

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Correlación entre enzimas séricas cardiacas y el recuento
de microquistes de *Sarcocystis lamacanis* en alpacas
beneficiadas en el camal municipal de Huancavelica**

TESIS

Para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Bernardo López Torres

ASESOR

Juan Antonio Espinoza Blanco

Lima – Perú

2015

DEDICATORIA

A Dios, por la vida, por bendecirme para llegar hasta este punto de mi formación profesional.

A mis padres, por el gran ejemplo que son, la formación que me brindaron, por su apoyo económico, su sacrificio, motivación y consejos.

A mis hermanos (Delicia y Antonio) quienes son mi motor y motivo para seguir adelante, por su apoyo, alegría y cariño en los buenos y malos momentos

A mis abuelitos (Humberto, Paulina, Amado y Delicia), que de una u otra forma siempre me apoyan para seguir adelante a pesar de las dificultades que se presentaron en mi camino.

A mis maestros y amigos (Dr. Rodríguez, Dr. Lucas, Dr. Barrios), quienes siempre me inculcan a seguir adelante tanto en lo profesional como en la vida cotidiana.

A la Doctora Vásquez, Doctor Lira por su ayuda y las facilidades brindadas para culminar esta tesis.

A Martha Ynés, por alegrar mis días, por su apoyo incondicional para culminar este proyecto.

A mis amigos Juan, Christian, Adhemir, Jasbel, Geraldine, Casandra y Elizabeth por los momentos gratos y no gratos compartidos durante nuestra formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Antonio Espinoza Blanco, mi director de tesis, por toda la paciencia, consejos y asesoramiento para realizar este trabajo de tesis.

Al Dr. José Adolfo Bustamante Laverde por su amistad incondicional, su ayuda y consejos cuando más lo necesité.

A los Doctores José Luis Rodríguez Gutiérrez, Juan Raúl Lucas López, Luis Manuel Barrios Arpi, por sus consejos, por ayudarme en la ejecución de este trabajo de Tesis y porque les considero mi segunda familia.

A los Doctores Wilfredo Huanca López, Alfredo Delgado Castro por su amistad y consejos.

A los Laboratorios de Farmacología y Toxicología Veterinaria, Fisiología Veterinaria por acogerme para realizar mis experimentos y brindarme los materiales necesarios.

A mi alma mater, la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por todos los conocimientos y experiencias adquiridas a lo largo de la carrera y que me serán útiles el resto de mi vida.

Agradecer el financiamiento brindado por parte del Fondo de Promoción de trabajo de Tesis de Pregrado del VRI-UNMSM (Código N° 140801017) para la ejecución de este trabajo de investigación.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1) Camélidos Sudamericanos: Alpaca	3
2.2) Sarcocistiosis.....	4
2.2.1) Etiología	4
2.2.2) Ciclo biológico de Sarcocystis.....	5
2.2.3) Sarcocistiosis animal.....	6
2.2.4) Sarcocistiosis como problema de salud pública.	8
2.2.5) Sarcocistiosis como síndrome de intoxicación alimentaria.....	9
2.2.6) Diagnóstico de la Sarcocistiosis	10
2.2.7) Tratamiento de la sarcocistiosis.....	10
2.2.8) Prevención y control de la sarcocistiosis en el Perú	11
2.3) Enzimología Clínica en Medicina Veterinaria.....	12
2.3.1) Enzimas	12
2.3.2) Clasificación de las enzimas.....	13

2.3.3) Determinación de los niveles enzimáticos en suero	14
2.4) Biomarcadores Cardíacos	18
2.4.1) Creatina fosfokinasa (CK).....	21
2.4.2) Aspartato Aminotransferasa (AST/GOT)	24
2.4.3) Lactato Deshidrogenasa (LDH).....	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1) Lugar de estudio.....	29
3.2) Tamaño de muestra.....	29
3.3) Materiales.....	30
3.3.1) Equipos y materiales para el procesamiento y análisis bioquímico cinético.....	30
3.3.1.2) Equipos de laboratorio	30
3.3.2) Equipos y materiales para el procesamiento y estudio histológico	30
3.4) Metodología	31
3.4.1) Animales y muestras	31
3.4.1.1) Toma de muestra para el estudio Histológico.....	31
3.5) Procedimiento.....	34
3.5.4) Análisis de medición histológica	34
3.6) Análisis de datos.....	35
IV. RESULTADOS.....	36
V. DISCUSIÓN	40
VI. CONCLUSIONES.....	43
VII. LITERATURA CITADA	44

RESUMEN

El presente estudio tuvo por objetivo determinar la correlación entre el número de microquistes de *S. lamacanis* en miocardio (N°Mq) y los niveles de CK-MB, AST y LDH en sangre de alpacas, a fin de usarlos como predictores de salud o grado de infección por sarcocistiosis. Se utilizaron 41 alpacas de raza Huacaya de 3-5 años de edad del matadero Municipal de Huancavelica- Provincia de Huancavelica-Perú, las muestras de sangre se colectaron ante-mortem y las de miocardio post-mortem. El 100 % de los animales presentaron microquistes de *S. lamacanis*, y los coeficientes de correlación entre el N°Mq y CK-MB fue de 0.17, AST 0.04 y para LDH 0.06. Se concluye que la correlación es muy baja o casi nula, por lo que, las enzimas evaluadas, no podrían ser utilizadas como predictores de daño muscular por infección de microquistes de *S. lamacanis* en alpacas.

Palabras clave: Biomarcadores cardíacos, CK –MB, AST, LDH, microquistes *S. lamacanis*, alpaca.

ABSTRACT

This study was as objective to determine the correlation between the number of microcysts *S. lamacanis* in myocardium (NoMq) and blood levels of CK-MB, AST and LDH enzymes in alpacas, to know if you can to serve as predictors of health or sarcocystiosis degree. Performed in 41Huacaya alpacas of 3-5 year old from Municipal Slaughterhouse Huancavelica – Province of Huancavelica-Perú. Blood samples and myocardium were collected ante-mortem and post-mortem, respectively. 100% of the animals showed *S. lamacanis* microcysts, and correlation coefficients between the NoMq and CK-MB 0.17, with AST 0.04 and with LDH 0.06. We conclude that the correlation found was very low or almost zero, so the enzymes tested, could not be used as predictors of muscle damage from infection of *S. lamacanis* microcysts in alpacas.

Keywords: Cardiac biomarkers, CK-MB, AST, LDH, *S. lamacanis* microcysts, alpaca.

LISTA DE CUADROS

	PÁG.
Cuadro N° 1. Coeficiente de correlación entre el N°Mq de <i>S. lamacanis</i> y los niveles de CK-MB, AST/GOT y LDH	39
Cuadro N° 2. Valores mínimos y máximos del N°Mq de <i>S. lamacanis</i> , CK-MB, AST/GOT y LDH dentro de los rangos de agrupación.	39

LISTA DE FIGURAS

PÁG.

- Figura 1.** Promedio \pm Desviación estándar del Número de microquistes (N° Mq) de *S. lamacanis* en 25 mm² de tejido. No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$), entre los rangos de 0-10, 6.36 ± 3.41 ; para 11-100, 41.01 ± 19.82 y para >100 , 130.31 ± 27.99 de N°Mq. 37
- Figura 2.** Promedio \pm Desviación estándar de los niveles de CK-MB (rango de 0-10, 29.19 ± 8.34 ; para 11 – 100, 30.41 ± 8.93 y para >100 , 32.93 ± 12.45 UI/L) en sangre de alpacas positivas a *S. lamacanis* en tejido cardíaco. No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$), entre los rangos 37
- Figura 3.** Promedio \pm Desviación estándar de los niveles de AST/GOT (rango de 0 – 10, 260.52 ± 59.79 ; para 11 – 100, 243.44 ± 48.31 y para >100 , 253.00 ± 37.79 UI/L) en sangre de alpacas positivas a *S. lamacanis* en tejido cardíaco. No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$), entre los rangos. 38
- Figura 4.** Promedio \pm Desviación estándar de los niveles de LDH (rango de 0 -10, 937.41 ± 209.52 ; para 11 – 100, 965.78 ± 162.15 y para >100 , 966.46 ± 125.33 UI/L) en sangre de alpacas positivas a *S. lamacanis* en tejido cardíaco. No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$), entre los rangos. 38

I. INTRODUCCIÓN

La crianza de Camélidos Sudamericanos (CSA) constituye una fuente económica y de subsistencia para el poblador andino, ya que éstos proporcionan fibra, carne, fuente de trabajo, etc. (De los Ríos, 2006). Al mismo tiempo que representan una fuente importante de ingresos económicos para el poblador alto – andino, también son especies sujetas a diversos factores que disminuyen el potencial productivo de estas especies. Entre estos factores tenemos: disminución del precio de la fibra, capacitación técnica deficiente, los cambios climáticos, la pobre calidad y cantidad en nutrición, debido a la crianza en praderas alto andinas (MINAG, 2007).

En otros problemas a los ya mencionados encontramos alta prevalencia parasitaria, como por especies de *Sarcocystis sp.* que ocasionan infección en tejido muscular estriado (músculo cardíaco y esquelético), afectando la salud del animal haciéndolo más susceptible a otros patógenos, así mismo causa demérito en la calidad del corazón y la carne al comercializarla. Además de estos problemas, también constituyen un problema en salud pública, debido a que, el consumo de vísceras y carne infectada en forma cruda o mal cocida produce un cuadro de gastroenteritis producto de la acción de una toxina denominada sarcocystina (Leguía y Casas, 1999).

En medicina humana se han realizado estudios con respecto al diagnóstico de miocardiopatías utilizando marcadores biológicos, como las enzimas cardioespecíficas, las cuales nos ayudan a calcular la extensión de algún daño en el músculo cardíaco. Por lo tanto, la determinación de las enzimas Asparto aminotransferasa (AST), Creatina

fosfokinasa (CK), isoenzima Creatina fosfokinasa – MB (CK-MB) y Lactato deshidrogenasa (LDH) nos brindan valiosa información de la integridad del músculo cardíaco, convirtiéndose en una prueba auxiliar sencilla de realizar y de bajo costo (Roque, 2002).

Mediante este trabajo se buscó una correlación entre los niveles de enzimas cardiacas específicas y el recuento de microquistes en el corazón de alpacas, y de esta forma usar la enzimología clínica como predictor de daño cardíaco; así como sentar las bases de la enzimología clínica en esta especie para posteriores estudios de investigación.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1) Camélidos Sudamericanos: Alpaca

Nuestro país es el centro más importante de camélidos sudamericanos, constituyendo un rol importante del poblador andino dentro de la actividad ganadera; los ecosistemas sobre los cuales se desarrolla esta actividad están por encima de los 4,200 msnm. Tanto la alpaca como la llama son especies que durante un proceso de miles de años se han adaptado a este medio ecológico agreste, y en la actualidad brinda la posibilidad de ingresos económicos. El Perú posee aproximadamente 4'961,765 de ejemplares entre llamas y alpacas según el MINAG (2007), por tanto es el primer productor a nivel mundial. La región Puno es la que ostenta la mayor población a nivel nacional, con aproximadamente 2'026,600 alpacas y 437,090 llamas (MINAG, 2007).

Los camélidos sudamericanos domésticos, a veces en asociación con ovinos, constituyen el principal medio de utilización productiva de extensas áreas de pastos naturales en las zonas alto-andinas donde no es posible la agricultura y la crianza exitosa de otras especies de animales domésticos. Los camélidos convierten con eficiencia la vegetación nativa de estos ambientes en carne y fibras de alta calidad, además sus pieles y cueros tienen múltiples usos industriales y artesanales. El estiércol es otro subproducto valioso que se usa como combustible para la cocción de los alimentos y fertilizante para los cultivos. La llama cumple además una importante función de transporte (Iñiguez y Alem, 1996).

De Los Ríos (2006) estima que al menos un millón y medio de personas se dedican a la crianza de camélidos en la región alto-andina del Perú. Las áreas productoras de camélidos en el Perú incluyen las provincias con mayor pobreza y

marginalización. En Bolivia, y con base en las estimaciones del INE Bolivia (2013) y UNEPCA (1999) es posible estimar que la producción de llamas beneficia a 37.000–50.000 familias de productores de escasos recursos. Sin embargo, esta producción aún no representa una vía directa para reducir la pobreza y la marginalización de sus productores, no obstante la demanda incrementada por los productos de esta especie.

2.2) Sarcocistiosis

2.2.1) Etiología

Comprende un conjunto de enfermedades que afectan a numerosos hospedadores intermediarios de distintas especies del género *Sarcocystis*. La característica del género es la de formar quistes musculares tabicados que delimitan cavidades internas con numerosos zoítos (Cordero del Campillo, 2000).

Desde su descubrimiento por Mischer en 1843, los sarcosporidios se han descrito en la musculatura de los reptiles, aves y casi todos los mamíferos, incluidos los hombres, los simios y las ballenas (Mehlhorn *et al*, 1993).

Las especies del género *Sarcocystis* pertenecen a la clase *Coccidia* y al phylum Apicomplexa. Las coccidias son parásitos del tracto digestivo, cuyos elementos infectantes o esporozoítos, están encerrados en un esporoquiste o esporocisto. Los géneros de coccidias de importancia médica son *Eimeria*, *Isospora*, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Neospora* y *Sarcocystis*, las especies de estos tres últimos aseguran su paso a nuevos hospederos a través de la predación o carnivorismo (Barriga, 2002).

Hasta la actualidad se han descrito 120 especies del género *Sarcocystis* (Beck y Pantchev, 2010). Los miembros de *Sarcocystis* producen en los animales y el hombre una enfermedad denominada sarcocistiosis o sarcosporidiosis. La sarcocistiosis en los animales generalmente es asintomática y está bastante difundida en todo el mundo, así las prevalencias en los cerdos varían entre 3 a 36 % (Fayer, 2004).

En Camélidos sudamericanos se han descrito 3 especies de *Sarcocystis spp*: *Sarcocystis tilopodi* (sin. *S. guanicoecanis*) en guanacos, *S. aucheniae* en alpacas, llamas y vicuñas. Ambos producen quistes macroscópicos de crecimiento y maduración lenta en la musculatura esquelética, y el *S. lamacanis*, aquel que produce microquistes en la musculatura cardíaca y son de maduración rápida (Guerrero, 1967; Leguía *et al.*, 1989, 1990; La Perle *et al.*, 1999).

2.2.2) Ciclo biológico de Sarcocystis

Sarcocystis tiene un ciclo de vida indirecto que incluye dos hospederos en forma obligatoria; la gametogonia y esporogonia ocurre en la lámina propia del intestino delgado del predador (carnívoro), hospedero definitivo (HD); y la merogonia o esquizogonia en la presa (herbívoros), hospedero intermediario (HI).

Así, el HD desarrolla sarcocistosis intestinal, eliminando ooquistes o esporoquistes infectivos en las heces, y el HI presenta sarcocistosis muscular. El HI se infecta al ingerir con el pasto los ooquistes de tipo isosporoide del *Sarcocystis* (12-15 x 16-20 μm), los que presentan dos esporocistos o esporoquistes (8-12 x 10-15 μm) en su interior. Estos ooquistes tienen una pared muy delgada que se rompen con facilidad, por ello, en las heces se encuentran casi, exclusivamente, esporoquistes con cuatro esporozoitos cada uno. El ciclo de vida continúa cuando HD consume carne cruda del HI infectado (Lindsay *et al.*, 1995; Fayer, 2004).

2.2.2.1) Fase enteroepitelial o intestinal.

Se inicia con la ingestión del HD de carne cruda conteniendo el quistezoíto o cistozoíto, que contiene a los bradizoítos. Una vez ingeridos y liberados, los bradizoítos entran a la lámina propia del intestino delgado del HD donde se desarrollan de forma inmediata, dando lugar a los gametocitos (Kan y Pathmanathan, 1991; Buxton, 1998).

Los gametocitos desarrollarán la fase sexual del ciclo del parásito (gamogonia), pues formarán a los gametos: i) espermios (microgametos), y ii) óvulos (macrogametos). Los espermios abandonan el enterocito y nadan por el lumen localizando a los óvulos y fusionándose a ellos, ocurriendo la fecundación o reproducción sexual. Esta fusión de gametos forma un cigoto diploide que desarrollará ooquistes maduros que esporulan (esporogonia) y que abandonan el intestino en 7-12 días (período prepatente) (Barriga, 2002; Bowman, 2004).

Los ooquistes de *Sarcocystis sp.* salen esporulados en las heces, por lo que no necesitan evolucionar en el medio ambiente a diferencia de otras coccidias. Es decir, los sarcocistos de *Sarcocystis sp.* sólo deben sobrevivir en el medio en que son depositados. Esta diferencia le brinda una mayor adaptabilidad y ventaja con respecto a otros parásitos, especialmente, si se considera que está presente en áreas donde las condiciones de temperatura promedio son alrededor de los 0 °C (Cordero del Campillo, 2000; Barriga, 2002).

Los esporoquistes en condiciones medioambientales propias de climas templados permanecen viables por aproximadamente un año, a 4 °C en frigorífico, mantiene la capacidad infectante por dos años. Por debajo de 0 °C son viables dos meses, incluso en condiciones de sequedad viven 3 meses (Cordero del Campillo, 2000).

2.2.2.2) Fase extraintestinal o tisular

Los HI adquieren la infección al ingerir pasto o agua contaminada con esporoquistes esporulados. También, ha sido demostrado que insectos como las moscas pueden transportar mecánicamente esporoquistes infectivos a los HI (Markus, 1978). En el tracto intestinal del HI, los esporocistos ingeridos y digeridos liberan a los esporozoítos, los que pasarán la barrera intestinal llegando al torrente sanguíneo, alcanzando el endotelio de los vasos sanguíneos de los órganos del animal. En los vasos sanguíneos se dará la merogonia o esquizogonia (multiplicación asexual), que producirá merozoítos o pseudoquistes (merontes en diferentes estadios de evolución).

En la merogonia se dará la replicación sucesiva del ADN, observándose los núcleos en la periferia de las células madre. Los nuevos núcleos formados se rodean de plasma para formar los merozoítos, éstos son liberados en la última merogonia por lisis celular, se dirigen y penetran al tejido muscular, en algunas especies al neuronal, iniciando la segunda fase del ciclo o fase quística (Cordero del Campillo, 2000; Barriga, 2002).

En el tejido muscular se formará una célula redonda de forma ovoide llamada metrocito o célula madre, la cual no es infectante para el HD. El metrocito se duplicará sucesivamente formando dos células hijas, en cada vez, (endodiogenia), y en un mes, aproximadamente, (llamada fase de reproducción lenta), se dará origen a los bradizoítos (cystozoítos o merozoítos quísticos) (Cordero del Campillo, 2000). Los bradizoítos son infectantes para el HD y representan un estado detenido o de hipobiosis. Una vez ingeridos por el HD, por digestión se libera a los bradizoítos para continuar con su desarrollo (Barriga, 2002).

2.2.3) Sarcocistiosis animal

La Sarcocistiosis es una parasitosis con alta prevalencia en animales de abasto, pero usualmente es de baja patogenicidad. *Sarcocystis sp.*, generalmente, no produce ninguna reacción, por ello, raramente se asocia con inflamación. Sin embargo, existen numerosos reportes de cuadros clínicos producidos por diversas especies de *Sarcocystis*.

Entre los signos de la forma aguda se han descrito fiebre, hemorragias, anemia, trombosis, abortos, disminución de la producción, debilidad de la lana, pérdida de peso, retraso de crecimiento, debilidad, postración e inclusive la muerte del animal (Corner *et al.*, 1963; La Perle *et al.*, 1999).

La sarcocistosis aguda y masiva se caracteriza, principalmente, por hemorragias extendidas en músculos prominentes, las cuales causan cuadros de anemia, eritropenia, leucopenia, linfocitopenia, hipoproteinemia e hipoxia, resultantes de la esquizogonia en las células endoteliales. La destrucción endotelial también desencadena un incremento de la deshidrogenasa láctica y prostaglandinas (Dubey y Fayer, 1983). Igualmente conlleva a una destrucción de células pancreáticas, lo que se reflejaría como hiperglicemia, y a la destrucción glomerular, lo que exacerbaría la hipoproteinemia por proteinuria y produciría uremia (Rojas, 2004).

El aborto se explicaría como resultado de la sinergia de varias condiciones. La hemorragia, hipoproteinemia, fiebre y la prematura iniciación del proceso de parto, debido al incremento de concentraciones de prostaglandina (a causa del daño endotelial) y el factor de necrosis tumoral liberado por los macrófagos (Fayer y Dubey, 1988.).

Sarcocistosis, también ha sido asociada con miositis eosinofílica, una manifestación de hipersensibilidad tipo I (La Perle *et al.*, 1999).

La exposición a pequeñas dosis infectivas en el hospedero intermediario (HI) puede producir inmunidad en los animales, lo cual previene de cuadros clínicos severos; sin embargo, no evita su cronicidad, traduciéndose en una infección masiva en animales adultos (Leguía y Casas, 1999).

En el hospedero definitivo (HD) el cuadro clínico pasa desapercibido. En el HD, una leve diarrea mucosa es el signo clínico más frecuente que podría evidenciar sarcocistosis, la misma que sucedería cuando la eliminación de esporoquistes es mayor. Sin embargo, en cachorros se ha descrito signos de anorexia, pirexia, palidez en membranas, diarrea sanguinolenta, incoordinación, postración y muerte, posterior a una infección experimental con *Sarcocystis lamacanis*. Estos signos se relacionaron con la presencia de miles de óvulos, espermios y ooquistes en la lámina propia del intestino (Leguía *et al.*, 1989).

La sarcocistosis raramente produce signos nerviosos, más existe una mieloencefalitis protozoaria equina causada por la forma aberrante de *S. neurona* en equinos, la cual produce ataxia, disfagia, y diversos signos neurológicos. El equino no

desarrolla quistes musculares, presentando esquizontes y merozoítos en el sistema nervioso central. *S. neurona* produce quistes musculares en mapaches (HI) y gatos infectados experimentalmente (Dubey *et al.*, 2001).

2.2.4) Sarcocistiosis como problema de salud pública.

2.2.4.1) Sarcocistiosis humana intestinal

La sarcocystiosis es una enfermedad zoonótica. Existen dos especies de *Sarcocystis* que tienen al hombre como HD, el *S.hominis* y *S.suihominis* (Fayer, 2004). El *S. hominis* procedente del vacuno es menos virulento que el *S. suihominis* del cerdo, aunque la prevalencia en la carne del primero sería mayor (Beck y Pantchev, 2010).

La mayoría de casos de sarcocistiosis humana pasan desapercibidos; sin embargo, *Sarcocystis* puede producir una enteritis patógena en el hombre. Los signos clínicos incluyen náuseas, dolor abdominal, inapetencia y diarrea que se resuelve en 48 h (Fayer, 2004). Asimismo, puede causar con menor frecuencia daño a nivel hepático y en miocardio (Beck y Pantchev, 2010).

Los grupos de mayor riesgo son los inmunocomprometidos y niños en su primera exposición al agente. Se sabe que el consumo frecuente de carne infectada poco cocida, crea una inmunidad que disminuye la severidad en cuadros subsiguientes pero que no evita nuevas infecciones (Beck y Pantchev, 2010).

El hombre se infecta al ingerir carne de cerdo o res cruda o poco cocida con sarcocistiosis, que incluso puede ser parte de una costumbre culinaria como ocurre en los países europeos. En países como Alemania el 4% de la población sufre sarcocistiosis anualmente (Hinz, 1991). También se puede infectar como consecuencia de una pobre práctica de higiene durante la preparación de los alimentos, por contaminación cruzada. La prevalencia de sarcocistiosis humana en la zona rural de Tailandia es de 1.5%, incluyendo como factores de riesgo el consumo de vegetales crudos y la defecación en el campo (Nichpanit *et al.*, 2010).

En el hombre la sospecha clínica de sarcocistiosis humana se da en individuos que han consumido carne cruda o insuficientemente cocida, o que residen o visitan áreas geográficas endémicas. La sarcocistiosis intestinal humana es confirmada con la presencia de ooquistes o esproquistes en las heces (Fayer, 2004). La eliminación de ooquistes con las heces humanas se produce 1-2 semanas post ingesta y puede durar varias semanas (Beck y Pantchev, 2010).

2.2.4.2) Sarcocistiosis humana muscular

El hombre puede actuar como HI aberrante. A esta dolencia se le conoció históricamente como *Sarcocystis lindemanni*, término actualmente en desuso (Fayer, 2004). Son muy pocos los casos reportados a la actualidad, menos de 100 casos, la mayoría de ellos en zonas tropicales y subtropicales, y más frecuentemente en Asia Suroriental. El hombre se contamina con estos parásitos en forma accidental, adquiriendo especies de *Sarcocystis* de una gama amplia de carnívoros, los cuales pueden ser ingeridos a través del agua y los alimentos (Arness *et al.*, 1999; Fayer, 2004).

En Malasia se reportó un brote de sarcocistiosis en militares norteamericanos que operaban en esta zona. El HD del cual provinieron los ooquistes infectantes probablemente fue de una pitón (reptil). Por estudios ultraestructurales, los quistes musculares en los militares fueron similares a los descritos en monos de la zona (Arness *et al.*, 1999).

Si bien esta enfermedad es rara, en Malasia se ha reportado prevalencias hasta del 21% de quistes de *Sarcocystis* en músculos de humanos en autopsias de rutina, además un 20% de la población presenta anticuerpos contra *Sarcocystis* (Thomas y Dissanaiké, 1978; Beaver *et al.*, 1979).

Los casos de sarcocistiosis aberrante, generalmente, son asintomáticos; sin embargo, se ha descrito mialgias, debilidad muscular, nodulaciones subcutáneas, fiebre y eosinofilia. Estos síntomas se han atribuido a la desintegración del músculo esquelético y a la respuesta inmune (Arness *et al.*, 1999). Esta patología puede ser considerada dentro de las causas de enfermedades cardíacas idiopáticas (Habeeb *et al.*, 1996).

2.2.5) Sarcocistiosis como síndrome de intoxicación alimentaria

El consumo de carne insuficientemente cocida e infectada con algunas especies de *Sarcocystis* diferentes a las causantes de la sarcocistiosis intestinal humana, produce también trastornos gastroentéricos. Esta intoxicación alimentaria se asocia a la presencia de toxinas en los quistes, llamadas en conjunto sarcocystina. La sarcocystina tiene actividad neurotóxica y altera las membranas celulares, presentando una excesiva captación de agua y liberación de mediadores inflamatorios (pirógenos endógenos) que

producen hipertermia. Se ha demostrado que la inoculación de esta toxina en conejos causa la muerte (Sénaud *et al.*, 1968; Hiepe *et al.*, 1981).

2.2.6) Diagnóstico de la Sarcocistiosis

En el HD el diagnóstico se basa en la presencia de esporocistos en las heces. En el HI, algunas especies de *Sarcocystis spp.* forman macroquistes, observables a simple vista en la musculatura, siendo detectados a la inspección de carnes en el matadero, y en hallazgos ocasionales a la necropsia (Beaver *et al.*, 1979; Cordero del Campillo, 2000; Fayer, 2004).

No obstante, la gran mayoría de *Sarcocystis spp.* forma microquistes (observable microscópicamente). La histopatología y las biopsias son útiles en detectar la presencia de esquizontes en los vasos sanguíneos y microquistes en tejido muscular, y se realizan cuando se sospecha del agente. A la histología convencional con hematoxilina-eosina, los quistes de *Sarcocystis sp.* se observan de forma ovoide y basófilos (Cordero del Campillo, 2000; Lucas, 2012). En los casos de sarcocistiosis humana aberrante, además de las biopsias, está indicado el diagnóstico por imágenes y serología (Arness *et al.*, 1999).

La sarcocistiosis produce una respuesta humoral que podría ser identificada con diversas pruebas serológicas (Hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia, ELISA, electroinmunotransferencia, Western blot, etc.), que son útiles en el diagnóstico de sarcocistiosis y del género *Sarcocystis*, pero no logran identificar a las especies involucradas (Gasbarre *et al.*, 1984; Blythe *et al.*, 1997; Heckerroth y Tenter, 1998; Heckerroth y Tenter, 1999). La determinación de la especie de *Sarcocystis* se realiza con análisis ultraestructurales de la pared del quiste, existen 24 tipos morfológicos de paredes, o con técnicas moleculares que secuencian el gen RNA 18 S ribosomal (Tenter, 1995; Fischer y Odening, 1998; Heckerroth y Tenter, 1999; Holmdahl *et al.*, 1999).

2.2.7) Tratamiento de la sarcocistiosis

Actualmente, no existe un tratamiento efectivo que controle la sarcocistiosis en los animales y el hombre. Se han ensayado con profilácticos como el Amprolio en bovinos y ovinos, que reducen el cuadro clínico de sarcocistiosis en el HI (Fayer, 2004). Se ha descrito el uso de cotrimoxazol o furazolidona en el tratamiento de la sarcocistiosis intestinal humana, sin evidencia de su efectividad (Croft, 1994; Mensa *et al.*, 2013).

Asimismo, resulta de ayuda el tratamiento con Albendazol en dosis de 400-600 mg cada 12 horas por 15-20 días en casos de sarcocistosis muscular humana (Arness *et al.*, 1999). Para el caso de intoxicaciones alimentarias por *Sarcocystis* el tratamiento debe ser sintomático (Leguía, 2003).

2.2.8) Prevención y control de la sarcocistosis en el Perú

En el mundo, las prevalencias de infección por *Sarcocystis* en animales de abasto frecuentemente son muy elevadas. Las razones más importantes que explican este panorama son las siguientes: a) Un solo HI puede albergar varias especies de *Sarcocystis*, b) pueden existir muchos HD para una especie de *Sarcocystis*, c) un gran número de esporoquistes son excretados diariamente por el HD y por un periodo largo, d) los HD pueden reinfectarse, e) en las heces del HD el ooquiste sale esporulado e infectivo, a diferencia de otras coccidias y f) actualmente no existen vacuna que prevengan la infección.

Evidentemente, la primera medida de control por excelencia sería la restricción de la presencia del HD en las explotaciones pecuarias. En la ganadería peruana es una costumbre muy común que en un mismo espacio convivan animales de abasto y los carnívoros domésticos; se usa al perro como animal de pastoreo, y al gato en el control biológico de roedores; por lo que en la práctica esta medida resulta la menos realista. Además, existen animales silvestres HD, como el zorro, que perpetúan el ciclo de este patógeno, por lo que la restricción de los HD domésticos no eliminaría por completo el riesgo (Leguía y Casas, 1999; Rojas, 2004).

Una medida eficaz y sencilla es el evitar que el HD ingiera músculos crudos infectados. Sin embargo, en las zonas rurales del Perú es muy común observar a los canes alimentados con tejidos crudos del ganado, especialmente durante el sacrificio clandestino. Contrariamente, durante el sacrificio autorizado en el matadero, el médico veterinario puede controlar la presencia de macroquistes de *Sarcocystis*, ya que son fácilmente identificables.

Universalmente, la mejor estrategia de prevención siempre incluye la educación de la población involucrada. El hombre sufre sarcocistosis por el consumo de carne insuficientemente cocida, por lo que en los lugares prevalentes debe evitarse este hábito. Además, la disposición sanitaria de las heces humanas es fundamental para evitar la infección de los HI. También lo son las prácticas de higiene durante la preparación de

alimentos, para evitar la contaminación cruzada, y el evitar consumir alimentos crudos y agua no hervida en zonas endémicas (Arness *et al.*, 1999).

2.3) Enzimología Clínica en Medicina Veterinaria

2.3.1) Enzimas

Las enzimas son biomoléculas de naturaleza proteica que aceleran la velocidad de reacción hasta alcanzar un equilibrio. Constituyen el tipo de proteínas más numeroso y especializado y, actúan como catalizadores de reacciones químicas específicas en los seres vivos o sistemas biológicos. Muchas de las enzimas no trabajan solas, se organizan en secuencias, también llamadas rutas metabólicas, y muchas de ellas tienen la capacidad de regular su actividad enzimática (Cremonesi, 2002; Lehninger, 2006).

En los sistemas biológicos es necesario la enzima como catalizador ya que a la temperatura y pH del organismo las reacciones no se producirían a suficiente velocidad para permitir una rápida actividad muscular, generación de impulsos y todos los demás procesos requeridos para la existencia de la vida (Stryer, 1995).

La detección de las proteínas en el suero por su actividad catalítica como marcador del daño tisular constituye un procedimiento de gran importancia en el análisis clínico. (Rej, 1998).

La enzimología clínica es la disciplina que estudia y prueba la actividad enzimática en suero, plasma, orina u otros fluidos corporales con el propósito de detectar la función anormal de un órgano y por ende ayudar a establecer un diagnóstico y pronóstico de una determinada enfermedad. La presencia de enzimas en las células y el plasma fue reconocido en la década de 1800, posteriormente el desarrollo de la enzimología clínica comenzó después de la introducción de un ensayo para la amilasa sérica por Wohlgemuth en 1908 y en 1916 se determinó la actividad de la amilasa sérica en sangre y orina brindando un método confiable para detectar trastornos pancreáticos (Rosenfeld, 1999).

En 1927 se descubre la Fosfatasa alcalina (FA) en el hueso y se describe a la Fosfatasa alcalina sérica como una prueba diagnóstica (Rosenfeld, 1999).

El desarrollo y la comercialización por parte de la Compañía Química Sigma en San Luis Missouri (USA) en el año 1950 de reactivos de ensayos enzimáticos

simplificados en forma de Kits, como el Aspartato y Alanina aminotransferasa , y un ensayo de Fosfatasa alcalina que utiliza p- nitrofenil fosfato como sustrato, fueron factores importantes para el uso clínico de rutina y poder realizar nuevos estudios en lo referente a la enzimología clínica (Bessey *et al.*, 1946; Reitman y Frankel, 1957; Berger, 1993).

Al igual que el desarrollo del reactivo de ensayo, una contribución significativa al desarrollo de la enzimología clínica fue la invención del autoanalizador multicanal por Leonard Skeggs (Skeggs, 2000).

El autoanalizador aumentó la disponibilidad de analizar las enzimas y redujo los costos para el análisis enzimático en el suero, lo que finalmente condujo a su uso habitual tanto en medicina humana y veterinaria.

El avance de la enzimología clínica incluyó el desarrollo y evaluación de enzimas para su uso en especies animales, algunas de las cuales se han encontrado de utilidad diagnóstica, mientras que otras han caído en desuso por diversos factores.

2.3.2) Clasificación de las enzimas

La Unión Internacional de Bioquímicos (I.U.B) establece una comisión de nomenclatura enzimática para sistematizar, categorizar y catalogar enzimas (Webb, 1984). El sistema es numérico y basado en el tipo de reacción catalizada: Un nombre formal, un nombre común, iniciales y un número para cada enzima. Lactato deshidrogenasa (LDH) ilustra este sistema. Lactato deshidrogenasa es una oxidoreductasa que puede catalizar una reacción de oxidación o de reducción. Cuando la enzima incorpora un cofactor REDOX, como el NAD +, es una deshidrogenasa. Por lo tanto el nombre formal de LDH es L- lactato: NAD oxidorreductasa, su nombre común es Lactato deshidrogenasa, y su número en la comisión enzimática es EC 1.1.1.27 (Webb, 1984).

La comisión internacional de bioquímica ha propuesto seis clases de grupos principales (Devlin, 1991):

- **Clase 1 o Oxidorreductasas:** Agregan o substraen electrones, oxígeno o hidrógeno; ejemplo: oxidasas y deshidrogenasas.

- **Clase 2 o Transferasas:** Transfieren un grupo de una molécula orgánica hacia otra; ejemplo: fosfotransferasas, aminotransferasas.
- **Clase 3 o Hidrolasas:** Rompen una molécula en dos, por acción del agua.
- **Clase 4 o Liasas:** Remueven grupos no hidrolíticamente, dejando una doble ligadura.
- **Clase 5 o Isomerasas:** Éstas llevan a cabo una redistribución de átomos o de grupos de átomos dentro de una molécula.
- **Clase 6 o Ligasas:** Unen dos moléculas siempre a expensas de un compuesto de alta energía, habitualmente ATP.

2.3.3) Determinación de los niveles enzimáticos en suero

La velocidad de una reacción catalizada por una determinada enzima, es la medida de la llamada actividad enzimática, que puede ser equiparada en la práctica a la cantidad de la enzima. La actividad de una enzima se determina por medición de la velocidad de transformación del correspondiente sustrato. Esto puede hacerse: *a)* midiendo la disminución de la concentración del sustrato, o *b)* midiendo en incremento de la concentración del producto de la reacción. (Portillo *et al.*, 1997). La determinación cuantitativa de la actividad enzimática se efectúa del modo más rápido y conveniente cuando el sustrato o el producto son coloreados o absorben luz en la región ultravioleta, ya que la velocidad de aparición o desaparición de un producto o de un sustrato que absorbe la luz puede seguirse con un espectrofotómetro (Lehninger, 1987).

2.3.3.1) Espectrofotometría

Se refiere a proyectar un haz de luz monocromática a través de una muestra y medir la cantidad de luz que es absorbida, en función de la longitud de onda. Esto le permite realizar al operador dos funciones, primero, dar información sobre la naturaleza de la sustancia en la muestra y segundo indicar directamente que cantidad de la sustancia que nos interesa, está presente en la muestra (Bishop y Duben – Engelkirk, 1992).

Comparando la longitud de onda y la intensidad del máximo de absorción de luz de una muestra versus soluciones Standard, es posible determinar la identidad y la

concentración de componentes disueltos en la muestra (solución incógnita). Las ventajas de la espectrofotometría sobre otros métodos analíticos de laboratorio son varias: es rápida, precisa, versátil, fácil de usar y accesible en costo (Connors, 1980).

2.3.3.1.1) Fundamento de la Espectrofotometría

La actividad catalítica de una enzima y su especificidad al sustrato facilita su detección; generalmente las pequeñas cantidades de enzimas en las células complican la medición de la cantidad de una enzima en los extractos o líquidos tisulares. Afortunadamente la actividad catalítica de una enzima proporciona una sonda sensible y específica para su propia medición. La capacidad de catalizar la transformación en un determinado producto en miles, cientos de miles o más, moléculas de sustrato en el transcurso de un periodo corto, dota a cada molécula de enzima con la capacidad de amplificar químicamente su propia presencia (Murray *et al.*, 2001).

La concentración de una enzima puede ser expresada directamente como masa o indirectamente como actividad. Actualmente la expresión más aceptada de la concentración de un enzima es la velocidad de la reacción catalizada, actividad, por unidad de masa o de volumen. Esto puede ser más preciso para expresar la concentración de un mol de enzima por unidad de volumen. Las concentraciones, sin embargo de la mayoría de enzimas en suero y tejidos son usualmente muy bajas e inmedibles como masa según la enzimología.

Como ejemplo, ALT se encuentra en plasma a menos de 1 mg/litro. Con un total de una concentración de proteína plasmática de 70 g/L, la proporción de proteína enzimática y de proteína total será menor que 1 en 7000. Purificación, aislamiento y determinación de la concentración enzimática en este contexto será un procedimiento poco práctico para la química clínica.

La IUB define una unidad Internacional (U) de actividad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un mol a un sustrato o producto por minuto. La U es expresada por litro. Esta unidad solo especifica una cantidad de sustrato consumida o producto formado por unidad de tiempo por volumen definido de la muestra. Es así que por medio del espectrofotómetro, en algunas enzimas, se aprovecha la propiedad del NADH o el NADPH de absorber la luz de longitud de onda de 340 nm. La oxidación del NADH a NAD⁺ se acompaña de una disminución de la

densidad óptica (DO), proporcional a la cantidad oxidada de NADH. De igual manera, al reducir el NAD⁺ a NADH aumenta la DO, en proporción a la cantidad formada del NADH (Murray *et al.*, 2001).

Las variables entre laboratorios son tiempo, temperatura, pH y concentración de sustrato. Estas variables juegan un rol esencial en la evaluación de resultados entre laboratorios, y por esas razones los laboratorios deben establecer sus propios valores normales (Murray *et al.*, 2001).

2.3.3.1.2) El Espectrofotómetro

Un espectrofotómetro es un instrumento usado en los laboratorios clínicos para medir, en función de la longitud de onda, la relación entre valores de una misma magnitud fotométrica relativos a dos haces de radiaciones. Se lo usa principalmente en el análisis de sustancias contenidas en líquidos biológicos; también ayuda a la cuantificación de sustancias y microorganismos (Bishop y Duben – Engelkirk, 1992).

En general, los espectrofotómetros miden el porcentaje de transmitancia (T) y absorbancia (A). El porcentaje de transmitancia se refiere al porcentaje de radiación que pasa a través de la muestra y alcanza al detector. La absorbancia se define como la cantidad de radiación que las moléculas de la muestra son capaces de absorber, también se denomina densidad óptica (Connors, 1980).

Consta de componentes de cinco componentes básicos (CEPIS, 1995):

- La fuente Luminosa, dependiendo del tipo de espectrofotometría, la fuente luminosa puede ser una lámpara con filamento de tungsteno para luz visible, o una lámpara de arco de deuterio para luz ultravioleta.
- El monocromador, está compuesto por un conjunto de elementos. En general, dispone de una rendija o ranura de entrada que limita la radiación lumínica producida por la fuente y confina en un área determinada, un conjunto de espejos para pasar la luz a través del sistema óptico, un elemento para separar las longitudes de onda de la radiación lumínica, que puede ser un prisma o una rejilla de difracción, y una rendija de salida para seleccionar la longitud de onda con la cual se desea iluminar la muestra.

- El portador de muestras, Está diseñado para sostener la muestra que se quiere analizar dentro del rayo de luz de longitud de onda determinada por el monocromador. El elemento que contiene la muestra es una celda o cubeta, por lo general, rectangular. Las celdas o cubetas se fabrican de vidrio, si se requieren efectuar estudios en el rango de los 340 a los 1 000 nm y de sílice, si el análisis está en el rango comprendido entre los 220 y los 340 nm
- El sistema detector, El sistema de detección recibe la energía lumínica proveniente de la muestra y la convierte en una señal eléctrica proporcional a la energía recibida. La señal eléctrica puede ser procesada y amplificada, para que pueda interpretarse a través del sistema de lectura.
- El sistema de lectura, La señal que sale del detector recibe diversas transformaciones. Se amplifica y se transforma para que su intensidad resulte proporcional al porcentaje de transmitancia/absorbancia. Existen sistemas de lectura de tipo análogo (muestra la magnitud leída sobre una escala de lectura) o digital (muestra la magnitud leída en una pantalla).

2.3.3.2) Presencia de enzimas en sangre

Las enzimas de interés diagnóstico son constituyentes celulares de algunos tejidos específicos. Ellas pueden encontrarse tanto en la membrana celular, como en organelas del contenido citosólico.

Estas enzimas son constantemente liberadas a la corriente sanguínea y, de la misma forma, son retiradas de la sangre. Estas enzimas no realizan ninguna función fisiológica conocida en la sangre por lo que también se les conoce como “enzimas plasmáticas no funcionales”; pero éstas mantienen su actividad catalítica durante su estadía en circulación. (Murray *et al.*, 2001). Luego de un tiempo una gran parte de las enzimas en plasma son degradadas por macrófagos sistémicos o parenquimales; y otras son excretadas por la orina.

El incremento de la actividad enzimática en los tejidos normalmente está asociado al aumento de la síntesis de la enzima en el tejido de origen, la disminución del catabolismo o la proliferación celular. En cuanto a la disminución o decrecimiento

ocurre por los factores inversos (Disminución de la síntesis, aumento de la degradación), por la inactivación enzimática o carencia de cofactores (Gella, 1994).

Aunque algunas enzimas sean específicas de algunos órganos, la mayoría de las veces es necesario usar otros recursos que ayuden en la identificación del tejido afectado. Kerr (1989) afirma que tanto la determinación de isoenzimas, como el uso de concomitante de otras enzimas, pueden ayudar en el diagnóstico. Bush (1991) agrega que otros hallazgos laboratoriales pueden indicar o descartar el desenvolvimiento de determinados órganos, cuando son evaluados en conjunto.

Los resultados de laboratorio provenientes de animales inmaduros difieren con respecto de animales maduros, ya que en cachorros, que se encuentran en crecimiento, los niveles enzimáticos suelen ser más elevados que los rangos normales. Los perros alcanzan sus niveles enzimáticos normales al alcanzar la madurez (6 - 8 meses) y estos niveles enzimáticos se vuelven constantes a partir de los 3 años de edad (Meyer y Harvey, 1998).

Entre los constituyentes que se liberan desde la célula en situación de isquemianecrosis, aquellos que se hallan disueltos en el citoplasma y de menor tamaño son los que más fácilmente acceden a la circulación; por ello, son marcadores precoces de lesión celular. Si esta lesión persiste, se difundirá desde la célula lesionada macromoléculas citoplasmáticas, la mayor parte de naturaleza enzimática con una mejor cardioespecificidad como la Aspartato aminotransferasa (AST), la Creatina fosfoquinasa (CK) y la Lactato Deshidrogenasa (LDH) (Santaló *et al.*, 2003).

Una variedad de procesos patofisiológicos provocan un daño en la célula miocárdica, causando un incremento en la medición de actividad de las enzimas en el plasma, cuya propiedad catalítica es sensible y específica para cada enzima y es usada para su medición mediante reacciones químicas específicas (Meyer y Harvey, 1998). La elevación de marcadores de necrosis miocárdica no indica la patogenia que origina la necrosis miocárdica, pero si la extensión del daño miocárdico (Santaló *et al.*, 2003).

2.4) Biomarcadores Cardíacos

Las manifestaciones sintomáticas de una cardiomiopatía aguda pueden ser variadas, y el ECG no es de uso común en al menos 50% de los casos, lo que representa un riesgo potencial para el diagnóstico erróneo. Por lo tanto, los marcadores

bioquímicos y enzimas cardíacas se consideran muy importantes y esenciales para el diagnóstico de cardiomiopatías como el infarto agudo (Rajappa y Sharma, 2005).

Inicialmente, las transaminasas y la creatina fosfokinasa (CK) fueron utilizados como marcadores de diagnóstico, y poco a poco, la mejora de los marcadores como la creatina fosfokinasa cardíaca banda miocárdica (CK-MB) evolucionaron y tienden a ser más específicos, como las troponinas. Las troponinas son más eficaces que CK - MB, ya que ayuda no sólo en el diagnóstico, sino también en la evaluación de riesgos y la toma de decisiones terapéuticas. Sin embargo, la búsqueda de un marcador cardíaco ideal continúa, a pesar de las troponinas parecen tener muchas cualidades de un marcador ideal (Maynard *et al.*, 2000).

Un marcador cardíaco ideal que guíe a un buen diagnóstico, hasta el momento no existe. Los investigadores han planteado la hipótesis de varias características que debería tener un marcador cardíaco ideal (Mercer, 1997). La alta especificidad es importante para ser considerado un biomarcador cardíaco ideal, y concentraciones más altas de este marcador deben ser visto en el miocardio y con concentraciones más bajas en tejido no cardíaco (Rajappa y Sharma, 2005). La distribución tisular del marcador es importante, tanto en condiciones fisiológicas así como patológicas.

La velocidad de liberación del marcador es importante en la lesión del miocardio. Su aparición inmediata tras la lesión puede facilitar el diagnóstico precoz. Por ejemplo, las troponinas muestran una liberación inicial con la concentración pico en 12-24 horas de la lesión y un segundo pico 2-4 días después de la lesión (Maynard *et al.*, 2000). Las troponinas pueden ser beneficiosas es el diagnóstico tardío de daño cardíaco; sin embargo, tienen la desventaja de no ser capaz de detectar lesiones posteriores, en tales situaciones CK-MB son más útiles (Alpert *et al.*, 2000; Jaffe *et al.*, 2010).

Los ensayos de laboratorio clínico dentro de las pruebas diagnósticas para las lesiones cardiovasculares, estos métodos son la determinación de la actividad enzimática de CK y LDH. Sin embargo, en la última parte del siglo 20, ensayos de alta especificidad y sensibilidad para la detección de daño miocárdico, tales como la troponinas, son buenos ensayos capaces de determinar con mayor precisión daño cardíaco (Alpert *et al.*, 2000; Braunwald *et al.*, 2000; Hamm *et al.*, 2001; Remme y Swedberg, 2001; Bertrand *et al.*, 2002).

La deshidrogenasa láctica sérica (LDH) y CK en suero fueron desarrollados y utilizados como marcadores cardíacos, a principios de 1960, convirtiéndose CK poco a poco el marcador de elección, como resultado de su aumento temprano después de injurias cardíacas (Amador *et al.*, 1963; Dunn y Siegel, 1965). Diferencias en la especificidad de sustrato para la isoenzima LDH fueron utilizadas para desarrollar ensayos para suero α -hidroxibutirato deshidrogenasa (HBD; isoenzima 1 LDH), que mostró un aumento de la especificidad para la detección de daño miocárdico (Elliot *et al.*, 1962). Los procedimientos electroforéticos se han desarrollado para la demostración de las isoenzimas de CK y la LDH, que eran reconocidas por tener mayor especificidad que la actividad total de CK. Se desarrollaron procedimientos analíticos para la actividad de CK-MB después de la producción de anticuerpos para la subunidad-B (Jockers-Wretou y Pfeleiderer, 1975).

Ahora es generalmente aceptado que la medición de actividad de marcadores enzimáticos tales como la aspartato aminotransferasa (AST), Lactato deshidrogenasa LDH y CK-MB son de poco valor en la evaluación de la lesión miocárdica, debido a la falta de especificidad tisular (Alpert *et al.*, 2000). El valor de CK total es limitado; sin embargo, aparece en el torrente sanguíneo relativamente pronto después de la lesión por lo que todavía puede ser de algún valor cuando se utiliza en combinación con marcadores más sensibles, como las troponinas (Wu *et al.*, 1999).

Marcadores específicos de daño cardíaco tienen un rol importante en el diagnóstico de infarto cardíaco. Los marcadores séricos de más reciente uso sirven para diagnóstico de daño de miocardio por cirugía (Adams, 1997), miopatías (Braun *et al.*, 1996), ejercicio (Laslett *et al.*, 1996; Siegel *et al.*, 1997), miocarditis (Franz *et al.*, 1996; Lauer *et al.*, 1997) y diversas intervenciones médicas, tales como angioplastias (Abbas *et al.*, 1996; Genser *et al.*, 1997), ablación por radiofrecuencia (Katrtsis *et al.*, 1997) y cardioversión eléctrica de arritmias (Greaves y Crake, 1998). Muchas de estas condiciones y procedimientos son investigados usando modelos experimentales con animales.

Hay un incremento en el interés de la detección específica del daño miocárdico en especies no humanas (Boyd, 1988; Evans, 1991; Carrió *et al.*, 1996; Ganz *et al.*, 1996). Además, la investigación básica involucra modelos animales para estudios de la

patología humana, y la investigación médica e intervenciones quirúrgicas, y como base en el estudio toxicológico en la industria farmacéutica.

Los análisis predictores de daño cardíaco también pueden ser usados en animales de granja y animales domésticos. Con animales como sujetos experimentales, hay que tener ciertas consideraciones debido a las diferencias en el metabolismo interespecies, localización y especificidad de los tejidos. Las complicaciones asociadas con la coexistencia del daño del músculo esquelético y el músculo cardíaco, como se ve con humanos (Lavomne y Hue, 1998), en animales son exacerbadas. El exceso de manipulación, restricciones e inyecciones, son los que podrían dañar el músculo esquelético, todos estos factores son de relevancia limitada para el estudio dirigido a humanos. Además, las miopatías subyacentes en animales pueden pasar desapercibido o ausentes en exámenes regulares o exhaustivos, como se ve con humanos. La elección de anestésicos y relajantes musculares usualmente difieren de los usados con humanos, y estos medicamentos pueden tener perfiles toxicológicos menos documentados.

Algunos de los metabolitos convencionales usados en medicina clínica para detectar daño miocárdico son aplicados para uso con muestras de origen no humano. Así, la determinación de la actividad enzimática de creatina fosfoquinasa y sus isoenzimas, las isoenzimas de LDH, o la de beta-hidroxi-butilato deshidrogenasa, son del todo factibles, pero a ellos les falta especificidad y sensibilidad para detectar el daño en el miocardio (Boyd, 1988; Yasuda *et al.*, 1990; Evans, 1991; Lavomne y Hue, 1998).

En un esfuerzo para caracterizar la eficacia del ensayo clínico para troponina cardíaca I, troponina cardíaca T, estas troponinas fueron medidas en músculo cardíaco y esquelético de diversas especies de mamíferos de laboratorio y comparado con determinaciones de creatina fosfoquinasa total y sus isoformas CK-MM y CK-MB.

2.4.1) Creatina fosfoquinasa (CK)

La CK citoplásmica es un dímero, compuesto por las subunidades M y/o B, los que se asocian formando las isoenzimas CK-MM, CK-MB y CK-BB. La creatina fosfoquinasa actúa como un regulador de la producción de fosfato de alta energía y de su utilización dentro de los tejidos contráctiles; también tiene un rol general, en el transporte de enlaces fosfato de alta energía a través de la creatina fosfato en el sitio de

la producción de ATP en las mitocondrias en el sitio de la utilización dentro del citoplasma (Bessman y Carpenter, 1985). Esto apoya la observación de que esta enzima se encuentra en los tejidos que tienen alto requerimiento de energía, tales como los túbulos distales del riñón. CK también se encuentra como una forma mitocondrial; CK mitocondrial es también un dímero, que consiste en subunidades sarcomérica y no sarcomérica (Klein *et al.*, 1991), CK mitocondrial es inestable en el suero humano, difíciles de medir y como consecuencia su significado clínico es desconocido. CK-MM es la principal isoenzima encontrada en el músculo estriado (aproximadamente 97% de la CK total). CK-MB se encuentra principalmente en músculo cardíaco, que comprende 15-40% de la actividad total de CK, siendo el resto CK-MM. Cantidades de trazas de CK-MB se encuentran en el músculo esquelético (2-3% de la actividad total de CK); pacientes con lesión de músculo esquelético tendrá aumentos en las concentraciones absolutas de CK y CK-MB. CK-BB es la isoenzima predominante que se encuentra en el cerebro, colon, el íleon, estómago y vejiga urinaria (Lott y Nemesanszky, 1996).

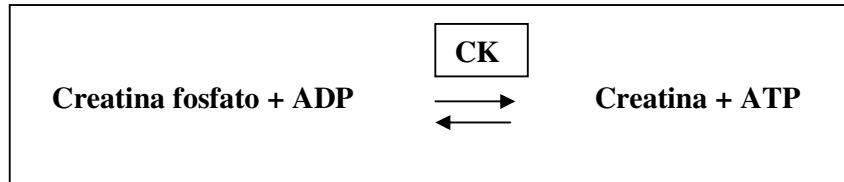
El desarrollo de anticuerpos para la subunidad M de CK habilitado para la inmuno-inhibición fue utilizado como el primer ensayo cuantitativo específico para anticuerpos CK-MB (Jockers-Wretou y Pfleiderer, 1975). Los anticuerpos inhiben la actividad de la subunidad M, con la actividad enzimática residual que se deriva de sólo las subunidades B; CK-BB es indetectable por medición de su actividad en el suero, a menos que el paciente haya sufrido un grave accidente cerebrovascular, y así la actividad residual representa la actividad de CK-MB. Aunque los anticuerpos han sido desarrollados para las subunidades B y M de CK, pues se creyó que MB no tenía su propia y única antigenicidad. Sin embargo, los anticuerpos específicos fueron desarrollados a mediados de 1980, Vaidya *et al.* (1986) permitiendo el desarrollo de ensayos inmunológicos directos para CK-MB.

La actividad total de CK y el aumento de la concentración de CK-MB en suero, en paralelo después de la lesión miocárdica, aumenta a partir de 4-6 h después de la lesión, alcanzando máxima concentración sérica después de 12-24 h y vuelve a la línea base después de 48-72 h (Hamburg *et al.*, 1991). CK-MB en suero es considerablemente más específico de daño miocárdico que CK total en suero, que pueden ser elevados en muchas condiciones donde el músculo esquelético esté dañado. En consecuencia, CK no debería utilizarse para el diagnóstico de la lesión miocárdica a menos que se utiliza en

combinación con otros marcadores cardíacos más específicos (Jaffe *et al.*, 2000). La retención de CK total sérica se puede justificar para los ensayos clínicos y estudios epidemiológicos, que con frecuencia se han usado como marcadores en muchos ensayos (Fromm y Roberts, 2001).

2.4.1.1) Función de la CK

La enzima CK cataliza el equilibrio de la siguiente reacción:



En la cual se realiza una transferencia de un fosfato de alta energía desde la creatina fosfato al ADP (Adenosín Difosfato) produciendo ATP (Adenosín Trifosfato). En la célula cardíaca este evento ocurre en la mitocondria donde la CK mitocondrial transfiere fosfatos de alta energía, generados por la fosforilación oxidativa, hacia la creatina, quien luego sale de la mitocondria como Creatina fosfato. En el citosol la CK cataliza la transferencia de fosfatos de alta energía hacia, o desde los diversos sistemas que lo utilizan o generan, como por ejemplo: la contracción muscular y la glucólisis. (Lehninger, 1987; Murray *et al.*, 2001; Devlin, 1991).

2.4.1.2) Determinación de los niveles de CK

La determinación de CK se realiza mediante espectrofotometría, el valor obtenido nos ayuda evaluar enfermedad del músculo cardíaco y esquelético principalmente. En la necrosis miocárdica, la actividad catalítica de la CK ya puede detectarse aumentada por encima de su límite de referencia a partir de las 4-6 horas del inicio del daño miocárdico (Santaló *et al.*, 2003). Se ha reportado estudios en perros en la que niveles elevados de CK se encuentran en el suero a las 12 horas, alcanza su máximo valor entre las 24 y 36 horas y regresa a la normalidad a los 4 días (Máxime, 1984).

Debido a la baja cardioespecificidad que poseía la CK total, se empezó a utilizar su isoenzima más cardioespecífica, la CK-MB, para la evaluación de la necrosis de miocardio. La CK-MB cumple la misma función descrita de la CK en el citosol de la célula cardíaca. La actividad de CK-MB puede detectarse aumentada en el plasma a partir de las 4 – 6 horas y permanece elevada entre las 24 y 36 horas al inicio de los

síntomas en humanos, entonces si el daño no es progresivo, los valores de CK retornan a la normalidad a las 48 horas post infarto (Santaló *et al*, 2003). Esta característica de la CK-MB de permanecer aumentada en el plasma por menos tiempo la elige como la enzima de elección para posibles reinfartos en humanos (Santaló *et al*, 2003).

La determinación de CK y CK-MB es mediante suero y éste debe ser fresco. Se ha reportado que las muestras refrigeradas (2–10°C) pierden hasta 10% de actividad enzimática en un día. En un estudio en la cual se realizaba la comparación bioquímica en plasma seminal, la mitad de cada muestra de plasma seminal fue procesada de inmediato y la otra mitad fue guardada en congelación en nitrógeno líquido (-196 °C). Estas muestras fueron descongeladas después de un mes de almacenamiento para su análisis bioquímico. Solo se encontró una disminución significativa ($p < 0.05$) de los niveles de triglicéridos (mg/dL) entre el plasma seminal fresco y descongelado (Díaz *et al*, 2015).

Los valores normales de CK - MB en alpacas comprenden de 17 – 101 UI/L (Bogin, 2000).

2.4.2) Aspartato Aminotransferasa (AST/GOT)

Conocida también por el nombre de Transaminasa glutámico oxalacética (GOT), es encontrada principalmente en el hígado, en los eritrocitos y los músculos esquelético y cardíaco. Normalmente es utilizada para evaluar lesión muscular en conjunto con creatina quinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH). En grandes animales es usada también para investigar enfermedades hepáticas (Kerr, 1989). Esta enzima puede estar elevada en la intoxicación crónica por cobre en ovinos (Méndez, 2001).

La enzima AST puede ser usada para evaluar lesión hepática en pequeños animales de la misma forma que ALT, sin embargo con una especificidad mucho menor. En la evaluación de lesión muscular, produce aumentos menores que CK, pero se extienden por un período de tiempo mayor en suero.

Perez *et al*. (1997) sugirió que AST debe ser incluida en la monitorización de problemas musculares. La utilización de esta enzima en conjunto con CK y LDH puede ofrecer información más precisa sobre el período en el cual se encuentra la lesión (Tadich *et al*., 1997).

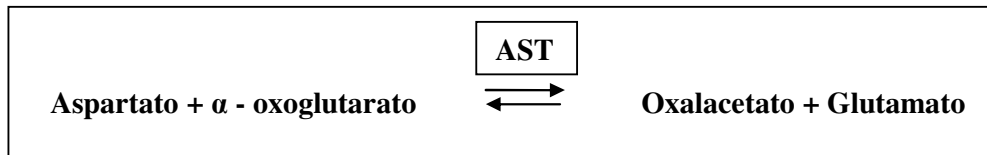
La presencia de AST en tantos tejidos hace que la enzima en el suero sea un marcador inespecífico pero sensible de daño de tejidos blandos lo que impide su uso como una enzima específica de un órgano (Boyd, 1983).

La AST puede ser una enzima mitocondrial y citosólica, por lo cual cuando tenemos una lesión mayor se libera a la corriente sanguínea. Por otro lado CK y LDH, por ser citosólicas y de tamaño pequeño, consiguen traspasar la membrana celular incluso cuando no existe un daño tisular grande. En realidad, un simple aumento de la permeabilidad de membrana es suficiente para que ocurra la liberación de la enzima (Perez *et al.*, 1997).

Lesiones en el músculo cardíaco también son demostradas por el aumento de AST. Diversas Cardiomiopatías pueden causar este efecto, así como endocarditis bacteriana, dirofilariosis, trombosis aórtica e infarto del miocardio (Bush, 1991).

2.4.2.1) Función de la AST

La AST cataliza la siguiente reacción:



En esta reacción, la AST cataliza la transferencia de un grupo α -amino al átomo de carbono α de un oxácido (α -oxoglutarato). Participando en la célula miocárdica en la lanzadera malato-aspartato con la finalidad de introducir moléculas reducidas (malato), en la mitocondria, para la obtención posterior de ATP mediante la fosforilación oxidativa (Lehninger, 1987; Murray *et al.*, 2001).

2.4.2.2) Determinación de los niveles de AST.

La determinación de AST se realiza mediante espectrofotometría, el valor obtenido se usa especialmente para diagnosticar enfermedades del hígado y del músculo cardíaco. Ante un daño celular del miocardio, se observa un aumento moderado de la enzima a las 6 u 8 horas de ocurrido el episodio, alcanza niveles máximos alrededor de las 48 horas y retorna a la normalidad entre el 4º y el 6º día (Willard *et al.*, 2001).

Los valores normales de AST en suero de alpacas comprenden de 216 – 378 UI/L (Bogin, 2000).

2.4.3) Lactato Deshidrogenasa (LDH)

Corresponde a la categoría de las oxidoreductasas, dado que cataliza una reacción redox, en la que el piruvato es reducido a lactato gracias a la oxidación de NADH a NAD⁺. Las isoenzimas de lactato deshidrogenasa son tetrámeros de dos protómeros con pesos moleculares de aproximadamente 35 kDa.

Se conocen dos tipos de subunidades: H y M, que presentan pequeñas diferencias en su secuencia de aminoácidos. Ambas pueden asociarse independientemente para formar tetrámeros, dando lugar a cinco isoenzimas (isoformas de la enzima), correspondientes a las cinco combinaciones posibles, cada unas de las cuales se encuentra preferentemente en determinados tejidos y puede identificarse mediante electroforesis (Henderson, 1983).

- LDH-1 (H₄): En corazón, músculos y eritrocitos
- LDH-2 (H₃M): En sistema retículoendotelial y leucocitos
- LDH -3 (H₂M₂): En pulmones
- LDH-4 (H₁M₃): En riñones, placenta y páncreas
- LDH-5 (M₄): En hígado y músculo esquelético

La asociación de las subunidades para formar tetrámeros es aleatoria, por lo que la composición isoenzimática de un tejido está determinada principalmente por el nivel de expresión de cada uno de los genes que codifican las subunidades H y M.

La LDH pasa a la sangre ante toda destrucción de estos tejidos (traumática, infecciosa o neoplásica), por lo que su elevación en suero es un signo inespecífico de enfermedad o de un proceso, es decir, que un órgano o tejido ha sido lesionado.

Es una enzima presente en varios tejidos, en particular en músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado y eritrocitos, además también se encuentra en riñones, huesos y pulmones. Existen cinco isoenzimas conocidas, que no son comúnmente analizadas en los Laboratorios Veterinarios. Aisladamente la enzima no es específica para ningún órgano. Cualquier intensidad de hemólisis es perjudicial, porque la extravasación de las enzimas eritrocitarias incrementa la actividad total de LDH en plasma.

Lesiones musculares de diversas etiologías pueden estar relacionadas a un aumento de LDH. La deficiencia de Vitamina E y selenio y la mioglobinuria son causas del aumento de LDH (Cardinet, 1997). Balogh (2001) demostró que, en caballos de salto, la LDH aumenta inmediatamente después del ejercicio y se mantiene elevada después de 24 horas, a diferencia de la enzima CK que tiene un pico después del ejercicio, la cual retorna a sus niveles basales después de un día. Por eso se presenta como un buen indicador de lesión muscular, Garcia *et al.* (1999) utilizó LDH en conjunto con CK y AST para monitorear la intensidad del ejercicio en caballos criollos.

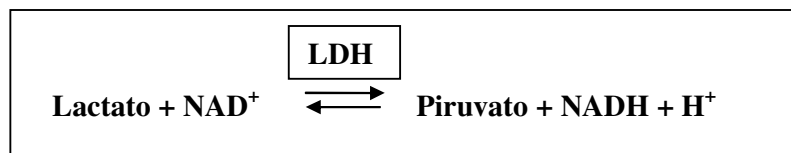
La LDH puede ser utilizada para evaluar diversas cardiomiopatías (isquemia, endocarditis bacteriana, dirofilariosis, trombosis aórtica e infarto del miocardio). Normalmente LDH aumenta menos rápidamente que CK, además también mantiene los valores elevados por más tiempo. Después del infarto agudo del miocardio, en humanos, la LDH alcanza por encima de los valores de referencia después de 16 horas, alcanza sus valores máximos en 40 horas y mantiene una actividad elevada hasta por 8 días.

En medicina humana es común analizar la isoenzima LDH1, y comparar con los valores de otras isoenzimas para evaluar infarto al miocardio. LDH1 que normalmente no sobrepasa el 40% de la actividad total, después del infarto puede alcanzar en una proporción de 50 – 60% de la actividad total. Además, se encuentra en menor medida que LDH2, situación que se invierte después de un infarto (Chapelle, 1994).

La enzima LDH también puede ser utilizada en casos de meningitis bacteriana. En estos casos, se encuentra un incremento de la isoenzima LDH5 y un pequeño aumento de LDH4 (Nazifi *et al.*, 1997).

2.4.3.1) Función de la LDH

La LDH cataliza la siguiente reacción:



Como se puede observar la LDH transfiere electrones desde el lactato a la forma oxidada del NAD⁺ (Nicotinamida Adenina Dinucleótido) resultando de la reacción Piruvato, la coenzima reducida NADH y un protón. En el citosol la LDH cataliza esta reacción en la última etapa de la glucólisis, donde el Piruvato se reduce a Lactato,

también participa en la gluconeogénesis donde el lactato captado por la célula es destinado a formar glucosa (Lehninger, 1987; Murray *et al*, 2001; Devlin, 1991).

2.4.3.2) Determinación de los niveles de LDH

La LDH puede ser utilizada para ayuda de diagnóstico en cardiomiopatías diversas (isquemias, endocarditis bacterianas, dirofilariosis, trombosis aórtica e infarto de miocardio) ya que un aumento de actividad en el suero es índice de daño tisular (Scheffer y Gonzales, 2004). Sin embargo la LDH total no es cardioespecífica, se encuentra en tantos tejidos corporales que la determinación de sus valores es cuestionable (Willard *et al*, 2001). Normalmente la LDH aumenta menos rápidamente que la CK, y también mantiene sus valores elevados por más tiempo. La LDH comienza a aumentar de 12-24 horas después de producirse el infarto, alcanza un pico entre las 48-72 horas y permanece elevado hasta el 7º día (Scheffer y Gonzales, 2004).

Bogin (2000), reporta valores normales de LDH en suero de alpacas entre 88 a 487 UI/L.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1) Lugar de estudio

La toma de muestras del presente estudio se llevó a cabo en el Camal Municipal de Huancavelica – Provincia de Huancavelica - Perú, donde se sacrifica alpacas dos veces por semana. Los sueros fueron almacenados en nitrógeno líquido (para posterior análisis bioquímico) y enviadas al Laboratorio de Farmacología y Toxicología Veterinaria, y las conservadas en formol (tejidos de miocardio, procesamiento histológico y la medición de estos cortes) fueron enviadas al Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM) y al SENASA en el departamento de Lima, distrito de San Borja.

3.2) Tamaño de muestra

Se empleó la fórmula descrita para variables de medida continua, cuando se quiere comparar dos promedios independientes (Martínez *et al*, 2001):

$$n = \frac{2(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 s^2}{d^2}$$

- **n**: Tamaño de muestra
- **d²**: Diferencia de medias mínima

- **d²**: 41 U/L
- **s²**: 900
- **z_α**: 1.96
- **z_β**: 1.645

(Bogin, 2000; Martínez *et al*, 2001)

- s^2 : Varianza
- z_{α} : Error alfa
- z_{β} : Error beta

Utilizando los datos estadísticos encontrados por Bogin (2000) con respecto a la enzima CK obtendremos un tamaño de muestra de 13.91 ó 14 alpacas, como mínimo, para cada uno de los grupos; por lo tanto se evaluaron 41 alpacas.

3.3) Materiales

3.3.1) Equipos y materiales para el procesamiento y análisis bioquímico cinético.

3.3.1.1) Reactivos y materiales

- Kit de enzima Creatina fosfoquinasa MB (CK- MB) (Valtek, Chile).
- Kit de enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) (FAR Diagnostics, Italia).
- Kit de Aspartato Aminotransferasa (AST/GOT) (FAR Diagnostics, Italia).
- Alcohol 96°.
- Nitrógeno líquido (-196°C).
- Agua destilada con un pH de 7.1.
- Suero fisiológico.

3.3.1.2) Equipos de laboratorio

- Analizador Bioquímico Semiautomático (SINNOWA, China).
- Estufa.
- Centrífuga.
- Tanque de nitrógeno líquido.
- Micropipetas con capacidad de 100 – 1000 ul y de 5-50 ul.
- Cronómetro
- Refrigeradora.
- Tips

3.3.2) Equipos y materiales para el procesamiento y estudio histológico

3.3.2.1) Reactivos y materiales

- Formol bufferado al 15%.

- Tinción de HE (Servicio realizado por el SENASA, Lima).
- Material de disección.
- Láminas cubreobjetos y portaobjetos.
- Frascos plásticos de 100 ml.
- Algodón.
- Gasa.

3.3.2.2) Equipos de laboratorio

- Microscopio trinocular con luz incorporada (Carl Zeiss, Alemania).
- Software de medición ZEN 2012 SP1 (Blue edition, Carl Zeiss, Alemania).
- Cámara digital AxionCam ERc5s (Carl Zeiss, Alemania).

3.4) Metodología

3.4.1) Animales y muestras

En el presente estudio se utilizaron 41 alpacas de 3- 5 años de edad clínicamente sanas, para lo cual se evaluó el comportamiento, condición y peso corporal, constantes fisiológicas, examen físico y signos e historias clínicas, provenientes del matadero Municipal de Huancavelica en la Provincia de Huancavelica. La sangre fue obtenida mediante punción de la vena yugular (5 ml) ante-mortem teniendo en cuenta los lineamientos de bienestar animal (GECS, 2012). La sangre fue colocada en tubos sin anticoagulante para venipunción, inmediatamente se centrifugaron las muestras a 3000 rpm por 15 minutos, en una centrifuga automática (GEMMY, Taiwán) para la separación del suero, el que se almacenó a -196°C en tanque de nitrógeno líquido (GEMMY, Taiwán) para su posterior procesamiento (Díaz *et al.*, 2015).

3.4.1.1) Toma de muestra para el estudio Histológico

Las muestras de tejido cardíaco fueron obtenidas postmortem de los ventrículos derecho, izquierdo y ápice cardíaco, se seccionaron porciones de miocardio de 1-1,5 cm^2 los que se conservaron en frascos plásticos que contenían formol bufferado al 10%, el cual tiene la propiedad de además de mantener estable la estructura de los tejidos, este conserva mejor sus determinantes bioquímicos y propiedades antigénicas de superficie celular (Santana *et al.*, 2003).

Estas muestras se remitieron al Laboratorio de Patología del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) para su posterior procesamiento histológico, siguiendo los pasos:

- Reducción y Lavado
- Deshidratación y parafinado
- Inclusión en parafina
- Corte de las muestras en el micrótopo a un grosor aproximado de 7 – 10 micras
- Tinción de Hematoxilina - Eosina.

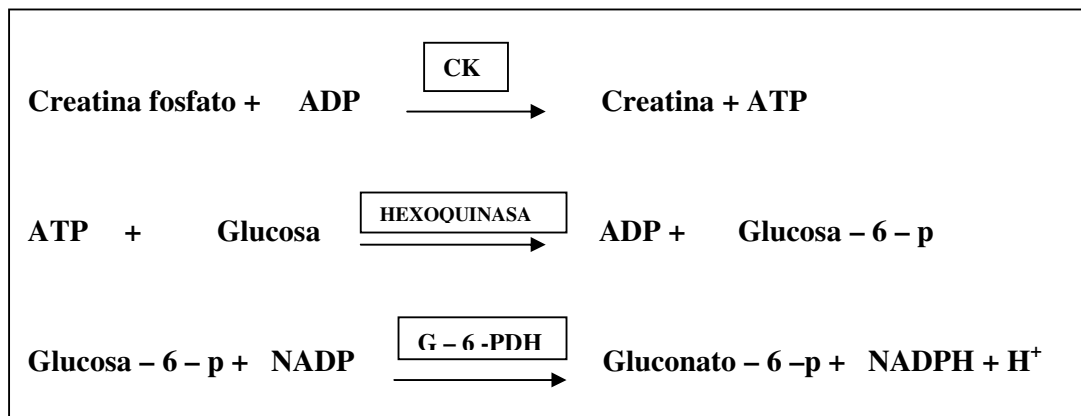
3.5) Procedimiento

3.5.1) Determinación de la enzima CK - MB

Mediante análisis bioquímico sérico de alpacas se determinó los niveles de las enzimas Creatina fosfokinasa-MB (CK-MB) (Valtek, Chile). Se utilizó el método de inmunoinhibición (activado por N-acetilcisteína), para la determinación cuantitativa de la actividad de la isoenzima MB de la Creatina fosfokinasa.

3.5.1.1) Fundamento

Basado en el siguiente esquema de reacción



En el esquema de reacción interviene la N-acetilcisteína (NAC) como activador de la Creatina fosfokinasa, recomendado por la I.F.C.C.

El método VALTEK® se basa en la medición de la actividad de la CK en presencia de un anticuerpo dirigido contra el monómero M. Este anticuerpo inhibe totalmente la isoenzima CK-MM, y la mitad de la actividad de la forma CK-MB, sin

afectar la actividad del monómero B de las isoenzimas MB y BB. Dado que la isoenzima CK-BB no se encuentra normalmente en la sangre, la determinación de la actividad del monómero B es prácticamente específica para la forma MB.

3.5.1.2) Condiciones de reacción

- Longitud de Onda: 340 nm.
- Temperatura de reacción: 37°C.
- Tiempo de reacción: 5 minutos.
- Volúmenes de muestra y reactivos: 50 µl muestra + 1 ml de sustrato reconstituido.

Procedimiento: De acuerdo al manual del Kit CK – MB (NAC). Método de inmunoinhibición (activado por N-acetilcisteína), para la determinación cuantitativa de la actividad de la isoenzima MB de la Creatín Quinasa (VALTEK®, Chile).

3.5.2) Determinación de la enzima LDH

Para determinar los niveles de LDH se utilizó el Kit comercial LDH- Líquida método cinético UV para la determinación de Lactato Deshidrogenada (LDH) en suero y plasma (FAR Diagnostics).

3.5.2.1) Fundamento

Basado en la siguiente reacción:



Ante la presencia de NADH, el LDH transforma el piruvato en lactato y NAD⁺. La oxidación del NADH en la unidad de tiempo, medida a 340 nm, es proporcional a la concentración de LDH en la muestra.

3.5.2.2) Condiciones de reacción

- Longitud de Onda: 340 nm.
- Temperatura de reacción: 37°C.
- Tiempo de reacción: 3 minutos.
- Volúmenes de muestra y reactivos: 20 µl muestra + 1 ml de reactivo uno. Se incuba 1 minuto y se añade 100 µl del reactivo dos.

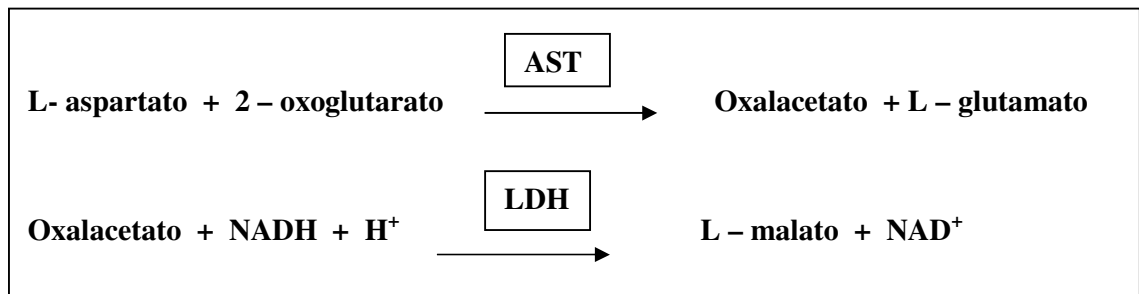
Procedimiento: De acuerdo al manual del Kit LDH Líquida Método Cinético UV (FAR Diagnostics, Italia).

3.5.3) Determinación de la enzima AST/GOT

Para determinar los niveles de AST/GOT se utilizó el Kit comercial AST/GOT Líquido método cinético UV - IFCC para la determinación cuantitativa de Aspartato Amino Transaminasa (AST/GOT) en suero y plasma (FAR Diagnostics).

3.5.3.1) Fundamento

Basado en el siguiente esquema de reacción:



Ante la presencia del α -cetoglutarato, AST/GOT en la muestra transforma el aspartato en oxalacetato y Glutamato. Ante la presencia de NADH y el lactato deshidrogenasa, el oxalacetato se convierte en malato y NAD. La oxidación NADH en unidad de tiempo a 340 nm es proporcional a la concentración AST/GOT en la muestra.

3.5.3.2) Condiciones de reacción

- Longitud de Onda: 340 nm.
- Temperatura de reacción: 37°C.
- Tiempo de reacción: 3 minutos.
- Volúmenes de muestra y reactivos: 100 μ l muestra + 1 ml de reactivo uno. Se incuba 1 minuto y se añade 100 μ l del reactivo dos.

Procedimiento: De acuerdo al manual del Kit AST/GOT Líquido Método Cinético UV - IFCC (FAR Diagnostics, Italia).

3.5.4) Análisis de medición histológica

Las muestras de miocardio fueron procesadas en parafina y teñidas con Hematoxilina-Eosina (HE). Los microquistes de *Sarcocystis lamacanis* se observaron

por microscopía óptica con un objetivo a 4X (Primo Star Carl Zeiss, Alemania), y mediante una cámara digital incorporada AxionCam ERc5s (Carl Zeiss, Alemania) se obtuvieron fotografías a 4X y se determinó la infección parasitaria determinada por el **número de microquistes en 25 mm² de miocardio (N°Mq)** con el Software de medición ZEN 2012 SP1 Blue edition, Carl Zeiss, Alemania (Rodríguez *et al.*, 2012).

3.6) Análisis de datos

Los valores del análisis bioquímico y del Número de microquistes se presentan como Promedios (Prom) ± Desviación estándar (DE). Los N° Mq fueron agrupados en tres rangos de acuerdo al grado infección 1-10 N°Mq, 11-100 N°Mq y >100 N°Mq, y los resultados de la bioquímica sanguínea se distribuyeron dentro de los tres rangos antes mencionados. Mediante el Coeficiente de Correlación de Pearson se determinó la relación entre el número de microquistes y los niveles de enzimas evaluadas; mientras que, por Análisis de Varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 95% se evaluó la existencia de diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre los tres rangos. El coeficiente de Correlación de Pearson y el Análisis de Varianza (ANOVA) se realizó mediante el paquete estadístico GraphPad Prism versión 6 (GraphPad Software, Inc, 2015).

IV. RESULTADOS

Histología

En el 100 % del estudio histológico de los animales se identificaron microquistes de *S. lamacanis*. Los valores del Número de microquistes se expresaron como promedio \pm desviación estándar. Se determinó para el rango de 0-10, 6.36 ± 3.41 ; para 11-100, 41.01 ± 19.82 y para >100 , 130.31 ± 27.99 microquistes en 25mm^2 de miocardio (Figura 1).

Bioquímica Sanguínea

La bioquímica sanguínea para CK-MB, AST/GOT y LDH no mostraron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) al compararlos entre los rangos de agrupación por ANOVA. De acuerdo al orden creciente de los rangos (0-10; 11-100 y >100) se determinaron en sangre para CK-MB (UI/L) 29.19 ± 8.34 , 30.41 ± 8.93 y 32.93 ± 12.45 ; para AST/GOT (UI/L) 260.52 ± 59.79 , 243.44 ± 48.31 y 253.00 ± 37.79 ; y para LDH (UI/L) 937.41 ± 209.52 , 965.78 ± 162.15 y 966.46 ± 125.33 (Figuras 2, 3 y 4).

El cuadro N° 1 muestra el coeficiente de correlación entre el Número de microquistes y los valores de las enzimas CK-MB, AST/GOT y LDH. Se puede observar que la correlación es muy baja para el caso de CK-MB y para el resto de enzimas casi nula o hasta negativa.

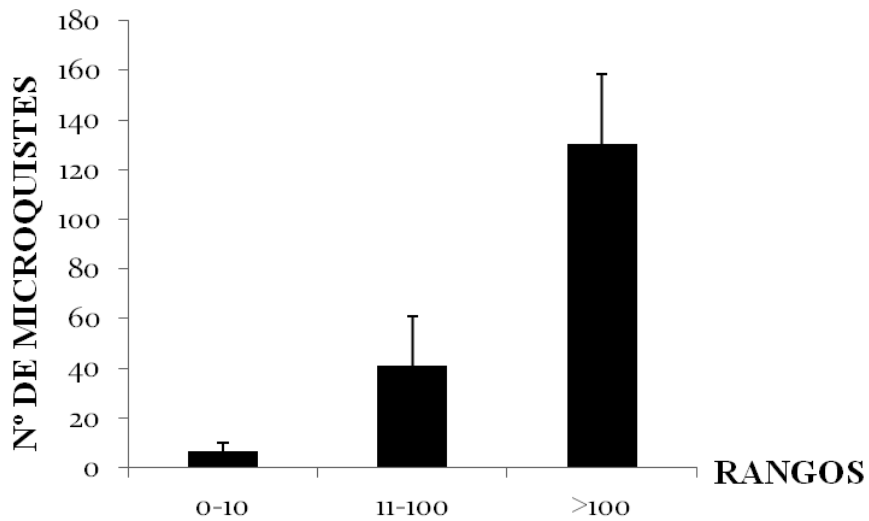


Figura N° 1. Prom±DE del N° Microquistes de *S. lamacanis*. No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$), entre los rangos.

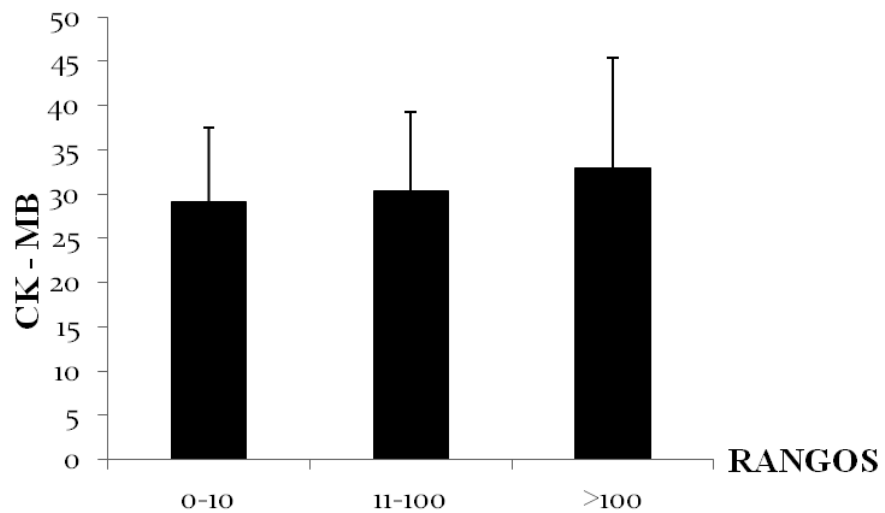


Figura N° 2. Prom±DE de los niveles de CK-MB (UI/L) en sangre de alpacas positivas a *S. lamacanis* en tejido cardíaco. No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$), entre los rangos.

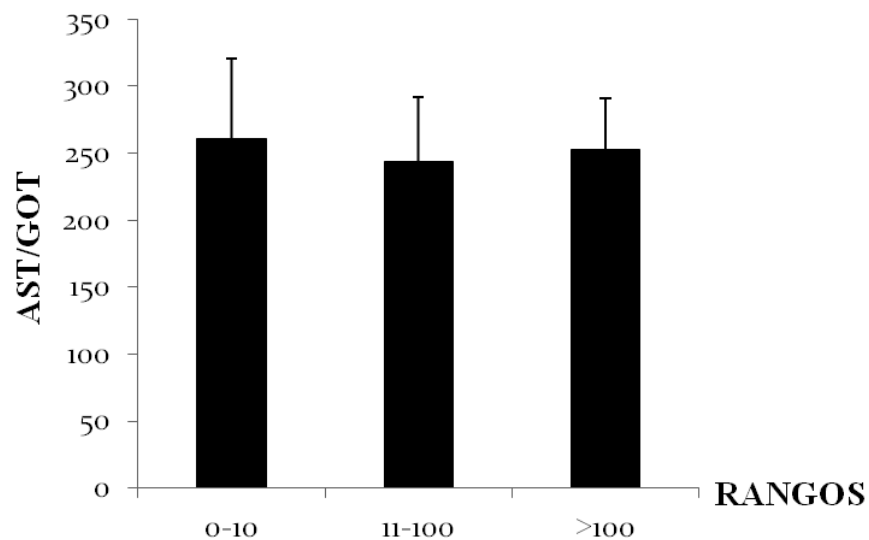


Figura N° 3. Prom±DE de los niveles de AST/GOT (UI/L) en sangre de alpacas positivas a *S. lamacanis* en tejido cardíaco. No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$), entre los rangos.

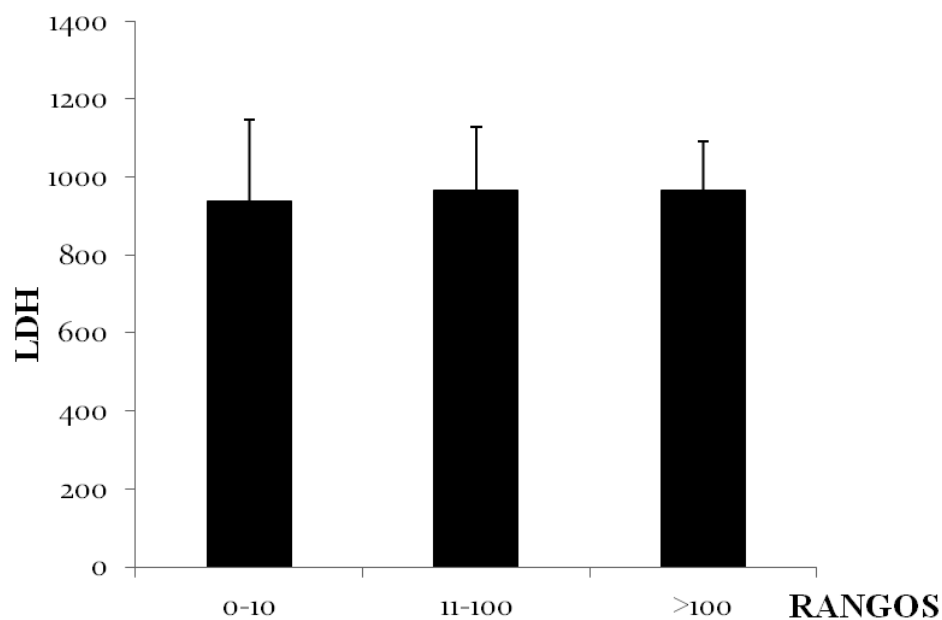


Figura N° 4. Prom±DE de los niveles de LDH (UI/L) en sangre de alpacas positivas a *S. lamacanis* en tejido cardíaco. No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$), entre los rangos.

Cuadro N° 1. Coeficiente de Correlación entre el N° de microquistes de *S. lamacanis* y los niveles de CK-MB, AST/GOT y LDH.

N° microquistes	CK-MB				AST/GOT				LDH			
	Total	0-10	11-100	>100	Total	0-10	11-100	>100	Total	0-10	11-100	>100
Total	0.17				0.04				0.06			
0-10		-0.15				-0.52				-0.55		
11-100			0.19				0.08				0.06	
>100				0.07				0.05				0.30

Cuadro N° 2. Valores mínimos y máximos del N° de microquistes de *S. lamacanis*, CK-MB, AST/GOT y LDH dentro de los rangos de agrupación.

	Rangos de agrupación		
	0-10	11-100	>100
<i>N° microquistes</i>	1.1 - 10.3	12.5 - 84.6	100.5 - 170.5
<i>CK-MB (UI/L)</i>	17.9 - 41.4	13.9 - 46.9	22.1 - 56.6
<i>AST/GOT (UI/L)</i>	173.1 - 329.8	151.3 - 363.6	200.6 - 238.2
<i>LDH (UI/L)</i>	828.5 - 658.4	455.6 - 1212.2	790.2 - 1144.3

V. DISCUSIÓN

El presente estudio es el primero en documentar sobre la correlación que podría existir entre la presencia de microquistes de *Sarcocystis lamacanis* y los niveles séricos de las enzimas CK-MB, LDH y AST en alpacas. Además se ha reportado que las concentraciones de CK-MB tienen 88.2 % de sensibilidad y 93.2 % de especificidad como biomarcador cardíaco (Alpert y Thygesen 2000; Jaffe *et al.*, 2010). Para tal motivo fue necesario obtener los valores de estadística descriptiva principalmente la media y desviación estándar.

Bogin (2000), midió enzimas cardíacas en camélidos cuyos resultados se expresan en el promedio y desviación estándar para cada enzima: En camellos CK – MB (88 ± 37 UI/L), AST (105 ± 17 UI/L) y LDH (392 ± 64 UI/L). En alpacas CK – MB (41 ± 30 UI/L), AST (292 ± 50 UI/L) y LDH (320 ± 116 UI/L).

En el presente trabajo los niveles de CK-MB en alpacas adultas de 3 - 5 años de edad con presencia de microquistes de *S. lamacanis* van de 17.9- 41.4 UI/L (Cuadro 2) y están por debajo de los valores hallados en el estudio realizado por Tharwat *et al.* (2013a) determinaron que en camellos adultos sanos de Arabia Saudita el valor de CK - MB promedio fue de 139 ± 22 UI/L; mientras que en camellos de tiro sometidos a estrés de transporte los valores obtenidos fueron de 320 ± 170 UI/L. Las enzimas AST y CK podrían ser consideradas económicas al momento de usarlas como marcadores de daño cardíaco. Por su parte, AST presentó valores promedio de 80 ± 17 UI/L en

animales control, y se notó un incremento en animales sometidos a estrés de transporte cuyo valor fue de 92 ± 17 UI/L.

Los valores séricos pueden variar dependiendo de la metodología que se emplee en el laboratorio (Santaló *et al.*, 2003). Es por esto que se recomienda establecer, en cada laboratorio, sus propios rangos referenciales (Sodikoff, 1996). Por ello, en esta investigación se presenta valiosa información de valores referenciales séricos, de estas enzimas, en alpacas adultas aparentemente normales. Pero, teniendo en cuenta que por la cantidad de animales estudiados, estos valores resultan ser no significativos estadísticamente.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que los niveles de marcadores cardíacos se mantiene relativamente constantes a pesar del aumento del número de microquistes por *Sarcocystis lamacanis* en corazón. No se pudo demostrar que a mayor grado de infección cardíaca haya mayores niveles de AST, LDH y especialmente en CK-MB (Cuadro 1 y Figura 2) a pesar de ser la más sensible de las tres usadas en nuestro estudio, y ser la específica para daño cardiomiocárdico, pues se describe que hay tres isoformas de creatinina fosfoquinasa: BB, MM y MB. El músculo esquelético contiene primariamente la isoforma MM con trazas de MB (estimado en 1-4 % de la actividad CK) y el músculo cardíaco contiene primariamente la isoforma MB pero con altas cantidades de MB (estimado en 20 % de la actividad CK) (Henderson *et al.*, 2001).

En humanos, la principal isoforma en suero es la MM, mientras que la MB, es de baja actividad. La presencia de valores incrementados de CK - MB en sangre puede estar relacionada a numerosos factores, que estén supeditados al daño del miocardio. Sin embargo, un estudio publicado recientemente, evidencia que camellos envenenados con narasina mostraron daños miocárdicos en la histopatología pero los valores de CK - MB no se incrementaron (Hassen *et al.*, 2012).

Son pocos los estudios que reportan la correlación entre la cantidad de microquistes de *Sarcocystis lamacanis* en músculo cardíaco y los niveles de biomarcadores cardíacos. Un estudio en ratas, las cuales fueron infectadas oralmente con huevos de *T. canis*, se evidenció los cambios producidos en la bioquímica sérica para CK - MB la cual se elevó a 674 UI/L cuando el rango de animales no infectados va

de 385-605 UI/L, mientras que LDH se encontró dentro de los valores normales (1473-2401 UI/L) (Braga *et al.*, 2012).

Fredericks *et al.* (2001) determinaron la concentración de CK - MB (UI/L) directamente de tejido cardíaco en diferentes especies de uso común en laboratorio y halló en perro 1.3 ± 0.19 , humano 10.3, mono 1.2 ± 0.93 , cerdo 0.6 ± 0.07 y rata 2.5 ± 1.31 .

Para el presente estudio se utilizaron 45 alpacas machos de 3-5 años de edad y los valores encontrados son similares a los obtenidos en estudios previos por Pourjafar *et al.*, 2013, donde se determinó en dromedarios de diferentes edades los niveles de las tres enzimas estudiadas evaluadas en este estudio, siendo estos en dromedarios de 1-3 años de edad: AST, 101.57 ± 14.38 (UI/L); CK - MB, 225.06 ± 109.40 (UI/L); LDH, 2833.49 ± 748.05 (UI/L). Por su parte en los animales de 4 a 6 años de edad: AST, 72.42 ± 24.37 (UI/L); CK - MB, 250.16 ± 62.61 (UI/L) y LDH, 1714.44 ± 887.57 (UI/L).

El análisis bioquímico sérico puede con frecuencia proveer información valiosa sobre la función cardíaca y enfermedad en los animales (Coodley, 1970). Cuando hay daño en el miocardio, los niveles de enzimas tales como CK - MB (Kaneko, 1980), LDH (Reinaldo *et al.*, 2010), AST, ALT (Coodley, 1970), homocisteína (Ciaccio *et al.*, 2008) y Troponina I (cTnI) (Radostits *et al.*, 2007) se encuentran elevadas en suero.

Başbuğan *et al.* (2010) desarrollaron un trabajo donde obtuvieron valores de enzimas relacionadas a daño cardíaco en 8 bovinos, 10 ovejas y 10 cabras mayores de 12 meses de edad y clínicamente saludables, en el cual se determinaron los niveles de CK - MB: 21.3 ± 1.25 (UI/L), 21.60 ± 1.40 (UI/L) y 27.8 ± 2.55 (UI/L); AST: 56.00 ± 6.53 (UI/L), 67.60 ± 2.4 (UI/L) y 58.00 ± 2.7 (UI/L) y LDH: 958.5 ± 63.5 (UI/L), 386.9 ± 25.4 (UI/L) y 267.1 ± 19.2 (UI/L), en orden respectivo para cada especie antes mencionada.

En humanos, la función de las enzimas cardiacas no se limita a la detección prematura de un infarto agudo de miocardio (IAM), sino que también se propugna su uso para estimar el tamaño del IAM (Santaló, 2003). En medicina veterinaria la ocurrencia de un infarto de miocardio e incluso isquemia agudo miocárdial es raramente detectada. Sin embargo, hay evidencia de la existencia de isquemia miocárdial ocurrido en falla cardíaca congestiva (Wyatt *et al.*, 1998).

VI. CONCLUSIONES

- La correlación entre el número de microquistes y los niveles de CK-MB, AST y LDH fueron muy bajas en alpacas infectadas con microquistes de *S. lamacanis*, por lo que las enzimas evaluadas no serían de utilidad como predictores de daño cardíaco por infección de *S. lamacanis*.
- En comparación con los valores referenciales de otros estudios, se observó que la actividad de las enzimas CK- MB y AST/GOT mantuvieron sus valores, a diferencia de la enzima LDH que se incrementó en las alpacas con microquistes de *S. lamacanis*.

VII. LITERATURA CITADA

1. **[CEPIS] Programa de Control de Calidad y Desarrollo de Laboratorios. 1995.** Manual de Calibración, control y buen uso de equipos de laboratorio. Lima: OPS. 130 p.
2. **Abbas SA, Glazier JJ, Wu AH, Dupont C, Green SF, Pearsall LA, Waters DD, McKay RG. 1996.** Factors associated with the release of cardiac troponin T following percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Clin Cardiol* 19 (10):782–786.
3. **Adams JE 3rd. 1997.** Utility of cardiac troponins in patients with suspected cardiac trauma or after cardiac surgery. *Clin Lab Med* 17 (4): 613–623.
4. **Alpert J, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. 2000.** Myocardial infarction redefined – a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Eur Heart* 36 (3):959–969.
5. **Alpert JS, Thygesen KE. 2000.** For the joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. Myocardial infarction redefined: a consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the Redefinition of Myocardial Infarction. *J Eur Heart*. 21:1502-1513.
6. **Amador E, Dorfman LE, Wacker WE. 1963.** Serum Lactic Dehydrogenase Activity: An Analytical Assessment of Current Assays. *Clin Chem* 12: 391 – 399.

7. **Arness MK, Brown JD, Dubey JP, Neafie RC, Granstrom DE. 1999.** An outbreak of acute eosinophilic myositis due to human *Sarcocystis* parasitism. *Am J Trop Med Hyg* 1:548–553.
8. **Balogh N, Gaál T, Ribiczeyné PS, Petri A.2001.** Biochemical and antioxidant changes in plasma and erythrocytes of pentathlon horses before and after exercise. *Vet Clin Pathol* 30(4):214 – 218.
9. **Barriga; O. 2002.** Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América latina. Editorial Germinal. Santiago.194 -195 p.
10. **Başbuğan Y, Ağaoğlu Z, Yüksek N. 2010.** An Investigation on Serum Troponin Concentration in Healthy Ruminants. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* .16 (4): 641-645.
11. **Beaver PC, Gadgil RK, Morera P. 1979.** *Sarcocystis* in man: a review and report of five cases. *Am J Trop Med Hyg* 28: 819–844.
12. **Beck W, Pantchev N. 2010.** Zoonosis parasitarias. Zaragoza: SERVET. 208 p.
13. **Berger L. 1993.** Sigma diagnostics: pioneer of kits for clinical chemistry. *Clin Chem*. 39: 902 – 903.
14. **Bertrand ME, Simoons ML, Fox KA , Wallentin LC, Hamm CW, McFadden E, De Feyter PJ, Specchia G, Ruzyllo W. 2002.** Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *J Eur Heart* 23:1809–1840.
15. **Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ. 1946.** A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic milliliters of serum. *J Biol Chem* 164: 321 – 329.
16. **Bessman SP, Carpenter CL. 1985.** The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem* 54: 831-862.
17. **Bishop ML, Duben – Engelkirk JL. 1992.** Fody E.P. *Clinical Chemistry: Principles, procedures, correlations.* 2^{da} ed. Philadelphia: Editorial Lippin Cott Co. 281 p.
18. **Blythe LL, Granstrom DE, Hansen DE, Walker LL, Bartlett J, Stamper S. 1997.** Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in Oregon. *J Am Vet Med Assoc* 210:525-527.
19. **Bogin.2000.** Clinical pathology of Camelides: present and future. *Revue Med Vet* 151 (7): 563- 568 p.

20. **Bowman D. 2004.** Parasitología para veterinarios. 8va ed. Madrid: Elsevier. 480 p.
21. **Boyd JW. 1988.** Serum enzymes in the diagnosis of disease in man and animals. *J Comp Pathol* 98 (4):381–404.
22. **Boyd JW.1983.** The mechanisms relating to increases in plasma enzymes and isoenzymes in disease of animals. *Vet Clin Path* 12: 9 – 24.
23. **Braga C, de Bastos S, Nogueira A, Rubinsky-Elefant G, Giuffrida G, Barili R, Vamilton V. 2012.** Cardiac markers: profile in rats experimentally infected with *Toxocara canis* *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21(3): 291-293.
24. **Braun SL, Pongratz DE, Bialk P, Liem S, Schlotter B, Vogt W. 1996.** Discrepant results for cardiac troponin T and troponin I in chronic myopathy, depending on instrument and assay generation. *Clin Chem* 42 (12): 2039–2041.
25. **Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, Jones RH, Kereiakes D, Kupersmith J, Levin TN, Pepine CJ, Schaeffer JW, Smith EE 3rd, Steward DE, Theroux P, Gibbons RJ, Alpert JS, Eagle KA, Faxon DP, Fuster V, Gardner TJ, Gregoratos G, Russell RO, Smith SC Jr. 2000.** ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients with Unstable Angina and Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: a Report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (Committee on the management of patients with unstable angina). *J Am Coll Cardiol* 36:970–1062.
26. **Bush BM. 1991.** Interpretation of laboratory results for small animal clinicians. Oxford: Blackwell Scientific .515 p.
27. **Buxton D. 1998.** Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis spp.*) in sheep and goats: recent advances. *Vet Res* 29: 289-310.
28. **Cardinet III GH.1997.** Skeletal Muscle Function. En: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5th ed. San Diego: Academic Press. 353 – 366 p.
29. **Carrió I, Estorch M, López-Pousa A. 1996.** Assessing anthracycline cardiotoxicity in the 1990s. *J Eur Nucl Med* 23 (4):359–364.
30. **Censo Agropecuario del Estado Plurinacional de Bolivia. 2013.** Bolivia: Instituto Nacional de Estadística de Bolivia. [Internet], [15 de septiembre 2014].

Disponible en:<http://ibce.org.bo/images/publicaciones/Censo-Nacional-Agropecuario-2013.pdf>.

31. **Chapelle JP.** Diagnóstico Bioquímico del infarto de miocardio. En: Sastre FG, eds. Bioquímica Clínica. Barcelona: Barcanova. 235 – 256 p.
32. **Ciaccio M, Bivona G, Bellia C. 2008.** Therapeutical approach to plasma homocysteine and cardiovascular risk reduction. *Ther Clin Risk Manag.*4: 219-224.
33. **Concha, S. 1999.** Strategical plan of communication in marketing for the open consumption of alpaca's meat in Arequipa-Perú. En: Progress in South American Camelids Research. Göttingen, Germany: The European Association for Animal Production.
34. **Connors, K. 1980.** Espectroscopía de absorción. En: Curso de análisis farmacéutico (ensayo del medicamento). 2º ed. España: Editorial Reverté S. A. 195- 255 p.
35. **Coodley EL. 1970.** Diagnostic Enzymology. 3ª ed. USA: W.B. Saunders Co. Philadelphia. 323 p.
36. **Cordero del Campillo M. 2000.** Parasitología Veterinaria.1ª ed. Madrid: McGraw-Hil Interamericana. 935 p.
37. **Corner AH, Mitchell D, Meads EB, Taylor PA. 1963.** Dalmeny disease an infection of cattle presumed to be caused by an unidentified protozoon. *Can Vet J* 4(10): 252-264.
38. **Cremonesi P.2002.** L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome, 2ª ed. Italia: Il Prato Casa Editrice. 15 p.
39. **Croft JC. 1994.** Nonamebic protozoal enteridites. En: Hoeplich PD, Jordan MC, Ronald AR, eds. Infectious processes. 5ª ed. Filadelfia: Lippincott. 769-774 p.
40. **De Los Ríos E. 2006.** Producción textil de fibras de camélidos sudamericanos en el área altoandina de Bolivia, Ecuador y Perú. Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (UNIDO). [Internet], [26 de septiembre 2007]. Disponible en: https://www.unido.org/filestorage/download/file_id=58563.
41. **Devlin T. 1991.** Bioquímica, libro de texto con aplicaciones clínicas, tomo I y II. 2º Edición. Edit. Reverté S.A. 1298 p.

42. **Díaz H, Espinoza J, Huanca W, Lopez – Torres B, Rodríguez J. 2015.** Características Bioquímicas del Plasma Seminal Fresco y Congelado/Descongelado de Alpaca (*Vicugna pacos*). Rev Inv Vet Perú 26 (1): 43 -48.
43. **Dubey JP, Fayer R. 1983.** Sarcocystosis. Br Vet J 139 (5):371-377.
44. **Dubey JP, Lindsay DS, Saville W, Reed SM, Granstrom DE, Speer CA. 2001.** A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). Vet Parasitol 95: 89–131.
45. **Duma RJ, Siegel AL. 1965.** Serum Creatine Phosphokinase in Acute Myocardial Infarction. Arch Intern Med 115 (4): 443-551.
46. **Elliot BA, Jepson EM, Wilkinson H. 1962.** Serum alpha hydroxybutyrate dehydrogenase: a new test with improved specificity for myocardial lesions. Clin Sci 23: 305-316.
47. **Evans GO. 1991.** Biochemical assessment of cardiac function and damage in animal species. A review of the current approach of the academic, governmental and industrial institutions represented by the Animal Clinical Chemistry Association. J Appl Toxicol 11:15–21.
48. **Fayer R, Dubey JP. 1988.** Sarcocystis-induced abortion and fetal death. Prog Clin Biol Res 281:153-164.
49. **Fayer R. 2004.** Sarcocystis spp. in human infections. Clin Microbiol Rev 17(4): 894–902.
50. **Fischer S, Odening K. 1998.** Characterization of bovine *Sarcocystis* species by analysis of their 18S ribosomal DNA sequences. J Parasitol 84:50–54.
51. **Franz WM, Remppis A, Kandolf R, Kübler W, Katus HA. 1996.** Serum troponin T: diagnostic marker for acute myocarditis. Clin Chem 42 (2):340–1.
52. **Fredericks S, Mertona G, Lerena M, Heining P, Carter N, Holt D. 2001.** Cardiac troponins and creatine kinase content of striated muscle in common laboratory animals. Acta Clin Chem. 304: 65–74.
53. **Fromm RE, Roberts R. 2001.** Sensitivity and specificity of new serum markers for mild cardioneclerosis. Curr Probl Cardiol 26 (4): 241-284.
54. **Ganz WI, Sridhar KS, Ganz SS, Gonzalez R, Chakko S, Serafini A. 1996.** Review of tests for monitoring doxorubicin - induced cardiomyopathy. Oncology 53 (6):461–470.

- 55. García M, Guzman R, Cabezas I, Merino V, Palma C, Perez R. 1999.** Evaluación del entrenamiento tradicional del caballo criollo chileno de rodeo mediante el análisis de variables fisiológicas y bioquímicas sanguíneas. Arch Med Vet 31 (2): 167 – 176.
- 56. Gasbarre LC, Suter P, Fayer R. 1984.** Humoral and cellular immuneresponses in cattle and sheep inoculated with *Sarcocystis*. Am. J. Vet. Res 45:1592-1596.
- 57. Gella J.** Enzimología Clínica.1994. En: Sartre FG eds. Bioquímica Clínica. Barcelona: Barcanova. 113 – 124 p.
- 58. Genser N, Mair J, Talasz H, Puschendorf B, Calzolari C, Larue C, Friedrich G, Moes N, Muehlberger V. 1997.** Cardiac troponin I to diagnose percutaneous transluminal coronary angioplasty - related myocardial injury. Acta Clin Chim 265 (2):207–217.
- 59. Greaves K, Crake T. 1998.** Cardiac troponin T does not increase after electrical cardioversion for atrial fibrillation or atrial flutter. Heart 80 (3):226–228.
- 60. Guerrero, D.; J. Hernandez. 1967.** Ciclo evolutivo del *Sarcocystis*. Segundo Boletín Extraordinario IVITA Nov., Lima 70-71.
- 61. Habeeb YS, Selim MA, Ali MS, Mahmoud LA, Abdel Hadi AM, Shafei A. 1996.** Serological diagnosis of extraintestinal *Sarcocystosis*. J Egypt Soc Parasitol 26 (2):393-400.
- 62. Hamburg RJ, Friedman DL, Perryman MB. 1991.** Metabolic and diagnostic significance of creatine kinase isoenzymes. Trends Cardiovasc Med 1 (5): 195-200.
- 63. Hamm CW, Bertrand M, Braunwald E. 2001.** Acute coronary syndrome without ST elevation: implementation of new guidelines. Lancet 358:1533–1538.
- 64. Hassen AD, Alhaj Ali M, Abbas TA, Omer EA, Al Fihail AM. 2012.** Narasin poisoning in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). Comp Clin Path 22 (3): 305 – 311.
- 65. Heckerroth AR, Tenter AM. 1998.** Comparison of immunological and molecular methods for the diagnosis of infections with pathogenic *Sarcocystis* species in sheep. Tokai J Exp Clin Med 23 (6):293-302.

- 66. Heckerroth AR, Tenter AM. 1999.** Development and validation of species specific nested PCRs for diagnosis of acute sarcocystosis in sheep. *Int. J. Parasitol* 29:1331-1349.
- 67. Henderson AR, Moss DW. 2001.** Enzymes. En: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders. 352-389 p.
- 68. Henderson AR. 1983.** Methods of Enzymatic Analysis: Enzymes. En: Bergmeyer B, Bergmeyer J, Grabl M. *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd ed. Florida: Verlag Chemie, Deerfield Beach 138 – 155 p.
- 69. Hiepe F, Lietzke L, Scheibner G, Jungmann R, Hiepe T, Montag T. 1981.** Untersuchungen zur toxischen Wirkung von Extrakt aus *Sarcocystis ovis*-Macrocysten auf Kaninchen. *Mh Vet Med* 36: 908-910.
- 70. Hinz E. 1991.** Current status of food-borne parasitic zoonoses in West Germany. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 22 Suppl: 78-84.
- 71. Holmdahl OJM, Morrison D, Ellis J, Huong LT. 1999.** Evolution of ruminant *Sarcocystis* (Sporozoa) Parasites based on small subunit rDNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12 (1):27–37.
- 72. Iñiguez L, Alem R. 1996.** Role of camelids as means of transportation and exchange in the Andean region of Bolivia. *World Animal Review* 86: 12–21.
- 73. Jaffe AS, Apple FS, Morrow DA, Lindahl B, Katus B. 2010.** Being Rational about precision: A Statement from the Biochemistry Subcommittee of the Joint European Society of Cardiology/ American College of Cardiology Foundation/American Heart Association/World Heart Federation Task Force for the Definition of Myocardial Infarction. *Clin Chem*. 56:941-943.
- 74. Jaffe AS, Ravkilde J, Roberts R, Naslund U, Apple FS, Galvani M, Katus H. 2000.** It's time for a change to a Troponin Standard. *Circulation* 102: 1216-1220.
- 75. Jockers-Wretou E, Pfeleiderer G. 1975.** Quantitation of creatine kinase isoenzymes in human tissues and sera by an immunological method. *Acta Clin Chim* 58 (3): 223-232.
- 76. Kan SP, Pathmanathan R. 1991.** Review of sarcocystosis in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 22: 129-34.

77. **Kaneko JJ. 1980.** Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 3^{ra} ed. USA: Academic Press, INC New York. 832 p.
78. **Katritsis D, Hossein-Nia M, Anastasakis A, Poloniecki I, Holt DW, Camm AJ, Ward DE, Rowland E. 1997.** Use of troponin-T concentration and kinase isoforms for quantitation of myocardial injury induced by radiofrequency catheter ablation. *J Eur Heart* 18 (6):1007–13.
79. **Kerr MG. 1989.** Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Biochemistry and Haematology. 2nd edition .Oxford: Blackwell Scientific.135 p.
80. **Klein SC, Haas RC, Perryman MB, Billadello JJ, Strauss AW. 1991.** Regulatory element analysis and structural characterization of the human sarcomeric mitochondrial creatine kinase gene. *J Biol Chem* 266 (27): 18058-18065.
81. **La Perle K, Silveria F, Anderson DE, Blomme E. 1999.** Dalmeny disease in an alpaca (*Lama pacos*): Sarcocystosis, eosinophilic myositis and abortion. *J. Comp. Path* 121: 287– 293.
82. **Laslett L, Eisenbud E, Lind R. 1996.** Evidence of Myocardial Injury during Prolonged Strenuous Exercise. *J Am Cardiol* 78: 488–490.
83. **Lauer B, Niederau C, Kühl U, Schannwell M, Pauschinger M, Strauer BE, Schultheiss HP. 1997.** Cardiac troponin T in patients with clinically suspected myocarditis. *J Am Coll Cardiol* 30 (5):1354–1359.
84. **Lavomne A, Hue G. 1998.** Serum Cardiac Troponin I and T in Early Posttraumatic Rhabdomyolysis. *Clin Chem* 44 (3):667–668.
85. **Leguía G, E Casas. 1999.** Enfermedades parasitarias y atlas parasitológico de camélidos sudamericanos. Editorial de Mar. Lima. p 23 -30.
86. **Leguía G, Guerrero C, Sam R, Chávez A. 1989.** Infección experimental de perros y gatos con micro y macroquistes de sarcocystis de alpacas (*Lama pacos*). *Rev Inv Vet Perú* 5(3):10-13.
87. **Leguía G. 2003.** Infección experimental en primates no humanos (*Saimiri boliviensis*) y voluntarios humanos con micro y macroquistes de *Sarcocystis* de alpacas. *Rev Acad Peru Cienc Vet* 4(1): 11-15.
88. **Leguía, G.; N. Clavo. 1989.** Sarcocistosis o «triquina». Boletín Técnico N° 7 - CICCOS UNMSM CI IVITA Agosto - Lima - Perú. p 5- 19.

- 89. Lehninger A, Nelson D, Cox M. 2006.** Principios de Bioquímica. 4^{ta} Ed. Barcelona: Ed. Omega. 190 p.
- 90. Lehninger A. 1987.** Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular. 2^o edición. Edit. Omega, S.A. Barcelona-España. 1117 p.
- 91. Lindsay D, Blagburn BL, Braund KG. 1995.** Sarcocystis spp. and sarcocystosis. BAM 5(3): 249-254.
- 92. Lott JA, Nemesanszky E. 1996.** Creatine kinase. En: Lott JA, Wolf PL, eds. *Clinical Enzymology: a Case orientated Approach*. New York: Field and Rich/Yearbook 166 p.
- 93. Lucas J. 2012.** Sarcocistosis en el Perú. Peruv J parasitol 20 (2): 64 -73.
- 94. Markus MB. 1978.** Sarcocystis and sarcocystosis in domestic animals and man. Adv Vet Sci Comp Med 22: 159-193.
- 95. Martínez, H.; F. Faulin. 2001.** Bioestadística Amigable. Madrid - España: Edit. Díaz Santos. 210 – 275 p
- 96. Maynard SJ, Mentown IBA, Adgey AA. 2000.** Troponin T or troponin I as cardiac markers in ischaemic heart disease. Heart 83: 371-373.
- 97. Mehlhorn H, Plekarski G. 1993.** Fundamentos de Parasitología, Parásitos del Hombre y de los Animales Domésticos. 3^a ed. España: Ed. Acribia Zaragoza. p 72-78.
- 98. Méndez MC. 2001.** intoxicação crônica por Cobre. En: Riet – Correa F, Schild AL, Mendez MC, Lemos RA, eds. Doenças de Ruminantes e Equinos. 2^a ed. São Paulo: Varela. p 181-186.
- 99. Mensa J, Gatell JM, García JE. 2013.** Guía de terapéutica antimicrobiana. 23^a ed. Barcelona: Ediciones Escofet Zamora, S.L. 764 p.
- 100. Mercer DW. 1997.** Role of cardiac markers in evaluation of suspected myocardial infarction. Selecting the most clinically useful indicators. Postgrad Med 102 (5): 113-122.
- 101. Meyer D, Harvey J. 1998.** Veterinary Laboratory Medicine, Interpretation and Diagnosis. 2^o ed. Philadelphia: Edit. WB. Saunders Company. 373 p.
- 102. MINAG. 2007.** Ministerio de Agricultura – MINAG. Dirección de Información Agraria. Dirección Regionales Agrarias.
- 103. Ministerio de Agricultura. 1973.** Estudios de la evaluación de problemas de carnes en el Perú. Tomo V. Lima, Perú.

- 104. Murray R, Granner D, Mayes P, Rodwell V. 2001.** Bioquímica de Harper. 15° Ed. México D.F.: Edit. El Manual Moderno. 90 – 837 p.
- 105. Nazifi S, Rezakhani A, Badran M. 1997.** Evaluation of hematological, serum biochemical and cerebrospinal fluid parameters in experimental bacterial meningitis in the calf. *Zentralbl VeterinarmedA* 44(1): 55 – 63.
- 106. Nichpanit S, Nak W, Wongsaroj T, Nithikathkul C. 2010.** First Large Scale of Human *Sarcocystis hominis* in Thailand. *Trends Research in Science and Technology* 2 (1): 1-5.
- 107. Perez R, García M, Cabezas I, Guzmán R, Merino V, Valenzuela S, Gonzalez C. 1997.** Actividad Física y cambios cardiovasculares y bioquímicos del caballo Chileno a la competencia de rodeo. *Arch med vet* 29 (2): 221 – 234.
- 108. Portillo JD, Fernández del Barrio MT, Salido FP. 1997.** Aspectos Básicos de Bioquímica Clínica. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, S.A. 101 p.
- 109. Pourjafar M, Chalmeh A, Badiei Kh, Nazifi S, Keshavarz S, Naghib M. 2013.** Correlations among homocysteine, cardiac troponin I and cardiac enzymes in different ages of clinically healthy male dromedary camels. *IJVM*. 7(3): 201-206.
- 110. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. 2007.** Diseases of the cardiovascular system. In: *Veterinary Medicine: A Text Book of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*. 10^{ma} ed. USA: Elsevier - Philadelphia. p 399-438.
- 111. Rajappa M, Sharma A. 2005.** Biomarkers of cardiac injury: an update. *Angiology* 56: 677-691.
- 112. Reinaldo AB, Carlos HJP, Kaio FV, Antonio JS, Leonardo RS, Rui C. 2010.** Effect of shortterm creatine supplementation on markers of skeletal muscle damage after strenuous contractile activity. *J Eur Appl Physiol*. 108: 945-955.
- 113. Reitman S, Frankel S. 1957.** A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic trans aminases. *Am J Clin Path* 28: 56 – 63.
- 114. Rej R. 1998.** They use enzymes for everything. *Clin Chem* 44: 1149 – 1153 p.
- 115. Remme WJ, Swedberg K. 2001.** Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *J Eur Heart* 22:1527–1560.

- 116. Rodríguez J, Cueva S, Vásquez M, Lira B, Olivera L, Espinoza J. 2012.** Desarrollo postnatal del páncreas endocrino de cuyes (*Cavia porcellus*) lactantes. Rev Inv Vet Perú 23 (1): 13 – 19.
- 117. Rojas M. 2004.** Nosoparasitosis en los rumiantes domésticos peruanos. 2ª ed. Lima: Martegraf. 146 p.
- 118. Roque E. 2002.** “Un nuevo concepto en la insuficiencia cardíaca: Troponinas cardíacas y daño miocardio”. Rev Med Nordeste 2:13-24.
- 119. Rosenfeld L. 1999.** Four Centuries of Clinical Chemistry. Gordon and Breach Science, Hawthorn, Australia. 465 – 503 p.
- 120. Santaló M, Guindo J; Ordoñez J. 2003.** “Marcadores biológicos de necrosis miocárdica”. Rev. Esp Cardiol 56(7):703-720.
- 121. Santana VL, Alves LC, Souto – Maior MP, Faustino MA, De Lima MM. 2003.** Ocorrência de Sarcocystis (Lankester, 1882) na musculatura cardíaca de bovinos comercializados em feiras livres do município de São Lourenço da Mata – Pernambuco – Brasil. R Bras Ci Vet 10 (1): 39 – 41 p.
- 122. Scheffer, J.; F. Gonzáles. 2004.** Enzimología Clínica en Medicina Veterinaria. Universidad Nacional de Río Grande del Sur, Puerto Alegre: 11-14 p.
- 123. Sénaud J, Vendrely R, Tronche P. 1968.** Sur la nature de la substance toxique des Kistes de Sarcosporidies du mouton (Toxoplasmea) active sur le lapin. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D 266 (11): 1137-1138.
- 124. Siegel AJ, Sholar M, Yang J, Dhanak E, Lewandrowski KB. 1997.** Elevated serum cardiac markers in asymptomatic marathon runners after competition: is the myocardium stunned? Cardiology 88(6): 487– 491.
- 125. Sitio Web Criterios de Bienestar Animal para el Manejo de Camélidos Silvestres Sudamericanos.2012.** Lima: Grupo Especialista en Camélidos Sudamericanos (GECS). [Internet], [12 agosto 2015]. Disponible en: <http://infoalpacas.com.pe/criterios-de-bienestar-animal-para-el-manejo-de-camelidos-silvestres-sudamericanos/>.
- 126. Sodikoff C. 1996.** Pruebas diagnósticas y de laboratorio en las enfermedades de pequeños animales. 2º ed. Madrid, España: Mosby-Doyma Libros S. A. 1 – 37 p.
- 127. Stryer, L. 1995.** Bioquímica. 4ª Ed. Barcelona: Edit. Reverté, S.A. Tomo I y II. 1008 p.

- 128. Tadich N, Mendez G, Wittwer F, Meyer K.1997.** Valores bioquímicos sanguíneos de equinos que tiran carretones en la ciudad de Valdivia (Chile). Arch med vet 29 (1): 45 – 61.
- 129. Tenter AM. 1995.** Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. Int J Parasitol 25(11):1311–30.
- 130. Tharwat M, Al-Sobayil F, Buczinski S. 2013a.** Cardiac biomarker changes in camels (*Camelus dromedarius*) secondary to road transportation 2013. Journal of Veterinary Cardiology 15: 15-22.
- 131. Tharwat M, Al-Sobayil F, Buczinski S. 2013b.** Effect of racing on the serum concentrations of cardiac troponin I and creatine kinase myocardial band in racing camels (*Camelus dromedarius*). J Vet Res Commun. 37:139–144.
- 132. Thomas V, Dissanaiké AS. 1978.** Antibodies to *Sarcocystis* in Malaysians. Trans R Soc Trop Med Hyg 72: 303–306.
- 133. UNEPCA (Unidad Ejecutora del Proyecto Camélidos). 1999.** Censo Nacional de llamas y alpacas. Oruro, Bolivia.
- 134. Vaidya HC, Maynard Y, Dietzler DN, Ladenson JH. 1986.** Direct measurement of creatine kinase-MB activity in serum after extraction with a monoclonal antibody specific to the MB isoenzyme. Clin Chem 32 (4): 657-663.
- 135. Webb EC. 1984.** En “enzyme nomenclature 1984: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry on the Nomenclature and Classification of Enzyme – Catalysed Reactions.” New York: Academic Press.
- 136. Willard M, Vesten HT, Turnwald G. 2001.** Diagnóstico Clinicopatológico Práctico en los Pequeños Animales. 3° ed. Buenos Aires – República de Argentina: Edit. Inter-médica. 428 p.
- 137. Wu AHB, Apple FS, Gibler WB, Jesse RL, Warshaw MM, Valdes R Jr. 1999.** National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: Recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery disease. Clin Chem 45 (7): 1104-1121.
- 138. Wyatt K, Labuc R, Wyatt G. 1998.** “Measurement of Creatine Kinase- MB in canine Cardiac Patients”. Asut Vet J 76(12): 826.

- 139. Yasuda J, Teteyama K, Synto B, Too K. 1990.** Lactate dehydrogenase and creatine phosphokinase isoenzymes in tissues of laboratory animals. *J Vet Res* 38:19–29.