). Labrador retriever. Disponible en: <https://www.zooplus.es/magazine/perros/razas-de-perro/labrador-retriever> [Consultado 05-09-2021]