

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**“DETERMINACIÓN DEL DAÑO HEPÁTICO CAUSADO
POR LA FASCIOSIS CRÓNICA EN BOVINOS Y
OVINOS UTILIZANDO MARCADORES ENZIMATICOS”**

TESIS

PRESENTADA POR EL BACHILLER

RIMBERTO IDME HAÑARI

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ


2015

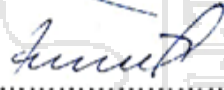
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“DETERMINACION DEL DAÑO HEPATICO CAUSADO POR LA
FASCIOLOSIS CRÓNICA EN BOVINOS Y OVINOS UTILIZANDO
MARCADORES ENZIMATICOS”**

TESIS
PRESENTADA POR EL BACHILLER
RIMBERTO IDME HAÑARI
PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE MEDICO VETERINARIO Y
ZOOTECNISTA

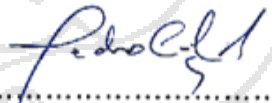
APROBADO POR:

PRESIDENTE DE JURADO :

Dr. Máximo MELO ANCASI

PRIMER MIEMBRO :

Dr. Domingo RUELAS CALLOAPAZA

SEGUNDO MIEMBRO :

M.Sc. Bilo W. CALSÍN CALSÍN

DIRECTOR DE TESIS :

M.Sc. Pedro Ubaldo COILA AÑASCO

ASESOR DE TESIS :
M.Sc. Julio MALAGA APAZA

ÁREA : Salud animal

TEMA : Enfermedad parasitaria

DEDICATORIA

A Dios por la vida la fortaleza y la inspiración para seguir adelante; con amor respeto y honra, a mi padre que desde el cielo me guió en cumplir esta meta, a mi madre por darme la vida y brindarme su apoyo incondicional en la culminación de esta etapa tan importante, aun en los momentos más difíciles durante mi formación profesional

A mis hermanos, Ana, Fernán, Rubén, Grover, Emerson y a toda mi familia, gracias por haber fomentado en mí el deseo de superación y el anhelo de triunfo en la vida.

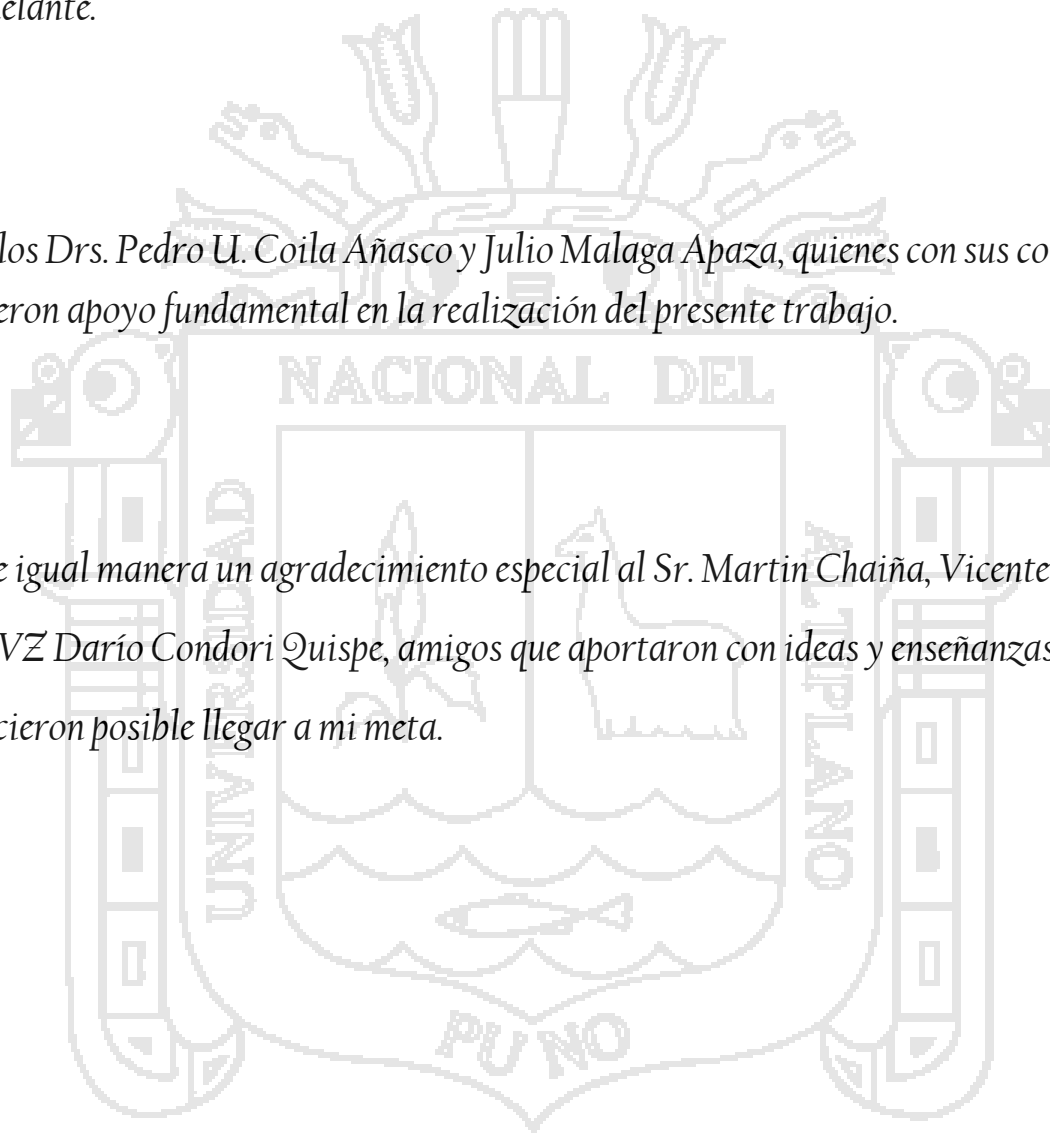
A mis pequeños Enzo y Kiara, quienes son el impulso invaluable para la culminación de mi Carrera Profesional y mis deseos de superación.

AGRADECIMIENTO

Agradecer hoy y siempre a mi familia por el esfuerzo realizado por ellos. El apoyo en mis estudios, de ser así no hubiese sido posible. A mis padres y hermanos ya que me brindan el apoyo, la alegría y me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.

A los Drs. Pedro U. Coila Añasco y Julio Malaga Apaza, quienes con sus consejos fueron apoyo fundamental en la realización del presente trabajo.

De igual manera un agradecimiento especial al Sr. Martin Chaiña, Vicente y al MVZ Darío Condori Quispe, amigos que aportaron con ideas y enseñanzas que hicieron posible llegar a mi meta.



ÍNDICE

RESMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
Generalidades.....	6
Antecedentes.....	29
MATERIALES Y METODOS.....	32
Ámbito de estudio.....	32
Animales de Estudio.....	33
Materiales, Equipos y Reactivos.....	34
Metodología.....	35
Análisis Estadístico.....	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
Actividad de Marcadores Enzimáticos en Bovinos Positivos y Negativos a Fasiolosis Crónica.....	42
Actividad de Marcadores Enzimáticos en Ovinos Positivos y Negativos a Fasiolosis Crónica.....	47
CONCLUSIONES.....	55
RECOMENDACIONES.....	56
BIBLIOGRAFIA.....	57
ANEXOS.....	62

RESUMEN

La fasciolosis es una de las enfermedades parasitarias más difundidas e importantes en la ganadería que se refleja en las cuantiosas pérdidas económicas que causa en los productores; no obstante, que faltan formas de diagnóstico de esta enfermedad en animales con uno o dos meses de infección; por lo cual se realizó el presente trabajo de investigación con el objetivo de determinar el daño hepático causado por la fasciolosis crónica en bovinos y ovinos (positivos a la Prueba de Stoll Modificado) de la Microcuenca de Larimayo mediante marcadores enzimáticos séricos: aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y γ -glutamiltanspeptidasa (GGT). Para ello, se utilizaron 30 vacunos y 30 ovinos, distribuidos en 15 animales con fasciolosis y 15 sin fasciolosis. Las muestras de heces se evaluaron mediante el método coprológico de Stoll Modificado para determinar si los animales fueron positivos o negativos a la enfermedad. La actividad enzimática fue determinada mediante espectrofotometría utilizando kits de Wiener Lab ®. Los datos fueron analizados mediante la prueba estadística de "t" (student) para comparar entre los tratamientos. Los resultados en vacunos para AST fueron de 94.23 y 60.63 UI/L; para ALT de 12.14 y 7.16 UI/L y para GGT de 110.66 y 43.13 UI/L, en los animales positivos y negativos, respectivamente. Mientras en ovinos la AST se encontró en 97.13 y 66.01 UI/L; para ALT 9.52 y 6.38 UI/L y para GGT de 168.99 y 87.52 UI/L, en animales positivos y negativos, respectivamente. Concluyéndose, que tanto en vacunos como en ovinos, positivos a fasciolosis crónica, muestran superioridad en la actividad de las enzimas estudiadas en relación a los animales negativos ($P \leq 0.05$), lo que indica que la presencia del parásito causa daño estructural y funcional del hígado.

Palabras clave: Fasciolosis, vacunos, ovinos, transaminasas, Aspartato aminotransferasa, Alanina aminotransferasa y γ -Glutamiltanspeptidasa.

I. INTRODUCCIÓN

La crianza de ganado ovino y bovino son actividades de significativa importancia económica para el Perú y, sobre todo, para el Departamento de Puno, que en base a sus pasturas naturales y riego tecnificado alberga las poblaciones más concentradas de estas especies. La población ovina nacional es de 9'523,198 animales correspondiendo al Departamento de Puno 2'088,332 animales, siendo la mayoría de raza Criolla. En cuanto a ganado vacuno, el total nacional es de 5'156,044 animales de los cuales 617,163 corresponden al Departamento de Puno (INEI, 2012).

Sin embargo, una de las enfermedades parasitarias más difundidas es la fasciolosis, sobre todo en cuencas hidrográficas, como el caso de Larimayo, en donde los productores tienen que invertir mucho dinero en el control de esta enfermedad; debido a que tiene repercusiones económicas negativas en los productores por *efectos directos*, como es el decomiso de vísceras, costos de tratamiento y muertes; mientras por *efectos indirectos*, que son los de mayor importancia, como el retraso en el crecimiento asociado a la deficiente conversión alimenticia, desnutrición, baja fertilidad, abortos, disminución en la calidad de la producción de carne, leche, lana y baja resistencia a otras enfermedades (Quiroz, 1993).

En el organismo animal, el parásito provoca profundas alteraciones anátomo-funcionales del hígado; por ejemplo, la hiperplasia de la mucosa de los conductos biliares y, los propios parásitos, generan obstrucción e ictericia. Los hábitos hematófagos y las sustancias tóxicas liberadas por el tremátodo destruyen eritrocitos circulantes, en tanto que la migración del parásito a través del

parénquima y la hipertensión de los ductos conducen a la inflamación y necrosis de tejido hepático, con consiguiente insuficiencia funcional. La hipoproteinemia originará edemas y ascitis. Finalmente, las áreas inflamatorio–necróticas del hígado sufren fibrosis y atrofia, pudiendo evolucionar hacia la cirrosis hepática (Haroun & Hussein, 1975).

Todas estas alteraciones hepáticas causadas por el parásito, sin duda alguna, son expresadas a nivel sanguíneo: hipoproteinemia, presencia de toxinas, hiperglobulinemia, modificaciones de las actividades enzimáticas y muchos otros parámetros bioquímicos, inmunológicos y hematológicos del animal. Precisamente, el presente estudio tuvo el propósito de determinar el daño hepático causado por la fasciolosis crónica en vacunos y ovinos de la Microcuenca de Larimayo mediante algunos marcadores enzimáticos de función y daño hepático. Se tiene como antecedentes, los estudios realizados por Gutierrez (2006), quienes determinaron que en la fasciolosis ovina y humana, respectivamente, se elevan las actividades de algunas enzimas hepáticas. El diagnóstico de las infecciones hepáticas causadas por fasciolosis en animales jóvenes y/o recientemente infectados antes de los 2.5 meses no existe un método que diagnostique en ese periodo; es por ello, que se plantea realizar este trabajo de investigación a través de la actividad enzimática.

Los resultados o estos conocimientos obtenidos contribuirán en la clínica veterinaria, que dicho sea de paso es muy escaso su uso en nuestra región, ya que es muy útil para el diagnóstico y pronóstico de esta parasitosis, tan difundida en nuestro medio, y más en zonas húmedas, en donde hay versiones que indican que el grado de infección con fasciolosis llegaría al 100%. Drepper & Kenberburg (1984), indican que durante el curso de infecciones hepáticas causadas por *Fasciola*

hepática, se liberan gran número de enzimas que escapan de las células dañadas, cuya medición es útil para fines de diagnóstico, incluso mucho antes de la aparición de huevos en las heces. Asimismo, Sykes *et al.* (1980) señala que estos marcadores son útiles incluso en la detección de la fasciolosis subclínica. Por lo cual, el presente estudio tubo los objetivos de medir y comparar la actividad enzimática aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y γ -glutamil transpeptidasa (GGT), en suero sanguíneo de vacunos y ovinos con y sin *Fasciola hepática* crónica a la Prueba coprológica de Stoll modificado) en la Microcuenca de Larimayo, Antauta, Melgar.



II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades

El sector pecuario cumple un rol importante en la generación de ingresos para las familias campesinas, contribuye a la seguridad alimentaria del país, brinda fuerza de trabajo para el transporte y arado, aporta fertilizantes a través del guano y contribuye a las actividades de recreación. El Altiplano de Puno es una región ganadera, donde predomina la crianza de vacunos, ovinos y alpacas sobre una extensión aproximada de 3'314,000 de hectáreas de pastos naturales que soportan una población estimada de 617,163 vacunos y 2'088,332 ovinos (INEI, 2012).

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria que afecta a distintas especies de animales entre ellos rumiantes, cerdos, equinos, conejos y otros herbívoros, así como también al hombre; ocasionando una hepatitis y colangitis generalmente crónicas que están acompañadas por trastornos nutricionales. Afecta a animales principalmente de zonas donde la pluviosidad es moderada a intensa; no obstante puede presentarse en los valles pantanosos de regiones secas y a lo largo de arroyos o canales de riego (Cordero del Campillo, 2002).

Su mayor importancia reside en el impacto económico que ocasiona en los productores de todo el país, debido a los decomisos de hígados infectados y a la disminución de parámetros productivos como leche, carne, lana y ganancia diaria de peso de los animales afectados. Además, la fasciolosis es considerada una zoonosis aunque la presentación en humanos es esporádica o accidental, generalmente transmitida por alimentos contaminados con metacercarias (Olaechea, 2004).

Los efectos económicos de este parásito representan grandes pérdidas, que pueden ser directas, por muertes o decomisos de hígados en la central de sacrificio, o indirectas por la disminución de las producciones del ganado. Aunque las pérdidas directas son fáciles de medir, las pérdidas indirectas son más importantes ya que la forma subclínica de la enfermedad es mucho más frecuente. Estas pérdidas incluyen disminución en el crecimiento y conversión alimenticia, disminución de la producción láctea y cárnica, entorpecimiento en la fertilidad y fecundidad, gastos terapéuticos y reemplazo de animales muertos. Para calcular el impacto económico, se requiere el conocimiento de la prevalencia, la intensidad de la infección y la experiencia en prácticas zootécnicas (Cordero del Campillo, 2002).

La fasciolosis es un problema de salud pública por la alta prevalencia de la infección humana, especialmente niños y un problema veterinario de importancia por las altas tasas de infección del ganado en la mayoría de regiones del Perú. La fasciolosis es endémica en la sierra y la costa, y esporádica en la región amazónica. La pérdida ganadera anual por la fasciolosis es no menor de US\$ 50 millones, estimada por la prevalencia de la infección y los decomisos de hígados de vacunos en mataderos. En el Perú, las más altas prevalencias de fasciolosis humana y animal son en la sierra, principalmente en los valles andinos de Cajamarca, Junín, Cusco y Arequipa, así como, en la altiplanicie de la cuenca del Lago Titicaca (Espinoza *et al.*, 2010).

2.2. Fasciolosis hepática

a) Etiología

La *Fasciola hepática* es un helminto hermafrodita de cuerpo ancho y aplanado dorso ventralmente, los vermes adultos se localizan en los conductos

biliares de numerosos mamíferos, aunque se consideran más adecuados los rumiantes, tanto domésticos como silvestres. La receptividad de los hospederos definitivos es variable, clasificándose éstos en tres grupos: en el primero se incluyen los que reaccionan rápidamente frente al parásito, evitando su desarrollo, como el cerdo, jabalí, perro y gato; en el segundo se incluyen los bovinos, los equinos y el hombre, que reaccionan con retraso ante el proceso ya implantado en el hígado; y el último lugar, los mamíferos más receptivos, en los que existe alta productividad parasitaria y una marcada patogenicidad (ovinos, caprinos y lagomorfos). La existencia de *Fasciola hepática* está ligada a la presencia de moluscos del género *Lymnaea* que actúa como hospedero intermediario en su ciclo biológico (Cordero del Campillo, 2002).

b) Clasificación taxonómica

Según muchos trabajos de investigación la clasificación taxonómica de la *Fasciola hepática* es la siguiente (Urquhart et al, 2001):

- Reino : Animalia
- Filum : Platyhelminthes
- Clase : Trematoda
- Subclase : Digenea
- Orden : Echinostomida
- Familia : Fasciolidae
- Género : *Fasciola*
- Especie : *F. hepática*

c) Estructura y morfología

La *Fasciola hepática* se caracteriza por tener un cuerpo amplio y aplanado dorso-ventralmente, mide aproximadamente de 2.5 a 3 x 1.3 cm, posee un extremo

anterior con cono cefálico bien diferenciado de 4 a 5 mm que termina en la ventosa oral con un diámetro de 1 mm; presenta también otra ventosa ventral o acetábulo que es más grande que la oral; entre ambas se ubica el cirro del aparato genital masculino. Posee tonalidades que van desde el cenizo hasta coloraciones parduscas. El tegumento, se encarga de mantener la integridad del parásito y participa en procesos de absorción, secreción y nutrición; se encuentra revestido por una cutícula gruesa de 10-17 μm dotada de salientes espinas triangulares dirigidas hacia atrás de unos 30 a 37 μm de longitud; por debajo de esta se sitúa la musculatura subcuticular lisa que se divide en tres capas distribuidas así: una externa circular de 8 μm , una media longitudinal de 21.5 μm y finalmente una capa interna oblicua y discontinua. El aparato digestivo comienza en la boca y la faringe; el esófago se comunica con dos ciegos ramificados largos y con numerosos divertículos laterales, no tiene ano. El sistema nervioso consiste en un par de ganglios cerebroides interconectados del cual se desprenden tres pares de cordones longitudinales, ventrales y laterales (Carrada-Bravo, 2007).

El sistema excretor protonefridial consiste en un par de canalillos longitudinales ramificados o canales laterales; provistos de células flamíferas; estos canales se comunican con tubulillos conectores que se abren en la vesícula excretora. El aparato genital masculino, ocupa la parte medial del cuerpo, está formado por dos testículos bifurcados que desembocan en la bolsa del cirro; el poro genital se ubica en el borde acetabular anterior sobre la línea media. El aparato genital femenino, consta de un ovario ramificado, situado al lado derecho, delante de los testículos; el útero se ubica en el tercio anterior y es corto y sinuoso. Las glándulas vitelógenas están formadas por finos folículos que ocupan las márgenes laterales del trematodo y se unen formando dos transversales que drenan en la

glándula de Mehlis, desde la cual se comunican con el ootipo. (Cordero del Campillo, 2002).

d) Ciclo biológico

La *Fasciola hepática* es un helminto de ciclo indirecto, en el cual intervienen caracoles del género *Limnaea sp.* como hospedadores intermediarios y los rumiantes como hospedadores definitivos; los adultos ponen huevos operculados, en los cuales se desarrolla una larva ciliada y piriforme llamada Miracidio, que gracias a estímulos lumínicos libera una enzima que destruye el cemento proteico encargado de mantener el opérculo en su lugar, se libera y se dirige al agua, por factores quimiotácticos se guía para encontrar a su huésped intermediario, cuando entra en contacto con él, gracias a una enzima citolítica se adhiere a su superficie y penetra en sus tejidos; dentro del caracol el Miracidio pierde los cilios y se convierte en un saco alargado llamado esporoquiste que contiene células germinales que se convierten en redias; estas poseen una ventosa oral, células flamíferas y un intestino simple, migran al hepatopáncreas del caracol y a partir de las células germinales, si las condiciones ambientales son adecuadas para el caracol se desarrollan a cercarias, si las condiciones no son las ideales, se da lugar a una segunda generación de redias. Las cercarias son vermes jóvenes provisionadas de una larga cola, salen del caracol, y nadan hasta alcanzar la vegetación, pierden la cola y se enquistan, dando lugar a la metacercaria que es la forma infectante (Urquhart *et al.*, 2001).

El bovino se contamina a partir de la ingestión de pastos que contienen metacercarias; éstas dentro del animal se desenquistan, penetran a través del intestino en un transcurso aproximado de 3 horas, en peritoneo y cápsula de glisson permanecen entre 3 y 16 días para llegar al parénquima hepático como juveniles y

finalmente desarrollarse como adultas en los conductos biliares, donde inician la ovoposición que puede alcanzar entre 5000 y 20000 huevos diarios durante toda su vida. La cantidad de huevos ovipositados por este trematodo depende de factores como: el nivel de nutrición de los adultos, el número de individuos y al nivel de calcificación de los conductos. La vesícula biliar almacena huevos hasta que estos sean expulsados por contracción durante la digestión (Becerra, 2000).

Los huevos (Fig. 1) son depositados en los conductos biliares y miden entre 130 y 150 micras de longitud y de 60 a 90 micras de ancho, son operculados de color amarillo, poseen un revestimiento formado por esclerotina que es una capa de gran dureza que confiere resistencia a la cutícula, está compuesta por proliferol y proteínas; los huevos, al ser eliminados con las heces todavía no son maduros es decir que aún no están embrionados. Requieren para su desarrollo una temperatura de entre 10 y 30°C y la existencia de al menos una fina capa de agua y alcanzan su desarrollo a los 9-15 días (Giraldo, 2009).

El miracidio es una larva ciliada, de movimientos activos favorecidos por la luz solar, desprenden el opérculo del huevo y salen a nadar libremente y antes de 8 horas deben encontrar al hospedador intermediario e invadirlo, perforando las células epiteliales y subepiteliales (Giraldo., 2009) En cuánto esa invasión ocurre, reciben el nombre de esporoquistes; posteriormente originan la primera generación de redias en 3 semanas aproximadamente. La segunda generación se da una semana después y finalmente aparecen las cercárias que pueden llegar a ser entre 500 y 650, estas maduran en el agua y 8 a 12 horas después pierden su cola, se hacen redondas y se enquistan formando metacercarias que terminan por ser las formas infectantes del parasito. Habitualmente se localizan enquistadas en la

vegetación acuática semisumergida, donde finalmente son consumidas por el hospedador definitivo (Urquhart *et al.*, 2001; Giraldo, 2009).

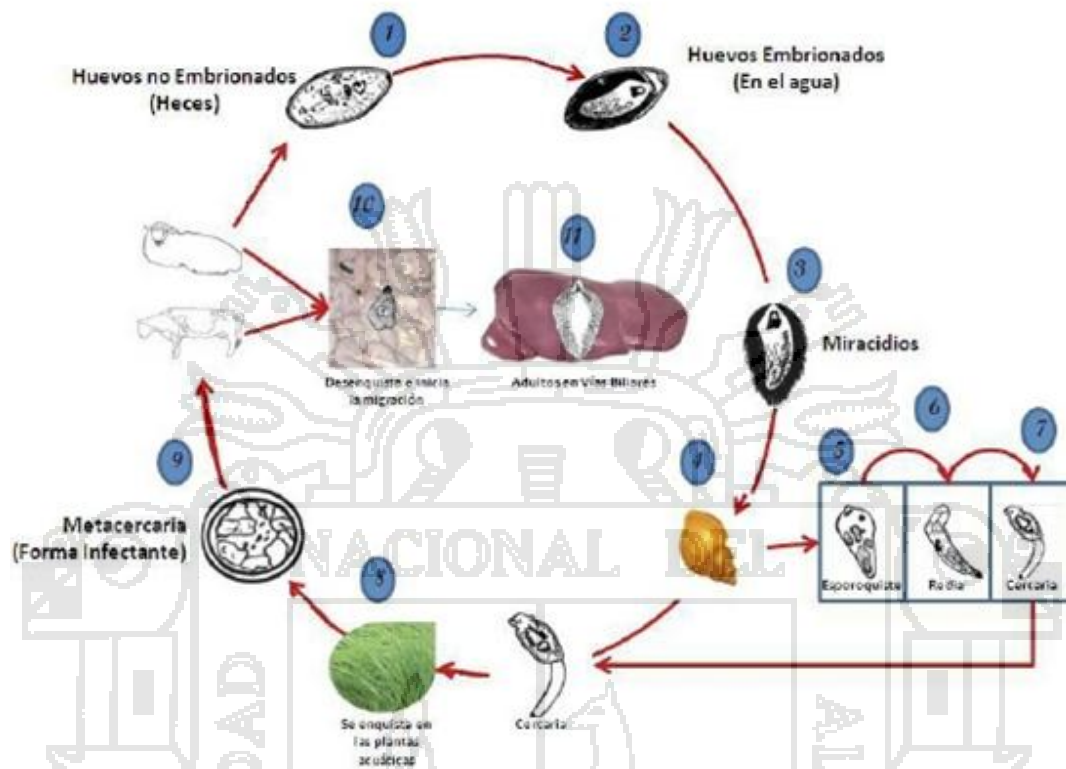


Fig. 1: Ciclo biológico de la *Fasciola hepática*.

El periodo de prepatencia es de 10 a 12 semanas. Por lo tanto, el tiempo mínimo necesario para que se desarrolle el ciclo evolutivo completo de la *Fasciola hepática* es de 17 a 18 semanas. La longevidad de *Fasciola hepática* en ovejas no tratadas puede ser varios años; en ganado vacuno es generalmente menor de un año (Urquhart *et al.*, 2001)

e) Fisiopatología

La fasciolosis, presenta tres formas clínicas: aguda, subaguda y crónica siendo la forma crónica la más frecuente; se basan principalmente en los hallazgos de necropsia y depende de la cantidad de vermes adultos, de los parásitos

inmaduros migrantes en el parénquima hepático y de la actividad hematófaga de los adultos en los conductos biliares (Cordero del Campillo, 2002).

La **forma aguda** ocurre principalmente en corderos entre las dos y tres semanas. Puede llegar a provocar la muerte en 48 horas; es probable observar secreción de líquido sanguinolento por las fosas nasales y el ano. En bovinos sobreviene 5 a 6 semanas después de la ingestión de una gran cantidad de metacercarias por muy poco tiempo; esto provoca una invasión tal, que pudiera destruir suficiente parénquima como para causar una insuficiencia hepática aguda. La presentación aguda está acompañada por debilidad, anorexia, palidez y edema de mucosas y conjuntiva; dolor a la palpación en la zona de proyección hepática (hipocondrio derecho). Presenta una variable y elevada mortalidad en dos o tres días (Becerra, 2000).

La **forma subaguda**, contrariamente al consumo masivo en corto tiempo de los bovinos, se describe en ovinos como la ingestión de gran cantidad de metacercarias durante un tiempo extenso y suficiente como para no provocar agudeza (Becerra, 2000) Se presenta por la existencia al mismo tiempo de juveniles emigrando y adultos en los conductos biliares de la forma crónica podemos decir que ocurre por ingestión de una pequeña cantidad de metacercarias durante mucho tiempo haciendo que su desarrollo sea lento; esta forma de presentación se debe a la presencia de vermes adultos en los conductos biliares, puede durar entre 2 y 3 meses y finalmente llevar a la muerte del animal. En esta forma se observa pérdida de peso, palidez de la mucosa y conjuntiva y en algunos casos edema submandibular y dolor a la palpación (Becerra, 2000).

La **forma crónica** se presenta internamente colangitis, obstrucción biliar, destrucción del tejido hepático, fibrosis y anemia. También se interrumpe el

desarrollo y la conversión alimenticia en animales jóvenes. Exteriormente se observa pérdida de peso, edema submandibular y palidez de las mucosas por varias semanas; en terneros también hay caquexia, anemia y diarrea crónica, fiebre de hasta 42°C, y muerte a las 10 ó 18 semanas.

Al examen postmortem los hallazgos dependen del número de parásitos y del tiempo de infección; se observan las perforaciones hepáticas, la inflamación y focos hemorrágicos que muestran un cuadro de hepatitis aguda esto si la infestación es reciente, también pueden observarse líquidos serosos en peritoneo y engrosamiento de los conductos biliares con alteraciones cirróticas cuando la infestación es de tipo crónico (Olaechea, 2004).

La capsula de glisson se observa engrosada y con infiltración eosinofílica, al mismo tiempo se observa hepatomegalia, hematomas, abscesos subcapsulares y necrosis con infiltración de macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos. Puede encontrarse también formaciones nodulares y zonas con fibroesclerosis periductal y ensanchamiento de los conductos biliares intrahepáticos; La vesícula biliar puede presentar erosión del epitelio por presencia de juveniles que junto con los adultos producen obstrucción y causan retención de bilis, aumento de la presión arterial, leucocitosis y anemia hipocrómica (Carrada-Bravo, 2007).

La reacción tisular generalmente es aguda, y se acompaña de una fibrosis hepática que puede presentar 4 o 5 sistemas defensivos, se inicia con una fibrosis postnecrótica producto de la reparación de los trayectos migratorios, esto es muy frecuente en el lóbulo ventral del hígado, pues es el sitio de entrada de la Fasciola; se continua con una fibrosis isquémica que se presenta como reacción reconstructiva de las áreas de necrosis coagulativas y microtrombos causados por los vermes en los sinusoides hepáticos, seguida por una fibrosis peribiliar que

se presenta por la intensa erosión de la mucosa estimulando una intensa reacción inflamatoria; puede llegar a extenderse por todo el árbol biliar debido al movimiento de los vermes; sucedido lo anterior sigue una fibrosis posterior que se muestra en procesos avanzados donde los huevos pueden provocar una reacción granulomatosa que los destruye y da lugar a la fibrosis y finalmente una fibrosis monolobular que consiste en la conexión de los espacios porta con tejido fibrótico; a nivel macro se aprecian como filamentos blanquecinos que demarcan el lóbulo y afectan todo el hígado; pero aun presentándose todo lo anterior, lo más significativo es la flebitis marcada de la vasculatura hepática, principalmente de la vena porta que finalmente desenlaza en una intensa hipertensión portal (Cordero del Campillo, 2002).

Las formas adultas se localizan y actúan a nivel de los canalículos biliares en donde ejercen acciones irritantes y hematófagas, ocasionando una fuerte perturbación del metabolismo, particularmente del hierro. La presencia del parásito en los canalículos biliares y la lesión de los mismos por la acción del parásito provocan un aumento de la enzima γ -glutamil transpeptidasa (Morales *et al*, 2004).

La fasciolosis cursa con anemia, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia y, dependiendo de la intensidad y duración de la infección, con hiper o hipoproteinemia. La anorexia y la pérdida de peso o el retraso en el crecimiento son también característicos de la infección por *Fasciola hepática* (Cordero del Campillo, 2002).

f) Epidemiología

La presencia de *F. hepática* en una zona depende fundamentalmente de factores como la presencia del molusco gasterópodo *Lymnaea cubensis*, *L. columella* y/o *L. truncatula* que se desenvuelven como hospedadores

intermediarios, que al ser anfibios prefieren el barro en vez del agua libre y corriente, de ahí que sean localizados en suelos arcillosos o ricos en materia orgánica. La temperatura es indispensable para el desarrollo y multiplicación del caracol y para la evolución de los huevos de *Fasciola*. Otro factor de importancia es la introducción de animales infectados con *F. hepática* a zonas que reúnen las condiciones para el establecimiento del ciclo evolutivo completo. Por lo tanto es necesario hacer un diagnóstico adecuado, previo a la introducción de animales provenientes de zonas contaminadas, e incluso se debe recomendar no suministrar pastos de corte provenientes de esos lugares debido a la alta probabilidad de que venga contaminado con metacercarias enquistadas (Becerra, 2000).

2.3. El hígado y sus funciones

El hígado es el órgano más grande del organismo animal, está situado en el hipocondrio derecho sostenido por ligamentos. Recibe doble suministro de sangre: 1) la *vena portal* que lleva sangre proveniente del bazo y del tracto gastrointestinal rica en nutrientes; 2) la *arteria hepática* (aprox. 30%) que lleva sangre rica en oxígeno. El drenaje de las vénulas del hígado converge en las venas hepáticas, los cuales se unen a la vena. Funcionalmente, está dividido en lóbulos derecho e izquierdo por medio de la vena hepática (Kumar y Clarck, 2005).

El color es rojo-pardo. Estructural e histológicamente puede ser dividido en 4 sistemas tisulares: 1) sistema vascular intrahepático; 2) estroma; 3) células sinusoidales; y 4) hepatocitos (Kumar, 2005). Las principales células del hígado son los hepatocitos, los cuales constituyen las 2/3 partes de la masa del hígado. El resto son las células de Kupffer, células stellate, células endoteliales, células del ducto biliar, vasos sanguíneos y estructuras de soporte. El acino es la unidad fisiológica del hígado (Fauci *et al.*, 2008).

En 1 g de hígado hay aproximadamente 171 millones de hepatocitos, el daño de las membranas produce aumento en las actividades enzimáticas de suero a niveles patológicos. Si el hígado pierde solamente 1/1000 de sus enzimas, habrá un aumento en la actividad enzimática respectiva en el suero por un factor de 2. El contenido de enzimas en los hepatocitos puede ser hasta 10000 veces más alto que en el suero. Por lo tanto, hay una correlación alta entre la naturaleza y la intensidad del daño hepatocelular con la actividad incrementada de las enzimas liberadas (Kumar, 2005).

2.4. Marcadores bioquímicos de función hepática

El hígado lleva a cabo muchas funciones bioquímicas, la mayoría de las cuales no pueden medirse fácilmente con pruebas sanguíneas. Las pruebas de laboratorio miden solamente un número limitado de estas funciones. Las pruebas bioquímicas se usan para: 1) detectar la presencia de la enfermedad hepática; 2) distinguir el tipo de enfermedad hepática; 3) medir la extensión del daño hepático; y 4) monitorear la respuesta al tratamiento. Sin embargo, las pruebas hepáticas tienen limitaciones. Pueden estar normales en pacientes con seria enfermedad hepática y anormal en pacientes con enfermedades extrahepáticas (Braunwald *et al.*, 2001). Además, las pruebas de laboratorio sirven para diferenciar: 1) el patrón de daño (hepatocelular o colestático); 2) la cronicidad del daño (agudo o crónico); 3) la severidad del daño (ligero o severo) (Burtis *et al.*, 2008).

En la práctica clínica el estudio de las enzimas séricas es muy importante para el diagnóstico, control y seguimiento de una gran variedad de patologías. Sin perder de vista que es imprescindible tener en cuenta la sintomatología del paciente y los estudios clínicos, la detección de altos niveles de la actividad de una enzima en suero contribuye a dilucidar un cuadro patológico. Algunas enzimas tienen

amplia distribución tisular, mientras que otras son específicas de un determinado tejido. Esta mayor o menor especificidad es importante para algunos diagnósticos diferenciales. La determinación de estos niveles de enzimas plasmáticas puede proveer información valiosa para diagnóstico y pronóstico (Kumar & Clark, 2005).

De hecho, muchas pruebas, como las transaminasas o la fosfatasa alcalina, no miden la función hepática, sino más bien, detectan el daño de la célula hepática o una interferencia en el flujo biliar. De modo que ninguna prueba permite evaluar correctamente la capacidad funcional total hepática. Las pruebas enzimáticas séricas pueden agruparse en tres categorías: 1) enzimas cuya elevación en el suero refleja daño de los hepatocitos (*patrón citolítico*); 2) enzimas cuya elevación en el suero refleja colestasis (*patrón colestático*); y 3) enzimas que no encajan en las categorías indicadas (Braunwald *et al.*, 2001).

De las numerosas pruebas que se utilizan para evaluar la función hepática, se tiene: 1) pruebas que miden la capacidad excretora del hígado (bilirrubina, ácidos biliares y tiempo de eliminación sérica de colorantes inyectados); 2) pruebas que miden la capacidad de síntesis del hígado (albúmina, globulinas, urea, glucosa, colesterol) y tiempo de protrombina; 3) pruebas que miden la destrucción activa de hepatocitos (AST, ALT, GLDH, arginasa, entre otras); y 4) pruebas que miden colestasis (ALP y GGT) (Andresen, 2009; Kumar, 2005).

Bajo condiciones normales y durante el recambio celular normal, los hepatocitos dejan escapar pequeñas cantidades de enzimas, que son detectables en el suero como “valores normales”. Debido a la entrada (síntesis de enzima por el hepatocito) y a la salida (eliminación de la enzima), estos valores se mantienen en constantes dentro de un rango normal (Kumar, 2005).

La elevación de la actividad enzimática en el plasma y otros líquidos se produce por: a) necrosis (destrucción celular), b) aumento de la permeabilidad de membrana, c) sobreproducción de enzimas (mayor metabolismo en un tejido, e.g. neoplasia), d) menor eliminación (e.g. por obstrucción biliar), y e) incremento de células inflamatorias. Los factores ambientales que pueden afectar los resultados de laboratorio incluyen la altitud, la temperatura ambiental, la localización geográfica y las estaciones del año (Burtis *et al.*, 2008).

Las pruebas enzimáticas séricas pueden agruparse en tres categorías: 1) enzimas cuya elevación en el suero refleja daño de los hepatocitos (*patrón citolítico*); 2) enzimas cuya la elevación en el suero refleja colestasis (*patrón colestático*); y 3) enzimas que no encajan en las categorías indicadas (Braunwald *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2007).

La elevación de la actividad enzimática en el plasma y otros líquidos se produce por: a) necrosis (destrucción celular), b) aumento de la permeabilidad de membrana, c) sobreproducción de enzimas (mayor metabolismo en un tejido, e.g. neoplasia), d) menor eliminación (e.g. por obstrucción biliar), y e) incremento de células inflamatorias (Burtis *et al.*, 2008).

Cada órgano posee una distribución cuantitativa y cualitativa, hasta cierto punto, típica de enzimas dando por resultado un perfil enzimático, denominado *patrón enzimático*. Así dentro de los hepatocitos y de los conductos biliares, el hígado también posee una distribución característica de enzimas con especificidad gradualmente diversa. Esta especificidad de enzimas hepatobiliares esenciales es de importancia para la diagnosis de enfermedades hepatobiliares (Kumar, 2005).

Bajo condiciones normales y durante el recambio celular normal, los hepatocitos dejan escapar pequeñas cantidades de enzimas, que son detectables

en el suero como “*valores normales*”. Debido a la entrada (síntesis de enzima por el hepatocito) y a la salida (eliminación de la enzima), estos valores se mantienen constantes dentro de un rango normal (Kumar, 2005).

Los marcadores bioquímicos se evalúan generalmente en términos de sensibilidad y especificidad de diagnóstico. Para aumentar la sensibilidad y la especificidad de las pruebas de laboratorio en la detección de enfermedad hepática, es conveniente hacerlos en serie (batería); así, cuanto más de una de estas pruebas son anormales o son persistentemente anormales, la probabilidad de enfermedad hepática es alta (Braunwald *et al*, 2001). Los marcadores actualmente disponibles aun no satisfacen los criterios de un marcador ideal, particularmente con respecto a sensibilidad y a especificidad; sin embargo, cuando se combinan, es posible ganar un cierto conocimiento útil (Kumar, 2005).

Los factores ambientales que pueden afectar los resultados de laboratorio incluyen la altitud, la temperatura ambiental, la localización geográfica y las estaciones del año (Burtis *et al.*, 2008).

2.5. Transaminasas (aminotransferasas)

La transaminación es un proceso reversible que consiste en la transferencia del grupo amino desde un aminoácido a un cetoácido, dando como resultado la conversión del primero en un cetoácido y del segundo en un nuevo aminoácido, según (). Esta reacción es de gran importancia en el metabolismo de aminoácidos y es catalizada por enzimas llamadas transaminasas o aminotransferasas, las que se encuentran presentes en la mayoría de tejidos animales y vegetales. El cofactor de estas enzimas es el piridoxal fosfato (PLP). Casi para todas las transaminasas

el α -cetoglutarato es el aceptor del grupo amino formándose, por tanto, ácido glutámico (Devlin, 1997).

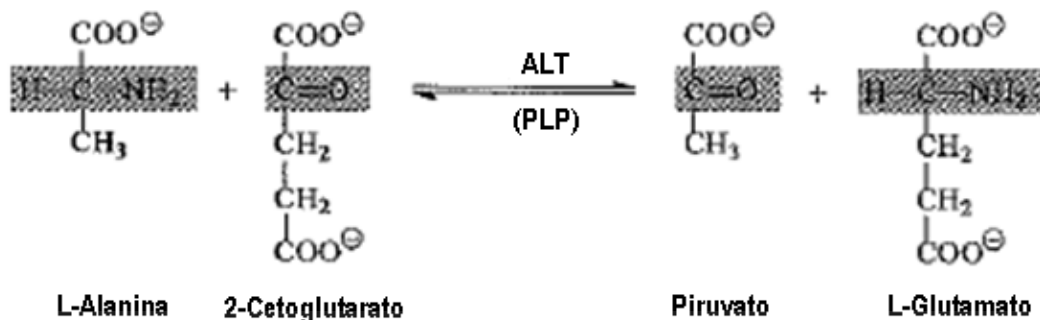
Las transaminasas normalmente están presentes en el suero en concentraciones bajas. Estas enzimas se liberan a la sangre en grandes cantidades cuando hay daño de la membrana celular hepática que produce una permeabilidad incrementada. Cualquier tipo de lesión de la célula hepática puede causar las elevaciones en las transaminasas séricas (Braunwald *et al.*, 2001).

La enfermedad hepática es la más importante causa de la actividad incrementada de las transaminasas en el suero. En muchos tipos de enfermedad hepática, la actividad ALT es más alta que la AST. Las actividades de ambas enzimas pueden alcanzar a valores de 100 veces más alto que los límites superiores normales, aunque elevaciones de 10 a 40 veces son frecuentemente encontradas. Los valores picos de actividad de transaminasas ocurren entre los días 7^{mo} y 12^{avo}, luego las actividades declinan, alcanzando la normalidad entre la 3^{ra} y 5^{ta} semana si se recupera (Burtis *et al.*, 2008).

Las transaminasas intervienen en el catabolismo de por lo menos 12 aminoácidos. En la actualidad se conoce un gran número de transaminasas, un ejemplo destacado lo cumple la transaminasa de los tejidos animales denominado aspartato transaminasa (AST o GOT) y la alanintransaminasa (ALT o GPT) (Lehninger, 1991).

a) Aspartato aminotransferasa o Transaminasa glutámico oxaloacético (AST o GOT)

La AST (EC 2.6.1.1 L-aspartato: 2.cetoglutarato aminotransferasa) cataliza la siguiente reacción química (Burtis *et al.*, 2008).



La ALT es una enzima citoplásmica hepatocelular, con gran concentración en el hígado y en menor medida en los riñones, corazón y músculos, por eso un aumento sérico de ALT es más específico de lesión hepática que la AST. La enzima es exclusivamente citosólica. La vida media de la ALT es aproximadamente 60 horas (2 a 3 días) (Burtis *et al.*, 2008). En mucha menor proporción, se encuentran actividad de ALT en músculo esquelético, corazón, riñón, páncreas y eritrocitos (en orden decreciente). Cuando hay una lesión de estos órganos la ALT es liberada a la sangre y aparece elevada en los análisis (Balcells, 2001).

El daño hepático agudo tiende a producir grandes elevaciones de actividad ALT, mientras que en el daño crónico la actividad ALT puede estar normal o moderadamente incrementada. El grado de incremento en la actividad ALT correlaciona con el número de hepatocitos dañados, el cual puede ser utilizado para evaluar la extensión del daño hepático (Fligio *et al.*, 2004).

La ALT posee una sensibilidad de 83% y una especificidad de 84% en relación a enfermedades no hepáticas y 97.8% en relación a sujetos saludables. La elevación de ALT se produjo en el 81% de 520 pacientes con enfermedades hepáticas muy diversas. La elevación de ALT es el indicador más sensible del daño hepatocelular, de modo que una subida de ALT es, como regla, de origen hepatocelular (Kumar, 2005).

Los niveles de ALT están aumentados en: 1) *lesión hepatocelular*, 2) *ictericia extrahepática*, a causa de obstrucción biliar, 3) *carcinoma hepático primario o secundario*, 4) *cirrosis biliar primaria*, 5) *hepatitis alcohólica*, con un incremento de 3 veces, y 6) *cirrosis alcohólica* con un incremento leve de 1 a 2 veces. En el hígado graso secundario a alcoholismo el aumento es muy leve o puede estar en límites normales (Balcells, 2001).

El valor de la vida media de GOT en la sangre es de 17 horas, presenta un peso molecular de 100 000, y se ha demostrado que cada molécula de enzima contiene 2 moléculas de fosfato piridoxal como grupo prostéticos. Cada enzima tiene una especificidad tisular definida. Existen tejidos del organismo con concentraciones de enzimas más elevadas que otro. La transaminasa glutámico oxaloacético, se encuentra distribuido ampliamente en el organismo, es producido en el interior de las células del hígado, corazón, músculo esquelético, riñón y otros tejidos. El 80% de las transaminasa glutámico oxaloacético de los hepatocitos está en las mitocondrias. Incluso con una distribución tan amplia, la GOT puede suministrar una información diagnóstica valorable se estudian los parámetros adecuados (Gonzales *et al.*, 1998).

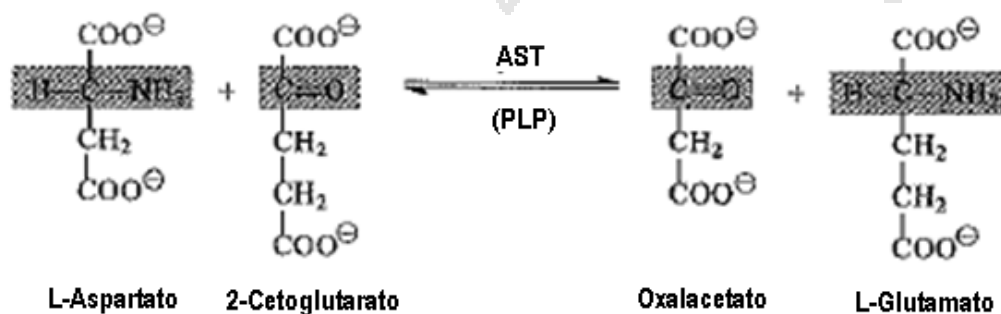
Los valores de GOT sérico se encuentran elevadas por encima de sus valores normales cuando se presentan procesos anormales en el organismo animal, como enfermedades hepáticas (hepatopatías, hepatitis, cirrosis), pacientes con lesiones cardiacas (infarto miocárdico), necrosis muscular, enfermedad muscular blanca e inanición (Coles, 1968). Así mismo, se encuentran elevadas en estados de inflamación y necrosis del hígado, pancreatitis aguda, anemia hemolítica e infección renal (Benjamín, 1991).

Como la AST está principalmente en el corazón y músculo esquelético y también en riñón, cerebro, páncreas y pulmón, en las enfermedades de estos órganos van acompañados por los respectivos incrementos de AST. Una elevación de los valores AST puede también ocurrir como resultado de hemólisis, ejercicio físico vigoroso y por prolongada venostasis durante la colección de sangre. También se encuentran niveles elevados en la hepatitis hipoxia. En general, la gestación muestra un valor de GOT normal. En hepatología, el propósito principal de la determinación de GOT es para complementar los valores de ALT (Kumar, 2005).

Se encuentran cantidades elevadas de AST en suero en casos de infarto agudo de miocardio, hepatopatía aguda, miopatías, por el empleo de determinados fármacos y en cualquier enfermedad o trastorno en el cual resulten seriamente dañadas las células. Valores muy altos de AST (>500 UI/L) son sugerentes de hepatitis u otra clase de necrosis hepatocelular, pero también tumores necróticos grandes, necrosis o hipoxia, falla congestivo y shock (Balcells, 2001).

b) Alanina aminotransferasa o Transaminasa glutámico pirúvico (ALT o GPT)

La ALT (EC 2.6.1.2; L-alanina: 2-cetoglutarato aminotransferasa) cataliza la siguiente reacción (Burtis *et al.*, 2008).



La AST se encuentra principalmente presente en grandes cantidades en el corazón, hígado, músculo esquelético y riñones (Braunwald *et al.*, 2001). Cuando se lesionan las células que contienen la AST o se altera la permeabilidad de la membrana celular se libera al plasma junto con otras enzimas incrementando su concentración sérica. Mientras mayor sea la concentración intracelular de la AST, más alta y más rápida sea la elevación en el suero con el daño celular (Balcells, 2001).

La AST es una enzima de localización mitocondrial (80%) y citoplasmática (20%) (Kumar y Clarck, 2005). Cerca del 5 al 10% de la actividad AST en suero de individuos sanos es de origen mitocondrial (Burtis *et al.*, 2008). Por ello, se puede inferir que ante un aumento significativo de ALT sobre AST hay un daño celular difuso con ruptura de membranas celulares y compromiso citoplasmático, pero sin el aumento de AST > ALT el compromiso necrótico es más profundo y severo. La AST mitocondrial (mAST) se utiliza en el diagnóstico de enfermedad hepática alcohólica (Wilson, 2008). En hepatología, el propósito principal de la determinación de AST es para complementar los valores de ALT (Kumar, 2005).

Se encuentran cantidades elevadas de AST en suero en casos de infarto agudo de miocardio, hepatopatía aguda, miopatías, por el empleo de determinados fármacos y en cualquier enfermedad o trastorno en el cual resulten seriamente dañadas las células. Valores muy altos de AST (>500 UI/L) son sugerentes de hepatitis u otra clase de necrosis hepatocelular, pero también tumores necróticos grandes, necrosis o hipoxia, falla congestivo y shock (Balcells, 2001; Wilson, 2008).

La transaminasa glutámico pirúvico (GPT) es muy específica del hígado se localiza en el citoplasma de los hepatocitos y se libera incluso cuando se lesiona levemente la membrana celular; no es necesario que las células se lesionen

irreversiblemente. La transaminasa glutámico pirúvico (GPT) esta elevada en el 88% de los perros con desordenes hepáticos. La vida media biológica tanto de la transaminasa glutámico oxaloacético (GOT) como la transaminasa glutámico pirúvico (GPT) es bastante sensible y especifica (Kraft, 1998).

La GPT es la enzima más específica de origen hepático en el perro. Se utiliza para detectar alteraciones en la membrana y necrosis del hepatocito. Esta enzima se encuentra en el citoplasma, al lesionarse la membrana del hepatocito aumenta sus valores en la sangre. Este aumento se correlaciona con la gravedad y el número de hepatocitos afectados pero no indica la reversibilidad de la lesión o la funcionalidad del hígado, por ejemplo; se presenta en animales con hepatitis crónica activa, neoplasias hepáticas primarias y necrosis hepática. El incremento de la GPT es moderado en animales con cirrosis o metástasis puede presentar valores normales de GPT. La GPT también puede aumentar en pancreatitis y procesos inflamatorios intestinales, y estos casos se habla de hepatopatías reactivas (John, 2000).

El valor de la vida media de la transaminasa glutámico pirúvico en la sangre es de 50 horas, al igual que la transaminasa glutámico oxaloacético, la GPT presenta alto grado de especificidad para el sustrato. La principal aplicación de la determinación de esta enzima sérica reside en el diagnóstico de la destrucción hepatocelular (John, 2000).

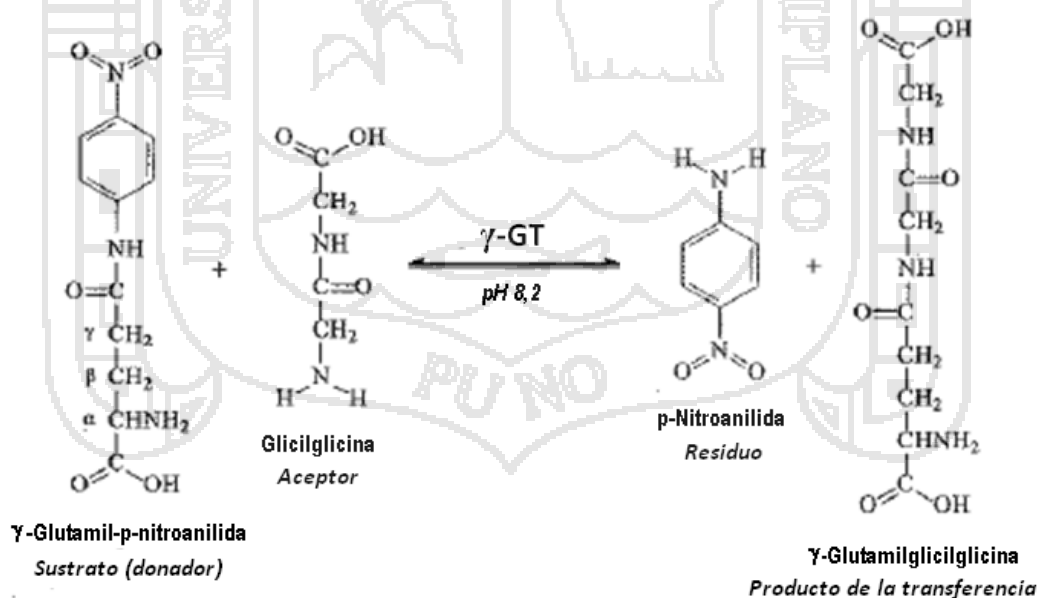
La GPT, se puede salir de la célula en cualquier situación en que la permeabilidad de la membrana celular se ve alterada; sin embargo, la célula no necesariamente deberá estar dañada en forma irreversible (McCurnin, 2001). La transaminasa glutámico pirúvico, suele estar aumentado por encima de sus valores normales en pacientes con hepatitis infecciosa, tumores hepáticos, degeneración

grasa del hígado, hepatopatías glucocorticoides, degeneración muscular (John, 2000).

La vida media de la ALT es aproximadamente 60 horas (2 a 3 días). El daño hepático agudo tiende a producir grandes elevaciones de actividad ALT, mientras que en el daño crónico la actividad ALT puede estar normal o moderadamente incrementada. El grado de incremento en la actividad ALT correlaciona con el número de hepatocitos dañados, el cual puede ser utilizado para evaluar la extensión del daño hepático (Fligio *et al.*, 2004).

c) Gamma glutamil transpeptidasa o γ -glutamil transferasa (GGT o γ -GT)

La GGT (EC 2.3.2.2; γ -glutamil-péptido: aminoácido γ -glutamiltransferasa) es una peptidasa que cataliza la transferencia del grupo γ -glutamil de péptidos y compuestos que lo contengan a un aceptor. La reacción de la GGT es la siguiente (Burtis *et al*, 2008).



La GGT está presente, en orden decreciente de abundancia, en: 1) túbulo proximal del riñón; 2) hígado; 3) páncreas; e 4) intestino. Es de localización

citoplasmática (microsomias) (Kumar y Clarck, 2005) pero la mayor parte se encuentra unida a la membrana celular transportando aminoácidos y péptidos dentro de la célula en forma de γ -glutamil-péptidos, (Burtis *et al.*, 2008). También se encuentra en epidídimo, corazón, pulmón, intestino delgado, médula, glándulas salivales, timo, bazo y cerebro. Actualmente, se conocen 11 isoenzimas de GGT (Kumar, 2005). La vida media de la GGT es de 4,1 días (Fligio *et al.*, 2004).

La GGT es un marcador sensible de enfermedad hepatobiliar; sin embargo, su utilidad clínica está limitada por la falta de especificidad. Está elevado en casos de obstrucciones biliares, neoplasmas hepáticos primarios o metastásicos; elevaciones moderadas en hepatitis infecciosa y pequeños aumentos en pacientes con hígado graso e intoxicación por drogas (Burtis *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2007). En el caso de las alteraciones hepáticas, la GGT generalmente es un indicador de agresión tóxica. No obstante, dada su inespecificidad, la determinación de GGT sólo tiene valor clínico cuando sus valores son comparados con los de otras enzimas de mayor especificidad de órgano (Kumar y Clarck, 2005).

La elevación de GGT es atribuido a dos causas: 1) elevada síntesis *de novo* como resultado de una inducción enzimática por diversas sustancias, ácidos biliares, así como por colestasis o por incrementada regeneración tisular; y 2) daño de la membrana celular del hepatocito. La GGT es un indicador sensible del daño hepatocelular. La GGT normal excluye una enfermedad hepática en 90-95% de casos (Kumar, 2005).

Las transaminasas tienen enormes variaciones entre laboratorios debido a la influencia de la temperatura, pH de sustrato, el tipo de sustrato y también se debe evitar que la muestra sea hemolizada porque el color puede interferir con las lecturas de la densidad óptica. Por ello cada laboratorio que efectuó las pruebas de

determinación de las transaminasas debe esta establecer sus propios valores normales para la especie en cuestión y para cada método de prueba (Bush, 1982). Otros factores que hacen variar la concentración de los valores normales de las transaminasas en el suero sanguíneo en estudio son los estados de nutrición de los animales y las condiciones medio ambientales donde vive el animal. La determinación de las transaminasas depende de la metodología y la técnica empleada, del conocimiento, destreza y habilidad del profesional que trabaja en un determinado laboratorio (McCurnin, 2001).

2.6. Antecedentes

Se estudió la actividad GOT, GPT y GGT en suero sanguíneo de ovinos Corriedale y Criollos con distomatosis hepática y sanos en la Comunidad de Orcoccca (Canas, Cusco). Los resultados en ovinos sanos fueron: GOT de 50 a 94.8 UI/L; GPT de 8.1 a 33.9 UI/L y GGT de 20.1 a 81.6 UI/L. En todos los casos la actividad fue mayor en ovinos Corriedale que en Criollos ($P \leq 0.01$) y no hubo efecto del sexo y clase ($P > 0.05$). En ovinos con distomatosis: GOT de 106.9 a 254.6 UI/L, siendo mayor en Corriedale que en Criollos ($P \leq 0.01$) y en adultos que en jóvenes ($P \leq 0.05$); GPT de 35 a 59.3 UI/L, no se encontró diferencias entre raza, clase y sexo ($P > 0.05$); y GGT de 120.3 a 249.3 UI/L siendo mayor en Corriedale que en Criollos ($P \leq 0.01$) y en adultos que en jóvenes ($P \leq 0.05$). En todos los casos no hubo efecto del sexo ($P > 0.05$) (Gutiérrez, 2006).

Se ha medido la actividad de las transaminasas (GOT y GPT) en vacunos Brown Swiss y Criollo del Distrito de Paucarcolla, Puno. Los resultados indican que los valores de GOT oscilan entre 79.5 a 125 UI/L, y los de GPT entre 10.02 a 42.0 UI/L. En ambos casos la actividad es mayor en el Brown Swiss que en el Criollo

($P \leq 0.01$), no encontrándose diferencias entre clase y sexo ($P > 0.05$) (Gutiérrez, 2005).

Se estudió eventuales cambios de los indicadores sanguíneos de daño hepático durante la fase subclínica (asintomática) de la fasciolosis. Se seleccionaron 56 muestras de sangre de novillos cruzados aparentemente sanos, en mataderos de zonas enzoóticas de la Provincia de Corrientes (Argentina). Posteriormente al sacrificio se estableció que 29 de ellos albergaba escasa a moderada cantidad de huevos en el hígado, permaneciendo libres del parásito los restantes. Con técnicas convencionales de laboratorio se efectuó eritrograma, leucograma, proteinograma, enzimograma (fosfatasa alcalina ALP, gamma-glutamilttransferasa GGT, aspartato aminotransferasa AST) y determinaciones de hierro, glucosa, bilirrubina y tiempo de protrombina. Los animales parasitados revelaron valores más elevados de leucocitos, eosinófilos, gamma globulinas y GGT que los controles ($p < 0,05$), signos inflamatorios que se imputan a una incipiente colangitis, propia de la fase subclínica de la distomatosis. No se verificaron cambios atribuibles a colestasis ni insuficiencia hepática (Mussart y Coppo, 2009).

Se determinaron los niveles séricos de gammaglutamil transpeptidasa (GGT) en ganado ovino infectado experimentalmente con *Fasciola hepática*, con el objeto de valorar el tiempo en que se normalizan después del tratamiento con triclabendazol. Se empleó un lote de corderos adultos y se conformaron 3 lotes de 5 animales cada uno. Los lotes 1 y 2 fueron infectados con 60 metacercarias de *Fasciola hepática*, los días 1, 30 y 75 del experimento. A los 90 días de la infección, se trató el lote 1 con triclabendazol a una dosis de 10 mg/kg; el lote 3 no fue infectado ni tratado, fue el testigo negativo. Los niveles séricos de GGT fueron

cuantificados 8 días antes de la infección y posteriormente cada 30 días durante 165. Se encontró un incremento significativo ($P < 0.05$) de GGT en los lotes 1 y 2 en relación con el 3 pos infección, con una x de 35.4 y de 44.7 UI, y un pico a los 90 días con un promedio de 71.7 y 57.3 UI, respectivamente. Los niveles séricos de GGT se normalizaron en los ovinos a los 75 días de haber sido tratados con triclabendazol (Faria *et al.*, 1995).

2.7. Valores normales de ALT, AST y GGT

En la tabla 2.1 se muestran valores de actividad enzimática de las enzimas ALT, AST y GGT en bovinos y ovinos según diferentes autores.

Tabla 2.1: Actividad de ALT, AST y GGT en bovinos y ovinos según autores (en UI/L).

ENZIMA	VACUNO	OVINO	AUTOR
AST (GOT)		43-127	Smith (1996)
	78-132		Kanecko et al (1997)
	66-230	49-123	Medway et al (1990)
	56-165	97-191	Coles (1968)
	45-110	49-123	Busch (1982)
ALT (GPT)	14-38	30-40	Kanecko et al (1997)
		15-44	Medway et al (1990)
	3-15	15-44	Busch (1982)
GGT	15-39	40-94	Smith (1996)
	10-40		Gilberto (1993)
		20-50	Kanecko et al (1997)
	7-35	30-60	Busch (1982)

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. **Ámbito de estudio**

El trabajo de investigación se realizó en la Microcuenca Larimayo, Distrito de Antauta, Melgar, Puno, cuya altitud, en general, del distrito de Antauta oscila entre 3,895 a 5,820 m. El área territorial del distrito de Antauta es de 636.17 km² ubicado en zonas de Puna húmeda y el 85% de la PEA vive fundamentalmente de la producción agropecuaria. La temperatura varía desde -25°C hasta 20°C con un clima frío y seco la mayor parte del año. Las precipitaciones pluviales están claramente diferenciados, la estación lluviosa ocurre entre diciembre y marzo, con una precipitación de 650 a 700 mm., tornándose el paisaje verdoso y muy atractivo; mientras, que en la estación seca entre abril y noviembre, la ausencia de lluvias hace que el paisaje se torne a un color amarillento (Estación Meteorológica de Macusani-Puno)

La crianza de ganado vacuno para la producción de leche y queso constituye el principal rubro productivo que sustenta la economía de las familias de Larimayo, seguida de la crianza de ganado ovino (producción de lana y carne) y alpacas en menor proporción (fibra). Actualmente, las familias disponen en promedio de 10 Vacunos/Unidad Productiva. Los productores cuentan con un promedio de 33 Ha con buenas extensiones de pastos naturales y buena disposición de agua. Los cultivos Forrajeros que se tiene en la Microcuenca Larimayo son permanentes y anuales entre ellas los cultivos de alfalfa, avena, Rye grass, trébol blanco, vicia y otros; así mismo existe ya una extensión de pastos cultivados que representa un 09% del territorio total. Se cuenta con canales de irrigación como también irrigación por inundación (PDC de Antauta, 2012).

El análisis de las muestras de heces y suero sanguíneo fueron analizadas en los Laboratorios de Parasitología y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano, respectivamente.

3.2. Animales de Estudio

Para el estudio, se utilizaron un total de 30 bovinos y 30 ovinos adultos de los cuales 15 animales de cada especie correspondían a animales con fasciolosis crónica y 15 sin la enfermedad (negativos a la Prueba de Stoll Modificado). La distribución de los grupos se muestra en la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Distribución de muestras por especie según estado del animal de la Microcuenca Larimayo

ESTADO DEL ANIMAL	ESPECIE		TOTAL
	BOVINO	OVINO	
Con fasciolosis (Experimental)	15	15	30
Sin fasciolosis (Control)	15	15	30
TOTAL	30	30	60

Para alcanzar el número de animales con y sin fasciolosis se muestrearon tantos animales como se pudo (muestreo no probabilístico)

3.3. Unidades de análisis

El material biológico lo constituyeron muestras heces y sangre de animales con y sin fasciolosis crónica de ovinos y vacunos.

3.4. Materiales, Equipos y Reactivos.

De campo

- Alcohol yodado.
- Torunda de algodón.
- Tubos y agujas vacutainer de 10 mL.
- Bolsas de polietileno.
- Gradilla.
- Cuaderno para el registro de las muestras.
- Jeringas y agujas (16 y 18 GX 1½") descartables.
- Caja teknoport con hielo.
- Marcadores.

Obtención de suero

- Centrifuga IEC Internacinal Centrifuge USA.
- Viales de plástico de 5 mL.
- Pipetas Pasteur (0.5, 1.5 y 10 mL.).
- Gradillas.
- Congeladora.

Análisis de laboratorio

- Cronómetro.
- Estufa.
- Espectrofotómetro
- Tubos de prueba de 10 mL.
- Pipetas graduadas.

- Micropipetas automáticas.
- Baño maría.

Reactivos

- Kits para determinaciones de actividades enzimáticas de ALT, AST y GGT de Wiener ®, Argentina.
- Agua bidestilada.

3.5. Metodología

a) Toma de muestras y conservación

Heces

Para el estudio coproparasitológico se obtuvieron muestras de heces en tempranas horas del día directamente del recto del animal utilizando bolsas de polietileno en cantidades aproximadas de 10 a 30 g. Las muestras se colocaron en caja refrigerada conteniendo hielo para su traslado a la ciudad de Puno el mismo día de muestreo. El análisis se realizó al día siguiente del muestreo en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Sangre

Para el estudio enzimático se tomaron muestras de sangre en un volumen aproximado de 5 mL sin anticoagulante. En el caso de vacunos, las muestras se tomaron de la vena yugular utilizando agujas N° 16 previa antisepsia de la región, la sangre se colectó en tubos de 10 mL los cuales fueron colocados en la caja refrigerada debidamente rotuladas. Para el caso de ovinos, la sangre se obtuvo mediante venipunción radial utilizando agujas y tubos

vacutainer sin anticoagulante. Todas las muestras se trasladaron a la ciudad de Puno el mismo día de su obtención.

b) Obtención de suero sanguíneo

En el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos. El suero obtenido se decantó en viales eppendorf de 2 mL y conservados en congeladora (-20°C) hasta el momento de su procesamiento.

c) Diagnóstico de fasciolosis crónica

Con la finalidad de determinar los animales positivos y negativos a fasciolosis crónica, se analizó las heces por el Método de Stoll Modificado a fin de detectar la presencia de huevos de fasciola hepática ya que en esta forma, el verme elimina huevos por la bilis los que aparecerán en las heces, lo cual permite realizar el diagnóstico coprológico para los individuos que presenten un cuadro crónico.

El protocolo que se siguió fue el siguiente:

- Pesar 3 g de heces.
- Colocar en un mortero con 42 mL de agua desmineralizada y homogenizarlo completamente.
- Filtrar el contenido a través de un embudo con malla metálica.
- Suspender el filtrado en un tubo de prueba de 15 mL
- Llevar a la centrifuga a 200 rpm durante 2 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y rehomogenizar con solución azucarada saturada en tres partes, hasta eliminar el sedimento completamente.

- Homogenizar constantemente y aspirar 0.15 mL del homogenizado con una jeringa de tuberculina.
- Colocar la solución en una lámina portaobjeto en dos partes.
- Colocar la laminilla cubreobjetos en las dos partes.
- Observar al microscopio a 10X para realizar el conteo de los huevos de parásitos.
- Una vez realizado el conteo en los dos cuadrantes, multiplicar por 100, para obtener el resultado de la carga parasitaria.

d) Determinación de la actividad enzimática

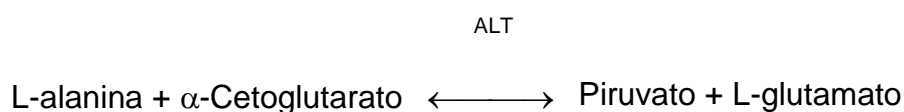
El análisis bioquímico de las muestras de suero sanguíneo se realizó utilizando protocolos estandarizados de la firma comercial (Wiener Lab, Argentina). El análisis de cada muestra fue hecho por triplicado, reportándose su valor promedio.

Las actividades enzimáticas de las enzimas estudiadas se expresan en Unidades Internacionales por Litro (UI/L ó U/L) que equivale a los micromoles de producto formado (o sustrato transformado) por la enzima en un minuto por litro de solución ($\mu\text{mol}/\text{min}$).

Alanina aminotransferasa (ALT o GPT)

Técnica. - Método colorimétrico (Reitman y Frankel)

Fundamento. - La ALT cataliza la siguiente reacción:



El piruvato formado reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina produciéndose, en medio alcalino, un compuesto coloreado que se mide a 505 nm.

Procedimiento.- Los reactivos y el protocolo seguido para la determinación de la actividad ALT se encuentra en el anexo 1. El mismo que incluye dos procesos:

Elaboración de la curva de calibración y determinación de la ecuación lineal

Se siguió el protocolo descrito en el Anexo 1 (inc. 1) con cuyos resultados se graficó la curva de calibración (anexo 1, inc. 2) y la siguiente ecuación lineal ($R^2=99.67\%$):

$$A = 0,0025 AE - 0,0019$$

Donde:

AE = Actividad enzimática ALT (en U/L).

A = Absorbancia de la muestra.

Determinación de la actividad ALT en las muestras

Siguiendo el protocolo (anexo 1, inc. 3) y utilizando la ecuación anterior se determinó la actividad de la ALT en todas las muestras de suero sanguíneo.

Aspartato aminotransferasa (AST o GOT)

Técnica.- Método colorimétrico (Reitman y Frankel)

Fundamento.- La AST cataliza la siguiente reacción:



El oxalacetato es muy inestable y se transforma en piruvato el cual reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina produciéndose, en medio alcalino, un compuesto coloreado que se mide a 505 nm.

Procedimiento.- De igual modo tanto los reactivos y protocolos se encuentran en el anexo 2. El procedimiento incluye dos pasos:

Elaboración de la curva de calibración y determinación de la ecuación lineal

Los resultados del protocolo seguido (inc. 1 del anexo 2) permitieron graficar la curva de calibración de AST (inc. 2 del anexo 2) y el cálculo de ecuación de regresión lineal siguiente ($R^2=99.93\%$):

$$A = 0,0068 AE + 0,0089$$

Donde:

AE = Actividad enzimática AST (en U/L)

A = Absorbancia neta de la muestra.

Determinación de la actividad AST en las muestras

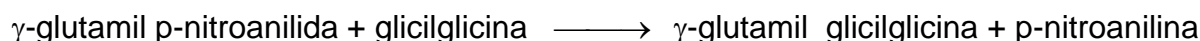
Siguiendo el protocolo (anexo 2, inc. 3) y utilizando la ecuación anterior se determinó la actividad de la ALT en todas las muestras de suero sanguíneo.

Gamma glutamil transferasa (GGT o γ -GT)

Técnica.- Método colorimétrico de punto final

Fundamento. La γ -GT cataliza la siguiente reacción:

GGT



Por diazotación de la p-nitroanilina y posterior copulación con un compuesto de naturaleza fenólica se obtiene un producto coloreado que se lee a 500 nm.

Procedimiento. - Tal como indica el anexo 3. Incluye dos pasos:

Determinación del Factor de Colorimétrico (Fc)

Con el protocolo seguido (inc.1 del anexo 3) se determinó siguiente el

Factor Colorimétrico (Fc):

$$Fc = \frac{[St]}{Ast} = \frac{100 \text{ U/L}}{0,28} = 357,14 \text{ U/L}$$

Dónde:

[St] = Concentración del estándar (en U/L) = 100 U/L

Ast = Absorbancia del estándar calculado = 0,28

Determinación de la actividad GGT en las muestras

Siguiendo el protocolo (inc. 2 del anexo 3) la actividad GGT se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$GGT \text{ (U/L)} = Fc \times A = 357.14 \times A$$

Dónde:

Fc = Factor colorimétrico

A = Absorbancia de la muestra.

3.6. Análisis Estadístico

Para determinar la diferencia estadística entre los promedios de actividad enzimática de las enzimas estudiadas se utilizó la Prueba “t” de Student para muestras independientes, cuya fórmula es la siguiente:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{s_1^2 / n_1 + s_2^2 / n_2}}$$

Dónde:

M_1 : Media de animales con Fasciola.

M_2 : Media de animales sin Fasciola.

S^2_1 : Varianza de animales con Fasciola.

S^2_2 : Varianza de animales sin Fasciola.

N_1 : Población de animales con Fasciola.

N_2 : Población de animales sin Fasciola.

En los resultados se reportan estadísticos de tendencia central y de dispersión: promedio, desviación estándar de la media, coeficiente de variabilidad y valores extremos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Actividad de Marcadores Enzimáticos en Bovinos Positivos y Negativos a Fasciolosis Crónica.

a) Aspartato aminotransferasa (AST o GOT).

Los resultados encontrados en el presente estudio sobre AST sérico se encuentra en el anexo 4 y sus parámetros estadísticos se resumen en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Actividad AST (UI/L) en vacunos con y sin fasciolosis crónica, al diagnóstico por el método de Stoll modificado.

Estado sanitario	n	Prom. \pm E.E.	CV (%)	Valores extremos
Positivos	15	94.23 \pm 3.51 ^a	14.44	80.44 – 120.04
Negativos	15	60.63 \pm 2.65 ^b	16.99	45.24 – 72.04
Total	30			45.24 -120.04

La prueba de “t” (anexo 5) demuestra que la actividad AST es mayor en vacunos positivos a fasciolosis crónica que en negativos ($P \leq 0,05$); Esto se debería a que los parásitos presentes en el hígado producen profundas alteraciones metabólicas y muerte de las células hepáticas, con lo que se derrama el líquido intracelular al plasma sanguíneo, así lo corroboran muchos investigadores como Morales *et al.*, (2004). Además, Morlan y col. (1987); Doxey (1987) y Leguía (1988), mencionan que las larvas de la *Fasciola hepática* producen un daño traumático durante su migración al pasar a través del tejido hepático, dejando túneles rodeados por hemorragias, necrosis y evidencias de sedimentos fibrinohemorrágicos

produciendo el aumento de los niveles séricos de las transaminasas en el plasma sanguíneo. Burtis *et al.* (2008) también señala que la elevación de la actividad enzimática en el plasma y otros líquidos se produce por: a) necrosis (destrucción celular), b) aumento de la permeabilidad de membrana, c) sobreproducción de enzimas (mayor metabolismo en un tejido, e.g. neoplasia), d) menor eliminación (e.g. por obstrucción biliar), y e) incremento de células inflamatorias.

Los resultados obtenidos en el presente estudio se encuentran dentro del rango establecido por distintos autores, entre ellos: Kanecko *et al.* (1997), Medway *et al.* (1990); Coles (1968) y Busch (1982). Del mismo modo, comparando con los resultados obtenidos por Gutierrez (2005), encuentra valores similares, excepto en el límite inferior, hecho que podría atribuirse a la zona de estudio y a la técnica utilizada. Mientras que el presente estudio fue realizado en Larimayo, Gutierrez realiza su estudio en Paucarcolla, dos zonas de diferente piso altitudinal. Además, Gutierrez utiliza reactivos de marca Point Cientific y en el presente estudio se utiliza reactivos de la marca Wiener. Burtis *et al.* (2008) confirma esta hipótesis al indicar que los factores ambientales que pueden afectar los resultados de laboratorio incluyen la altitud, la temperatura ambiental, la localización geográfica y las estaciones del año.

b) Alanina aminotransferasa (ALT o GPT).

En el anexo 6 se muestran los resultados individuales encontrados en el presente estudio de ALT en suero sanguíneo. En la Tabla 4.2 se reportan los principales estadísticos.

Tabla 4.2: Actividad de la ALT (UI/L) en vacunos con y sin fasciolosis crónica, al diagnóstico por el método Stoll modificado.

Estado sanitario	N	Prom. ± E.E.	CV (%)	Valores extremos
Positivos	15	12.14±0.47 ^a	15.12	10.16 – 15.16
Negativos	15	7.16±0.30 ^b	16.28	5.60 – 8.69
Total	30			5.60 – 15.16

Con la finalidad de comparar los promedios de los animales positivos y negativos a fasciolosis crónica se ha realizado la prueba de “t” (anexo 7), cuyo resultado indica una diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$), lo que significa que la actividad enzimática de la ALT en animales infectados con *fasciola* es mayor que en las no infectadas. Las razones de esta diferencia se debería al daño causado por el parásito en el hígado, tal como fue explicado para el caso de AST.

Balcells (2001) indica que la ALT es una enzima citoplásmica hepatocelular, con gran concentración en el hígado y en menor medida en los riñones, corazón y músculos, por eso un aumento sérico de ALT es señal de lesión hepática. Fligio *et al.* (2004) también señala que el daño hepático agudo tiende a producir grandes elevaciones de actividad ALT, mientras que en el daño crónico la actividad ALT puede estar normal o moderadamente incrementada; y el grado de incremento en la actividad ALT está relacionado con el número de hepatocitos dañados.

Los valores de ALT encontrados en el presente estudio se encuentran dentro del rango establecido por Busch (1982), pero por debajo de Kanecko *et al.* (1997) quien indica que los valores normales están entre 14 y 38 UI/L, hecho que podría

atribuirse a la técnica utilizada, zona de estudio u otro factor que no se discute por cuanto dicho autor no especifica estos detalles. Del mismo modo, Zapata *et al.* (1997) encontraron valores que oscilan entre 6.9 a 35.3 UI/L de ALT, rango en el que se encuentran los resultados del presente estudio.

En el estudio de Gutierrez (2005), encuentra valores un promedio de ALT de 19.57UI/L, con valores extremos de 10.20 a 42.00UI/L, la diferencia de estos valores se debería a los diferentes lugares de estudio, tipo de alimentación, carga parasitaria entre otros. A la fecha existen pocos estudios de investigación respecto a la actividad enzimática de la ALT, y de los que encontramos en bibliografía estos alcanzan valores en forma general y en alguno de ellos indicando sus valores extremos y por lo tanto nos encontramos limitados a profundizar las discusiones por la influencia o no de los factores que posibilitan las variación no solamente entre especies, sino dentro de la misma especie, tal como nos propusimos en el presente estudio que vendría a ser influenciadas por la carga parasitaria (número de metacercarias ingeridas por animal).

c) γ -glutamilttransferasa (GGT o γ -GT)

Los resultados encontrados en el presente trabajo sobre γ -glutamilttransferasa (GGT) sérico se encuentran en los anexos 8 y 9, y cuyos parámetros estadísticos se detallan en la tabla 4.3.

Tabla 4.3: Actividad γ -glutamilttransferasa (GGT) (UI/L) en vacunos con y sin fasciolosis crónica, al diagnóstico por el método Stoll modificado.

Estado sanitario	N	Prom. \pm E.E.	CV (%)	Valores extremos
Positivos	15	110.66 \pm 5.08 ^a	17.80	81.45 – 140.12
Negativos	15	43.13 \pm 2.03 ^b	18.30	28..18 – 55.20
Total	30			28.18 – 140.12

Con la finalidad de comparar las respuestas de las medias aritméticas se ha realizado la prueba de “t”, (anexo 10), cuyo resultado indica una diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$). Lo que significa que la actividad enzimática de la γ -glutamilttransferasa (GGT) es mayor en animales infectados con fasciolosis que en los no infectados.

Doxey (1987) y Gilberto (1993) indican que los valores de GGT se elevan intensamente en casos de obstrucción de los conductos biliares por fibrosis y los parásitos, lo que se debe a un mecanismo de inducción enzimática a nivel microsomal. Por otro lado Leguia (1988) menciona que estas diferencias se deberían a los cambios en el nivel de proteínas séricas por efecto de mayor o menor infección por distomatosis que producen lesiones tisulares. También Salgado (1996), Benjamin (1990) y Kraft (1998) afirman que los daños hepáticos aumentan considerablemente la concentración de GGT. Igualmente, Leguia (1988) manifiesta que los animales afectados con distomatosis están anémicos y tienen bajos valores de proteínas séricas con modificaciones en la composición corporal y metabolismo energético, consecuentemente, hay aumento de la GGT.

Comparando nuestros resultados con los reportados por Smith (1996), Gilberto (1993) y Bush (1982), éstos se encuentran dentro del rango establecido por estos autores, excepto en los animales positivos a fasciolosis que se encuentra muy elevado, atribuible al daño hepático causado por el parásito, tal como se explicó en los párrafos precedentes.

4.2. Actividad de Marcadores Enzimáticos en Ovinos Positivos y Negativos a Fasciolosis Crónica.

a) Aspartato aminotransferasa (AST o GOT).

Los resultados encontrados en el presente estudio sobre AST sérico en suero sanguíneo de ovinos se encuentran en el anexo 11. En la Tabla 4.4 se muestran los parámetros estadísticos.

Tabla 4.4: Actividad de AST (UI/L) en ovinos con y sin fasciolosis crónica, al diagnóstico por el método stoll modificado.

Estado sanitario	N	Prom. ± E.E.	CV (%)	Valores extremos
Positivos	15	97.13±3.94 ^a	15.74	81.24 – 126.84
Negativos	15	66.01±3.01 ^b	17.69	48.04 – 78.44
Total	30			48.04 – 126.84

La prueba de “t” (anexo 12) demuestra que el promedio de la actividad enzimática de la AST en ovinos es mayor en animales positivos a fasciolosis (97.13±3.94UI/L) que en animales negativos (66.01±3.01UI/L) (P≤0.05). Al igual que en los vacunos, esto se debería al daño hepático causado por el parásito en el hígado de los ovinos en estudio. Gilberto (1993) señala que los valores de AST

sérico se encuentran elevadas por encima de sus valores normales cuando se presentan procesos anormales en el organismo animal, como en el caso de enfermedades hepáticas; así mismo se encuentran elevadas en estados de inflamación y necrosis del hígado.

Otros autores que refuerzan la hipótesis del daño hepático son Morlan y col. (1987); Doxey (1987) y Leguía (1988) al indicar que las larvas de la *Fasciola hepática* producen un daño traumático durante su migración al pasar a través del tejido hepático, dejando túneles rodeados por hemorragias, necrosis y evidencias de sedimentos fibrinohemorrágicos produciendo el aumento de los niveles séricos de las transaminasas en el plasma sanguíneo. Además, Leguía (1988) reporta que en una infección moderada de distomatosis hepática, se produce un aumento en los niveles séricos de la enzima AST.

Romero (1999) afirma que en una invasión parasitaria, puede llevar a alteraciones de la permeabilidad de la membrana del hepatocito y consiguientemente a la liberación anormal de la AST al torrente sanguíneo. Estas consideraciones suponen la existencia de gran número de animales enfermos debido al mayor grado de infestación de caracoles que hay en las áreas de pastoreo, que son ingeridos por los ovinos susceptibles a la infección por el hábito de pastoreo al ras del suelo que favorece la ingestión de metacercarias, produciéndose de esta manera niveles altos de infestación en el medio ambiente. Este fenómeno se debe, no solo por la falta de adecuados programas de control, sino también por la sobrepoblación animal, siendo esto más dramático, en comunidades campesinas donde se explotan estos animales.

Leguía (1988), Morlan y col. (1987) señalan que el nivel de ingestión de metacercarias por ovino está en función del huésped-parasito, afectados por mal

hábito de pastoreo, grado de infección de pasturas, etc. Pezo y col. (2001) publicaron trabajos basados en experimentos previos, midiendo los niveles séricos de AST en borregas artificialmente infestados y tratados con fasciolicidas; las variaciones individuales fueron muy marcadas y los niveles séricos de AST muy variados.

Comparando los resultados de actividad AST del presente estudio, éstos se encuentran dentro del rango establecido por la mayoría de autores. Por ejemplo, Medway y col. (1990) indica que los valores normales oscilan entre 49 a 123.3UI/L. Igualmente, Smith (1996) reporta valores de 60 a 280UI/L para ovinos; Zapata y Fajardo (1997) reportan de 49 a 123.3UI/L, entre otros. Las pequeñas diferencias se deberían a las diversas condiciones en que establecieron estos datos. Los autores citados no mencionan el lugar de estudios, las condiciones de manejo, alimentación, variación individual de acuerdo a las condiciones fisiológicas o bioquímicas, estos pueden influir en la variación. Así lo enfatizan Flower y Zinkl (1989), Leguia (1988), Dukes (1981), Gonzales y col. (1998) y Guyton (1988) al señalar que los valores pueden variar según factores alimenticios, ubicación geográfica (altitud y latitud), además mencionan que cada organismo reacciona constantemente y compete con todos los elementos vivos e inanimados, que entran en contacto, con los cambios bruscos que ocurren en el medio ambiente y tienen efectos dañinos, que convierten en traumas fisiológicas y pueden cambiar la actividad enzimática. Las condiciones medio ambientales en la altura, son diferentes a las del nivel del mar, así los animales dependen de la producción de energía de las células, cualquier proceso que altere la producción energética bien sea por disminución de sustratos oxidativas o factores que hacen variar el comportamiento fisiológico de sus componentes bioquímicos en los animales, como

el caso de la hipoxia, temperaturas bajas, menor humedad relativa, la mayor radiación solar, deficiencias nutricionales y parasitarias, que actúan desfavorablemente en los organismos de los animales. Los mamíferos tienden a desarrollar cambios morfodinámicos en su comportamiento biológico para atenuar en forma prioritaria la hipoxia.

b) Alanina aminotransferasa (ALT o GPT).

En la Tabla 4.5 se reportan los parámetros estadísticos de la actividad de la enzima ALT en ovinos con y sin fasciolosis crónica. Los resultados individuales en el anexo 13.

Tabla 4.5: Actividad ALT (UI/L) en ovinos con y sin fasciolosis crónica, al diagnóstico por el método stoll modificado.

Estado sanitario	n	Prom. ± E.E.	CV (%)	Valores extremos
Positivos	15	9.52±0.32 ^a	13.33	8.25 – 13.10
Negativos	15	6.38±0.27 ^b	16.55	5.01 – 8.10
Total	30			5.01 – 13.10

Como se aprecia, el promedio de la actividad enzimática de la ALT es significativamente superior en ovinos positivos a fasciola (9.52±0.32 UI/L) que en animales negativos (6.38±0.27 UI/L) ($p \leq 0.05$). La prueba de “t” se encuentra en el anexo 14. Las razones de esta elevación se deberían a las mismas razones que las explicadas en el caso de vacunos y de AST. Es decir, al daño hepático causado por la presencia del parásito.

Bush (1982) y Benjamín (1991) indica que la ALT, suele estar aumentado por encima de sus valores normales en pacientes con hepatitis infecciosa, tumores hepáticos, degeneración grasa del hígado. El hallazgo de niveles de ALT elevados en la sangre indica su liberación de las células y tejidos lesionados. No es necesario que las células de los tejidos se destruyan completamente antes de que se libere la ALT puede “fugarse” a través de la membrana celular de las células lesionadas.

Los resultados de ALT en ovinos sin fasciola mostraron rangos de 5.01 a 8.10 UI/L, con un promedio 6.38 ± 0.27 UI/L. Al respecto, Medway y col. (1990) pública rangos normales en ovinos de 14.4 a 43.89 UI/L y Kanecko y col. (1997) rangos normales de 30 a 40 UI/L. Puede observarse que nuestros resultados se encuentran dentro de los rangos reportados por Medway y col. (1990) lo contrario ocurre con lo señalado por Kanecko y col. (1997) comparativamente los extremos inferiores son casi tres veces mayor a los resultados del extremo inferior del presente trabajo. Del mismo modo, al realizar una comparación con otros autores como Medway y col. (1990), que publican valores de 5 a 55 UI/L y Zarco y col. (2002) de 10 a 40 UI/L se observa los resultados del presente estudio se encuentran dentro de los valores citados por estos autores.

c) γ -glutamyltransferasa (GGT o γ -GT)

Los resultados encontrados en el presente trabajo sobre γ -glutamyltransferasa (GGT) sérico se encuentran en los anexos 15 y 16, y cuyos parámetros estadísticos se resumen en la tabla 4.6.

Tabla 4.6: Actividad GGT (UI/L) en ovinos con y sin fasciolosis crónica, al diagnóstico por el método Stoll modificado.

Estado sanitario	N	Prom. ± E.E.	CV (%)	Valores extremos
Positivos	15	168.99±6.83 ^a	17.80	81.45 – 140.12
Negativos	15	87.52±3.96 ^b	18.30	28.18_ 55.20
Total	30			28.18 – 140.12

La prueba de “t” (anexo 17) demuestra que el promedio de la actividad enzimática de Y-glutamilttransferasa (GGT) estadísticamente es superior en animales positivos (168.99±6.83UI/L) que en animales negativos (87.52±3.96UI/L). Como se explicó anteriormente, la GGT aparece aumentada considerablemente por encima de sus valores normales en una gran variedad de enfermedades que implican trastornos de la permeabilidad de la membrana celular o necrosis celular tales como hepatitis, cirrosis biliar, obstrucción de las vías biliares, insuficiencia renal y tumores cerebrales, así lo corroboran Salgado (1995) y Kraft (1998).

Igualmente, Doxey (1987) y Gilberto (1993) indican que los valores de GGT se incrementan intensamente en casos de obstrucción de los conductos biliares por fibrosis y los parásitos, lo que se debe a un mecanismo de inducción enzimática a nivel microsomal.

Por otro lado, Leguía (1988) menciona que estas diferencias se deberían a los cambios en el nivel de proteínas séricas por efecto de mayor o menor infección por distomatosis que producen lesiones tisulares. También Salgado (1996); Benjamín (1991) y Kraft (1998) afirman que los daños hepáticos aumentan

considerablemente la concentración de GGT. Igualmente Benjamín (1990); Doxey (1987) y Leguía (1988) dice que los animales afectados con distomatosis están anémicos y tienen bajos valores de proteínas séricas con modificaciones en la composición corporal y metabolismo energético, consecuentemente, hay aumento de la GGT.

La GGT en ovinos sanos presentó rangos de 28.18 a 55.20 UI/L, con un promedio de 87.52 ± 3.96 UI/L, dichos resultados son similares a los obtenidos en ovinos por Smith (1996) que reporta valores de 40 a 94 UI/L, rango en el que se encuentra el resultado del presente trabajo, pero cuyo límite inferior es aproximadamente más de dos veces al extremo inferior a los resultados obtenidos en el presente trabajo. Kanecko y col. (1997) encuentra valores de 20 a 52 UI/L, en ovinos, rango en el que también se encuentra los resultados del presente estudio.

La GGT en ovinos con distomatosis hepática fue de 81.45 a 140.12 UI/L, con un promedio de 168.99 ± 6.83 UI/L, es superior comparados a los valores observados en los ovinos sin fasciolosis (sanos) ($p \leq 0.05$). Faria y col. (1996) realizando un estudio en ovinos infectados experimentalmente con metacercarias de *Fasciola hepática* determinaron valores de 19.6 a 32.6 UI/L, en el día 30; 29.5 a 41.6 UI/L, en el día 60 y 40.7 a 87.4 UI/L, en el día 90 pos infección. Como se observa los valores reportados por Faria y col. (1996) son inferiores sobre los resultados obtenidos. Doxey (1987) reporta que las concentraciones de GGT en el suero aumentan en casos avanzados de fasciolosis en forma marcada hasta niveles superiores a 100 UI/L, sobre todo en la fase que afectan a los conductos biliares en ovinos, Pezo y col. (2001) menciona rangos de 116.5 UI/L, en alpacas parasitados con distomatosis. Es de anotar que los valores de GGT reportado por

los autores Doxey (1987); Pezo y col. (2001) se hallan ligeramente por debajo de los límites inferiores de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Doxey (1987) determinó concentraciones crecientes en animales con daños en los conductos biliares; además publica valores de 600 UI/L, después de dos días y 2000 UI/L, después de cuatro semanas realizados en una obstrucción experimental de conductos biliares de perros. Coles (1968) afirma que a medida que las enzimas son destruidas en el torrente circulatorio los valores declinarán rápidamente después que ha pasado la fase de daño agudo, por lo que las concentraciones de enzimas en el suero muestran las grandes desviaciones diagnósticas respecto de los normales en la fase aguda de cualquier daño a nivel del tejido, consideraciones que se aplican a todas las enzimas mencionadas con la excepción de la GGT, que permanece con valores elevados en ciertas enfermedades crónicas.

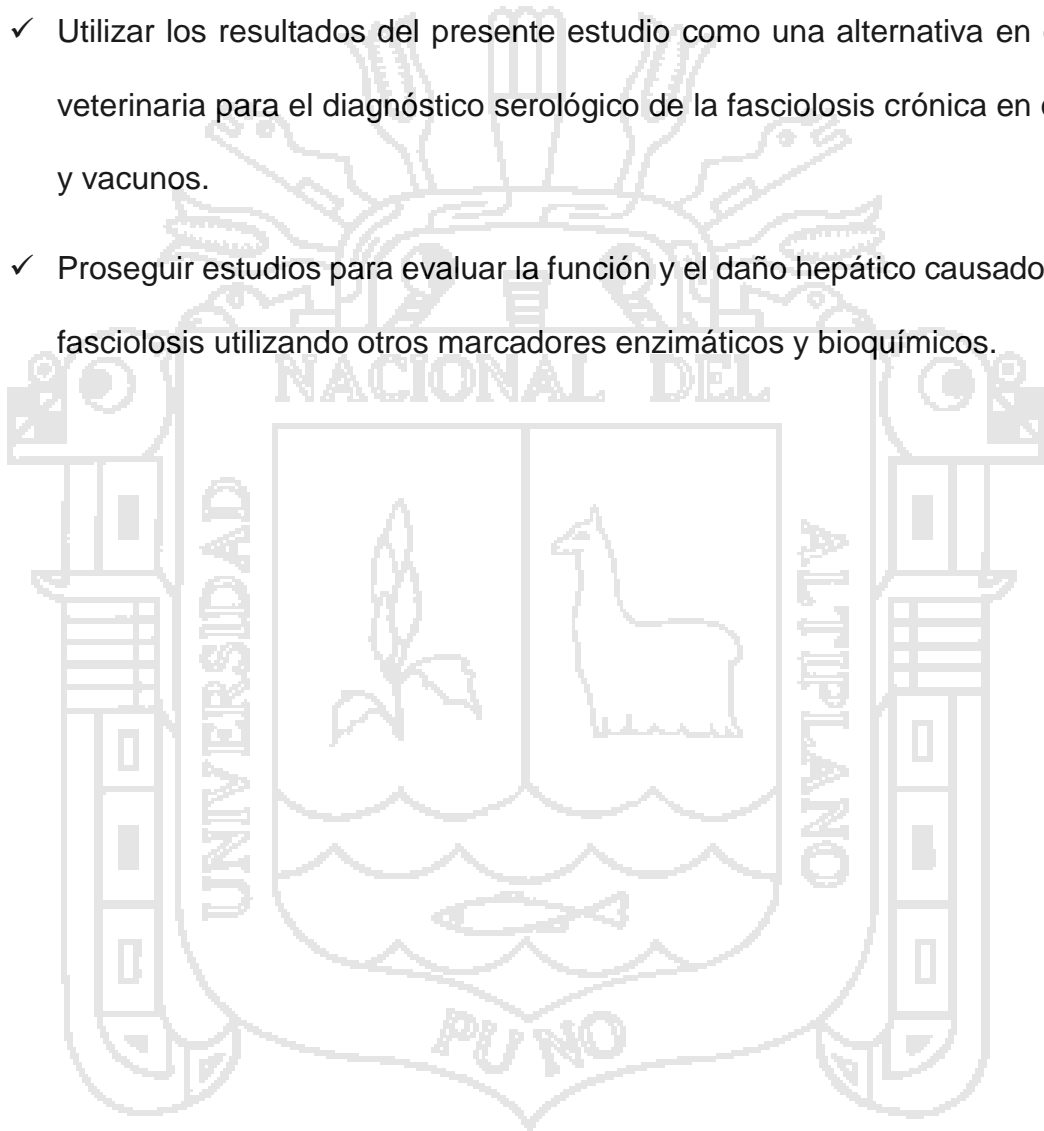
Faria y col. (1996) mencionan que el pico de la GGT está asociada con el pico de prepatencia, y el daño del tejido epitelial, causado por la actividad alimenticia del parásito y con el movimiento de las fasciolas al momento de establecerse en el interior de los conductos biliares, indicando que pocas metacercarias en ovejas producen suficiente daño hepático como para incrementar las concentraciones de las enzimas en el suero sanguíneo. Permaneciendo en niveles altos mientras las fasciolas se encuentran alojados en los conductos biliares.

V. CONCLUSIONES

- ✓ En vacunos la actividad AST fue de 94.23 y 60.63 UI/L; para ALT de 12.14 y 7.16 UI/L y para GGT de 110.66 y 43.13 UI/L, en los animales positivos y negativos a la técnica de Stoll modificado para el diagnóstico de la fasciolosis, respectivamente.
- ✓ En ovinos la actividad de la AST fue de 97.13 y 66.01 UI/L; en ALT de 9.52 y 6.38 UI/L y para GGT de 168.99 y 87.52 UI/L, para los positivos y negativos a la técnica de Stoll modificado para el diagnóstico de la fasciolosis, respectivamente.
- ✓ En todos los casos, la actividad enzimática de los animales positivos a la fasciolosis crónica son más elevadas que en los animales negativos ($P \leq 0.05$), concluyéndose que hay daño estructural y funcional del hígado por la presencia de la fasciola, tanto en bovinos y ovinos.

VI. RECOMENDACIONES

- ✓ Estudiar el daño hepático en vacunos y ovinos causado por la fasciolosis en las diferentes fases del parásito: pre-patente, patente y post-patente.
- ✓ Utilizar los resultados del presente estudio como una alternativa en clínica veterinaria para el diagnóstico serológico de la fasciolosis crónica en ovinos y vacunos.
- ✓ Proseguir estudios para evaluar la función y el daño hepático causado por la fasciolosis utilizando otros marcadores enzimáticos y bioquímicos.



VII. **BIBLIOGRAFÍA**

- Andresen, H. 2009. Disfunción hepática. UNMSM, Lima-Perú.
- Balcells, A. 2001. La clínica y el laboratorio. 18^{ava} edición. Editorial Masson.
- Becerra, M. 2000. Consideraciones sobre estrategias sostenibles para el control de Fasciola hepática en Latinoamérica. Universidad de Pamplona.- Revista colombiana de ciencias pecuarias.Vol.14:1,2001.
- Benjamim, M. 1991. Manual de patología clínica en veterinaria. Editorial Limusa Mexico
- Benjamín, M.1991. Manual de patología clínica en veterinaria. 3^{ra} Edición. Editorial Limusa México.
- Braunwald, E.; A. Fauci; D. Kasper; S. Hauser; D. Longo. And L. Jameson. 2001 Harrison's principles of internal medicine. 15th edition. McGraw-Hill, Medical Publishing Division.
- Burtis, C., E. Ashwood & D. Bruns. 2008. tiezfundametals of clinical chemistry. Sixth edition, saunders-elsevierinc.
- Bush, B. M. 1982. Manual del laboratorio veterinario de análisis clínicos. Edit Acribia, Zaragoza, España.
- Carrada-Bravo, T. 2007. Fasciolosis, Diagnóstico, Epidemiología, y Tratamiento. Guanajuato México.
- Coles, E. 1968. Patología y diagnóstico veterinario. Primera Edición. Editorial Interamericana. S.A. México.

- Cordero del Campillo, M. 2002. Parasitología Veterinaria. Primera Edición. Editorial. McGraw-hill. Interamericana de España.
- Devlin, T. 1997. Textbook of Biochemistry whit Clinical Correlations. Fourth edition. Wiley-Liss, Inc.
- Doxey, D.L. 1987. Patología Clínica y Procedimientos de Diagnóstico en Veterinaria. *El Manual Moderno*, México, D.F-
- Drepper, K. & C.P. Kenberburg. 1984. Activity of some specific enzymes in the serum of sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Tieraerztl. Umsch.*
- Dukes, H.H. & M.J. Swenson. 1981. Fisiología de los Animales Domésticos. Cuarta edición. Aguilar Editor, S.A., México D.F.
- Espinoza, J., A. Terashima, P. Herrera-Velit y L. Marcos. 2010. Fasciolosis humana y animal en el Perú: impacto en la economía de las zonas endémicas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*; 27(4): 604-12.
- Faria, L., H. Romero, I. Reyna y E. Salcedo. 1995. Tiempo de normalización de los niveles de GGT en ovinos con fasciolosis experimental tratados con tricabendazol. UNA de México. *Revista veterinaria*, volume 27.
- Faria, S.L.S., R.H. Quiroz, V.F. Ibarra, S.M.R. Sanchez, y E.R. Salcedo. 1996. Tiempo de normalización de los niveles gammaglutamil transpeptidasa en ovinos con fasciolosis experimental tratados con triclabendazol. *Vet. Mexico*, 27:235-239.
- Fauci, A., E. Braunwald, D. Kasper, S. Hauser, D. Longo, J. Jameson & J. Loscalzo 2008. Harrison's principles of internal medicine. 17th edition. The McGraw-Hill Companies, Inc.

- Figlio, D., H. Tarpley, K. Latimer and P. Bain. 2004. A Brief Review of Alanine Aminotransferase Activity. Class of Department of Pathology, College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens.
- Fowler, W., and D. Zinkl. 1989. Reference ranges for hematologic and serum biochemical values in Llamas (Lama Glama). Am. Journal of veterinary research, vol. 50, N 12.
- Gilberto, M. 1993. Interpretación clínica del laboratorio. Cuarta Edición. Editorial Médica Panamericana Bogotá Colombia.
- Giraldo, DM. 2009. Animal Health. Atlantic International University.
- Gonzales, J., E. Arilla, M. Rodríguez, y A. Sánchez. 1998. Bioquímica clínica. Primera Edición. Editorial McGraw-Hill. Interamericana.
- Gutierrez, C. 2006. Actividad de las transaminasas glutámico oxaloacético piruvico y gammaglutamil transferasa en ovinos Corriedale y Criollo del Distrito de Checca-Cusco. Tesis – FMVZ – UNA – Puno.
- Gutiérrez, A. 2005. Actividad de las transaminasas glutámico oxaloacético y piruvico en vacunos Brown Swiss y criollos. Tesis – FMVZ – UNA – Puno.
- Guyton, A. 1988. Tratado de fisiología médica. Séptima Edición. Editorial Interamericana México.
- Haroun, EM. & MF. Hussein. 1975. Clinic-pathological studies on naturally-occurring bovine fascioliasis in the Sudan. *J Helminthol.*
- INEI. 2012. RECUPERADO DE: www.inei.gob.pe censo agropecuario 2012.
- John, H. 2000. Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. Novena Edición. Editorial Masson. S.A. Barcelona España.

- Kanecko, J., W. Harveg, and L. Bruss. 1997. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Quinta edición, Editorial Academic.
- Kraft, H. 1998. *Métodos de laboratorio clínico de medicina veterinaria de mamíferos domésticos*. Tercera Edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza – España.
- Kumar, P. & M. Clarck. 2005. *Clinical medicine*. Sixth edition. Elsevier-Saunders, Inc.
- Leguia, G. 1988. Distomatosis hepática en el Perú, *Epidemiología y Control*. Boletín informativo IVITA.
- Lehninger, A. 1991. *Bioquímica*. Segunda Edición. Ediciones Omega, Barcelona España.
- McCurnin, D. 2001. *Clinical textbook for veterinary technicians*. Quinta Edición. Editorial WB Saunder.
- Medway, W., James, y E. Prier. 1990. *Patología clínica veterinaria*. Editorial UTEHA México.
- Morales, G., L. A. Pino, y L. Rodríguez. 2004. El coprodiagnóstico de tremátodos de rumiantes mediante la técnica de Happich-Boray modificada. *Parasitología al Día*.
- Moreno, A., L. González, J. Mendoza, L. García-Buey, y R. Moreno. 2007. Utilidad de los parámetros analíticos en el diagnóstico de las enfermedades hepáticas. *An. Med. Interna Madrid*.
- Morlan, J., A. Duran del Campo, y J. Mari. 1987. *Enfermedades de los lanares tomo I*, Primera edición, editorial agropecuario hemisferio sur S.R.L. Montevideo – Uruguay.

- Mussart, N.B., y J.A. Coppo. 2009. Indicadores sanguíneos de daño hepático en novillos cruzados por *Fasciola hepática*. *Rev. vet*
- Olaechea, F. 2004. Fasciola hepática. Comunicación Técnica N°449 Área Producción Animal.
- PDC. 2012. <https://es.scribd.com/.../PLAN-DE-DESARROLLOLOCAL-CONCERTADO>
- Pezo, D., A. Alvarado, M. Arainga, F. Franco, W. Braga. 2001. Determinación de Gammaglutamil transferasas (GGT) Aspartato transferasas (GOT) y Proteínas totales (PT) en alpacas hembras estación experimental IVITA Marangani la Raya – FMV – UNMSA – Perú.
- Quiroz, R.H. 1993. Impacto económico de la fasciolosis en rumiantes domésticos. En: Skewes H, editor. Sistema de Universidad Abierta (S U A). Compendio de producción bovina. México, D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Romero, M. J. 1999. Medicina clínica, Primera edición, Editorial Sergas Coruña – España.
- Romero, M.J. 2000. Estudio de la elevación de transaminasas. Disponible en www.fisterra.com/guias2/transaminasas.htm.
- Salgado, A. 1995. Manual clínico de pruebas de laboratorio. Editorial Mosby/Doyma. Madrid – España.
- Salgado, A. M. Vilardel. 1996. Manual químico de pruebas de laboratorio. Editorial MOSBY/DOYMA. Madrid – España.
- Smith, B. 1996. Medicina interna de animales mayores. Segunda Edición. Mosby, New York – USA.

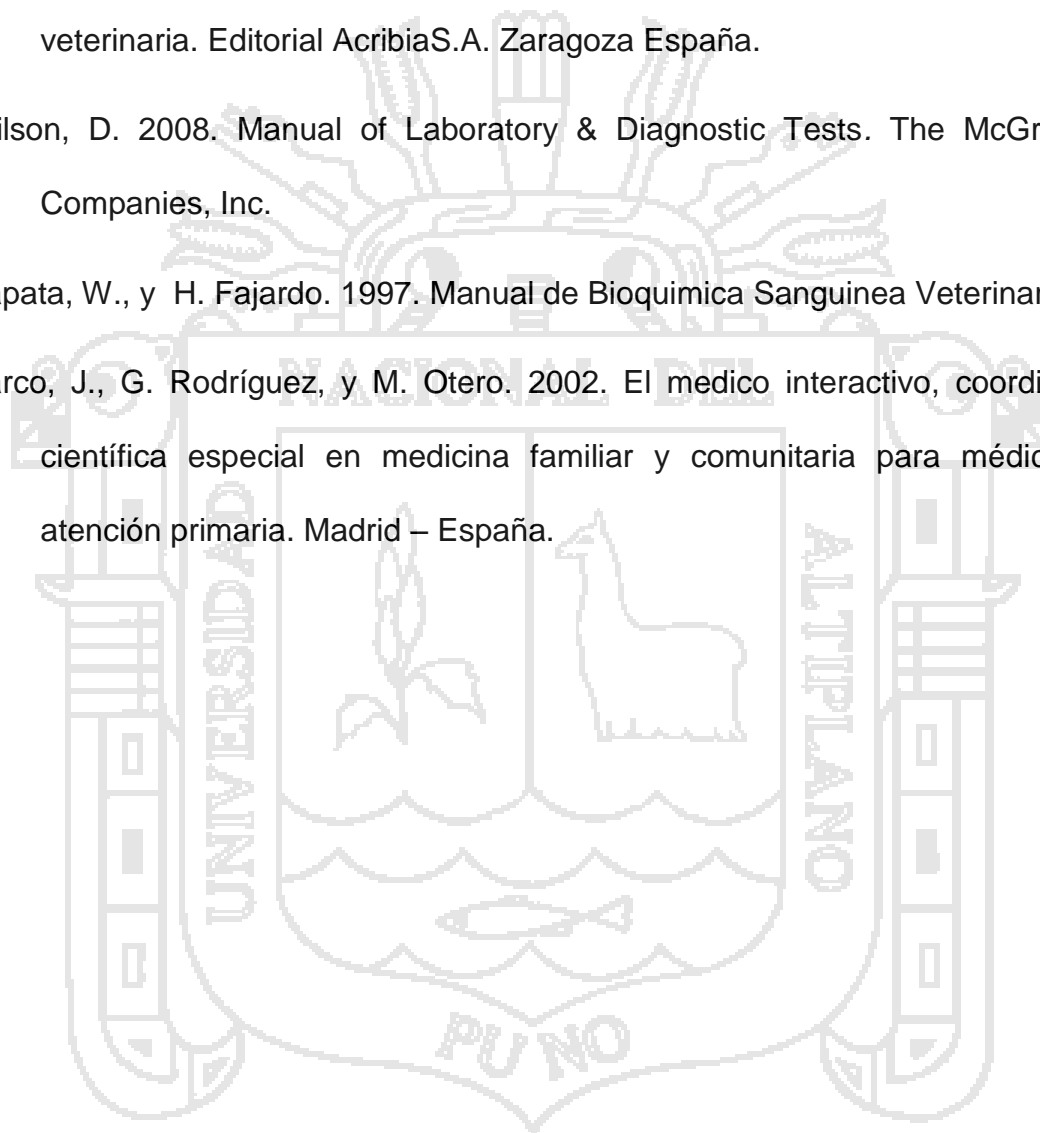
Sykes, A.R., Coop, R.L. and M.G. Robinson. 1980. Chronic subclinical ovine fascioliasis plasmaglutamatedeshidrogenase, gammaglutamyltranspeptidase, aspartoaminotransferase activities and their significance as diagnostic aids. *Res. vet. Sci.*

Urquhart, G., J. Armour, J. Duncan, A. Dunn, y F. Jennings. 2001. Parasitología veterinaria. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España.

Wilson, D. 2008. Manual of Laboratory & Diagnostic Tests. The McGraw-Hill Companies, Inc.

Zapata, W., y H. Fajardo. 1997. Manual de Bioquímica Sanguínea Veterinaria.

Zarco, J., G. Rodríguez, y M. Otero. 2002. El médico interactivo, coordinación científica especial en medicina familiar y comunitaria para médicos de atención primaria. Madrid – España.



ANEXOS



ANEXO 1: PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ALT**Reactivos:**

Sustrato ALT: Solución con 200 mM de DL-alanina y 2 mM de α -cetoglutarato en buffer fosfato 100 mM, pH 7.4.

Reactivo 2,4-DNFH: Solución conteniendo 1 mmol de 2,4-dinitrofenilhidracina en HCl 1 M.

Diluyente para enzimas concentrado: Solución de NaOH 4 M.

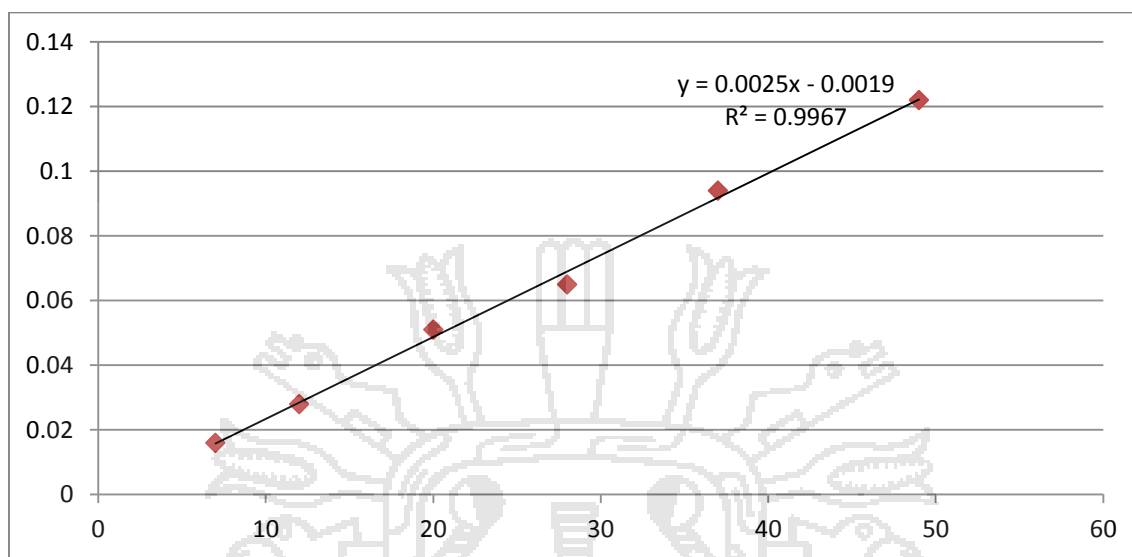
Estándar: Solución de piruvato de sodio 2 mM.

Protocolo:

Elaboración de la curva de calibración y determinación de la ecuación lineal

REACTIVO/PROCEDIMIENTO	TUBOS					
	Blanco	St 1	St 2	St 3	St 4	St 5
- Standard (mL)	0,00	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
- Sustrato ALT (mL)	1,00	0,95	0,90	0,80	0,70	0,60
- Agua destilada (mL)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Mezclar. Con intervalos de medio minuto entre tubo y tubo, agregar:						
- Reactivo 2,4 DNFH (mL)	1	1	1	1	1	1
Mezclar. Incubar exactamente durante 10 min a 37°C (contados desde el agregado del reactivo 2,4-DNFH al primer tubo). Manteniendo el intervalo de medio minuto, agregar:						
- Diluyente para enzimas (mL)	10	10	10	10	10	10
Retirar del baño e inmediatamente mezclar cada tubo por inversión. Después de 10 min leer la absorbancia en espectrofotómetro a 505 nm, llevando el aparato a 0 con agua destilada. El color es estable por 30 min.						
RESULTADOS						
Absorbancia leída	0,30	0,32	0,34	0,39	0,44	0,49
Absorbancia neta	0,00	0,02	0,04	0,09	0,14	0,19
Actividad ALT (U/L)	0	9	18	37	56	79

Curva de calibración y ecuación para la determinación de la actividad ALT



Determinación de la actividad ALT en las muestras de suero

REACTIVO/PROCEDIMIENTO	TUBOS				
	Blanco	Muestra 1	Muestra 2	...	Muestra n
- Sustrato ALT (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Preincubar en baño maría a 37±0.5°C por 5 min, luego agregar (cada 30 s)					
- Agua destilada (µL)	100	-.-	-.-	-.-	-.-
- Suero sanguíneo (µL)	-.-	100	100	100	100
Mezclar por agitación suave. Incubar exactamente durante 30 min a 37°C (contados desde el agregado del agua o suero), luego agregar (cada 30 s)					
- Reactivo 2,4-DNFH (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Mezclar suavemente Dejar 10 min a 37°C, luego agregar:					
- Diluyente para enzimas (mL)	5	5	5	5	5
Mezclar por inversión y retirar del baño. Después de 2 min leer la absorbancia en espectrofotómetro a 505 nm, llevando a 0 con agua destilada.					

ANEXO 2: PROCEDIMIENTO DE DETERMINACION DE ACTIVIDAD AST**Reactivos:**

Sustrato AST: Solución con 100 mM de L-aspartato y 2 mM de α -cetoglutarato en buffer fosfato 100 mM, pH 7.4

Reactivo 2,4-DNFH: Solución conteniendo 1 mmol de 2,4-dinitrofenilhidracina en HCl 1 M.

Diluyente para enzimas concentrado: Solución de NaOH 4 M.

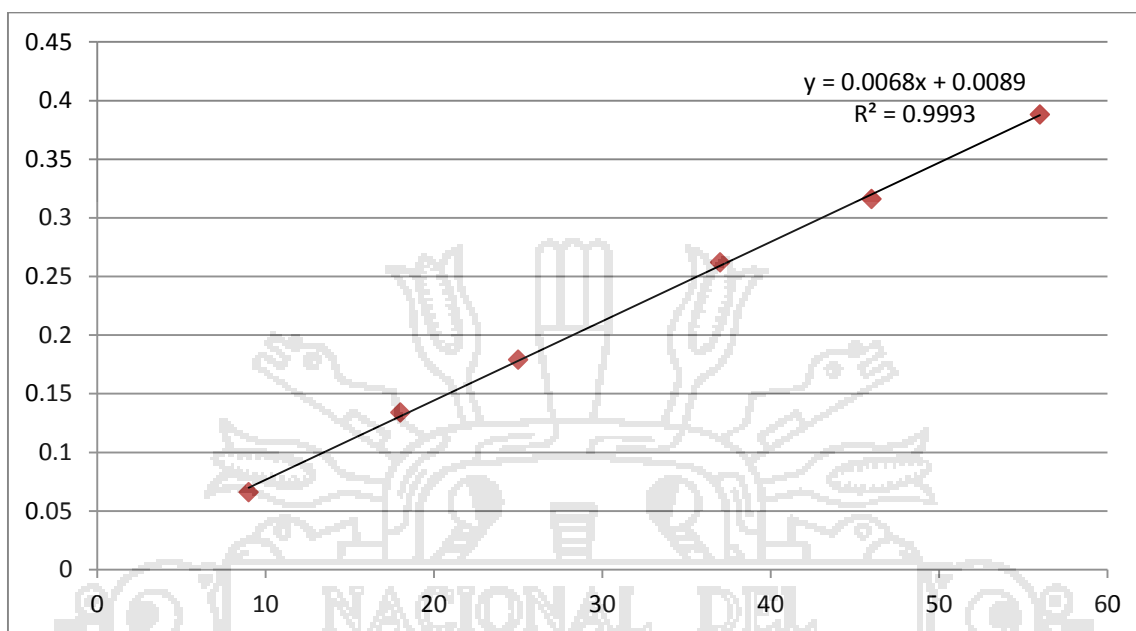
Estándar: Solución de piruvato de sodio 2 mM.

Protocolo:

Elaboración de la curva de calibración y determinación de la ecuación lineal

REACTIVO/PROCEDIMIENTO	TUBOS					
	Blanco	St 1	St 2	St 3	St 4	St 5
- Standard (mL)	0,00	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40
- Sustrato AST (mL)	1,00	0,95	0,90	0,80	0,70	0,60
- Agua destilada (mL)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Mezclar. Con intervalos de medio minuto entre tubo y tubo, agregar:						
- Reactivo 2,4 DNFH (mL)	1	1	1	1	1	1
Mezclar. Incubar exactamente durante 10 min a 37°C (contados desde el agregado del reactivo 2,4-DNFH al primer tubo). Manteniendo el intervalo de medio minuto, agregar:						
- Diluyente para enzimas (mL)	10	10	10	10	10	10
Retirar del baño e inmediatamente mezclar cada tubo por inversión. Después de 10 min leer la absorbancia en espectrofotómetro a 505 nm, llevando el aparato a 0 con agua destilada (el color es estable por 30 min).						
RESULTADOS						
Absorbancia leída	0,29	0,37	0,40	0,52	0,68	0,94
Absorbancia neta	0,00	0,06	0,10	0,23	0,38	0,65
Actividad GOT (U/L)	0	7	12	28	48	81

Curva de calibración y ecuación para la determinación de la actividad AST



Determinación de la actividad AST en las muestras de suero

REACTIVO/PROCEDIMIENTO	TUBOS				
	Blanco	Muestra 1	Muestra 2	...	Muestra N
- Sustrato AST (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Preincubar en baño maría a 37±0.5°C por 5 min, luego agregar (cada 30 s)					
- Agua destilada (µL)	100	-.-	-.-	-.-	-.-
- Suero sanguíneo (µL)	-.-	100	100	100	100
Mezclar por agitación suave.					
Incubar exactamente durante 30 min a 37°C (contados desde el agregado del agua o suero), luego agregar (cada 30 s)					
- Reactivo 2,4-DNFH (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Mezclar suavemente					
Dejar 10 min a 37°C, luego agregar:					
- Diluyente para enzimas (mL)	5	5	5	5	5
Mezclar por inversión y retirar del baño.					
Después de 2 min leer la absorbancia en espectrofotómetro a 505 nm, llevando a 0 con agua destilada.					

ANEXO 3: PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD GGT**Reactivos:**

Buffer: Solución de glicilglicina 60 mM tamponada con buffer Tris 0.1 M para pH final 8.2 (a 25°C)

Sustrato GGT: Tubos conteniendo 12 umoles de γ -glutamyl p-nitroanilida y estabilizantes.

Inhibidor: Solución de HCl 0.6 M conteniendo 0.8 mM de fenol y 1 mM de nitrito de sodio.

Desarrollador: Solución de NaOH 0.2 N con estabilizador de color

Estándar: Solución de p-nitroanilina, equivalente a 100 U/L de GGT.

Protocolo:*Determinación del Factor Colorimétrico (Fc)*

REACTIVO / PROCEDIMIENTO	TUBOS	
	Blanco	Standard
- Sustrato (mL)	0,6	0,6
- Standard (μ L)	--	20
Mezclar por agitación suave. No es necesario incubar. Luego, agregar:		
- Inhibidor (mL)	0,5	0,5
- Desarrollador (mL)	2,5	2,5
Mezclar y leer a 500 nm.		
RESULTADOS		
- Absorbancia leída	0,07	0,35
- Absorbancia neta	--	0,28

Determinación de la actividad GGT en las muestras

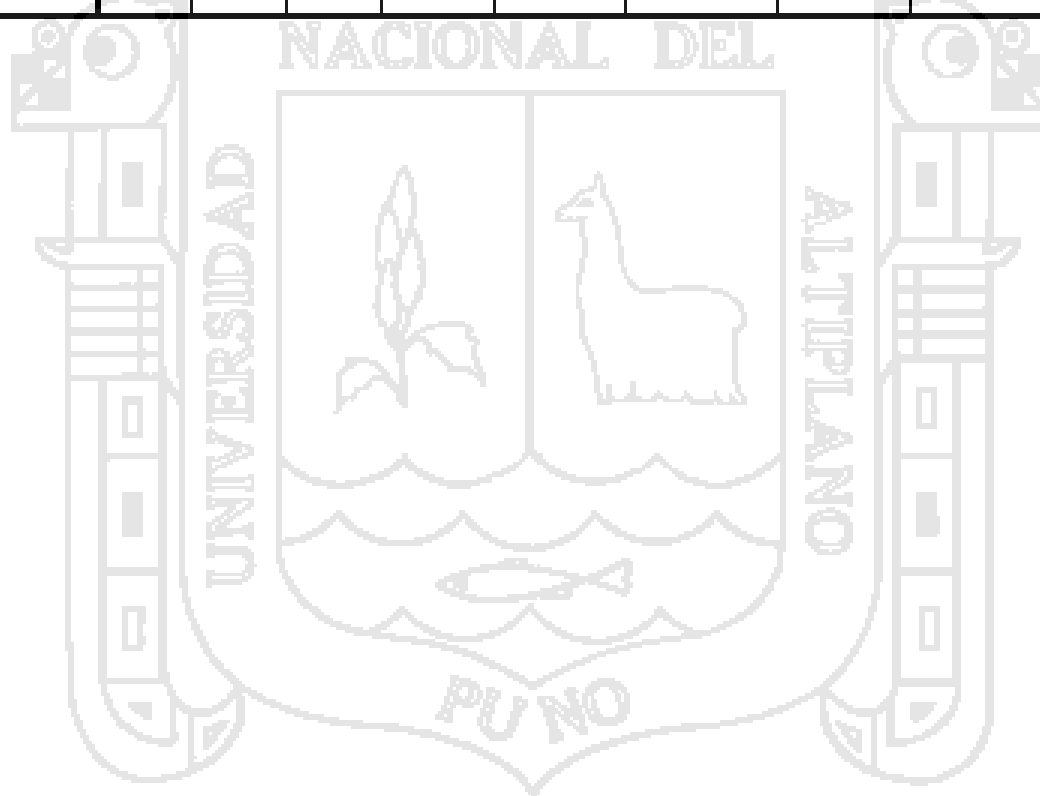
REACTIVO / PROCEDIMIENTO	TUBOS	
	Blanco	Muestra
- Sustrato (mL)	0.6	0.6
Preincubar en baño maría a 37°C por 5 min. Luego, agregar:		
- Suero (µL)	-.-	20
Mezclar suavemente. Incubar exactamente por 15 min a 37°C, agregar:		
- Inhibidor (mL)	0.5	0.5
Mezclar y retirar del baño. Luego agregar:		
- Suero (µL)	20	-.-
Exactamente a los 2 min de agregado el inhibidor, adicionar:		
- Desarrollador (mL)	2.5	2.5
Mezclar inmediatamente cada tubo con una varilla. Leer la absorbancia a 500 nm llevando el aparato a 0 con agua destilada. El color de reacción final es estable por 12 horas.		

ANEXO 4: VALORES DE AST o GOT EN VACUNOS CON Y SIN FASCIOLISIS

AST o GOT				y = 0.0088x + 0.0037		
Nº	POSITIVOS			NEGATIVOS		
	Blanco = 0.423			Blanco = 0.423		
	A bruta	A neta	AE	A bruta	A neta	AE
1	0,626	0,203	80,44	0,540	0,117	46,04
2	0,658	0,235	93,24	0,538	0,115	45,24
3	0,650	0,227	90,04	0,590	0,167	66,04
4	0,629	0,206	81,64	0,605	0,182	72,04
5	0,634	0,211	83,64	0,569	0,146	57,64
6	0,627	0,204	80,84	0,545	0,122	48,04
7	0,684	0,261	103,64	0,600	0,177	70,04
8	0,718	0,295	117,24	0,588	0,165	65,24
9	0,650	0,227	90,04	0,540	0,117	46,04
10	0,629	0,206	81,64	0,600	0,177	70,04
11	0,676	0,253	100,44	0,605	0,182	72,04
12	0,669	0,246	97,64	0,569	0,146	57,64
13	0,630	0,207	82,04	0,565	0,142	56,04
14	0,702	0,279	110,84	0,591	0,168	66,44
15	0,725	0,302	120,04	0,602	0,179	70,84
	PROM		94,23	PROM		60,63
	MIN		80,44	MIN		45,24
	MAX		120,04	MAX		72,04
	D.S.		13,61	D.S.		10,30
	C.V.		14,44	C.V.		16,99

ANEXO 5: PRUEBA DE “t” PARA AST EN VACUNOS CON Y SIN FASCIOLA

	Prueba de Levene		PRUEBA DE “t” PARA AST o GOT						
	F	Sig.	t	GL	Sig. (2colas)	Diferencia de medias	Error estándar	95% Confidence Interval of the Difference	
								Bajo	Alto
GOT Equal variances assumed	1,101	0,303	7,623	28	0,000	33,60000	4,40757	24,57151	42,62849
Equal variances not assumed			7,623	26,078	0,000	33,60000	4,40757	24,54144	42,65856



ANEXOS 6: VALORES DE ALT o GPT EN VACUNOS CON Y SIN FASCIOSIS

ALT o GPT						
y = 0.0068x + 0.0089						
Nº	POSITIVOS			NEGATIVOS		
	Blanco = 0.44			Blanco = 0.44		
	A bruta	A neta	AE	A bruta	A neta	AE
1	0,529	0,089	11,78	0,500	0,060	7,51
2	0,550	0,110	14,87	0,487	0,047	5,60
3	0,520	0,080	10,46	0,488	0,048	5,75
4	0,525	0,085	11,19	0,496	0,056	6,93
5	0,525	0,085	11,19	0,489	0,049	5,90
6	0,518	0,078	10,16	0,490	0,050	6,04
7	0,548	0,108	14,57	0,505	0,065	8,25
8	0,540	0,100	13,40	0,508	0,068	8,69
9	0,519	0,079	10,31	0,504	0,064	8,10
10	0,523	0,083	10,90	0,487	0,047	5,60
11	0,521	0,081	10,60	0,493	0,053	6,49
12	0,530	0,090	11,93	0,503	0,063	7,96
13	0,524	0,084	11,04	0,502	0,062	7,81
14	0,548	0,108	14,57	0,508	0,068	8,69
15	0,552	0,112	15,16	0,504	0,064	8,10
	PROM		12,14	PROM		7,16
	MIN		10,16	MIN		5,60
	MAX		15,16	MAX		8,69
	D.S.		1,84	D.S.		1,17
	C.V.		15,12	C.V.		16,28



ANEXO 7: PRUEBA DE “t” PARA ALT EN VACUNOS CON Y SIN FASCIOLA

	Prueba de Levene		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	Df	Sig. (2colas)	Diferencia de medias	Error estándar	95% Confidence Interval of the Difference	
								Bajo	Alto
GPT Equal variances assumed	4,929	,035	8,872	28	,000	4,98067	,56138	3,83073	6,13061
Equal variances not assumed			8,872	23,713	,000	4,98067	,56138	3,82129	6,14004



ANEXOS 8: VALORES DE GGT POSITIVOS A FASCIOLA EN VACUNOS

POSITIVOS A 37°C									
F=1158									
Nº	t=0min	t=1min	t=2min	t=3min	Δ1	Δ2	Δ3	ΔPROM	AE
1	1,680	1,700	1,890	2,030	0,020	0,190	0,140	0,117	135,10
2	0,879	0,971	1,077	1,130	0,092	0,106	0,053	0,084	96,89
3	0,866	0,950	1,028	1,101	0,084	0,078	0,073	0,078	90,71
4	0,918	1,047	1,090	1,129	0,129	0,043	0,039	0,070	81,45
5	0,975	1,075	1,215	1,286	0,100	0,140	0,071	0,104	120,05
6	0,890	0,978	1,056	1,208	0,088	0,078	0,152	0,106	122,75
7	1,600	1,713	1,875	1,913	0,113	0,162	0,038	0,104	120,82
8	1,340	1,543	1,607	1,641	0,203	0,064	0,034	0,100	116,19
9	1,560	1,713	1,875	1,913	0,153	0,162	0,038	0,118	136,26
10	1,350	1,543	1,607	1,641	0,193	0,064	0,034	0,097	112,33
11	0,980	1,075	1,215	1,286	0,095	0,140	0,071	0,102	118,12
12	0,879	0,971	1,077	1,130	0,092	0,106	0,053	0,084	96,89
13	0,866	0,950	1,028	1,101	0,084	0,078	0,073	0,078	90,71
14	0,918	1,047	1,090	1,129	0,129	0,043	0,039	0,070	81,45
15	0,923	1,075	1,215	1,286	0,152	0,140	0,071	0,121	140,12
PROMEDIO									110,65
MINIMO									81,45
MAXIMO									140,12
D.S.									19,69
C.V.									17,80



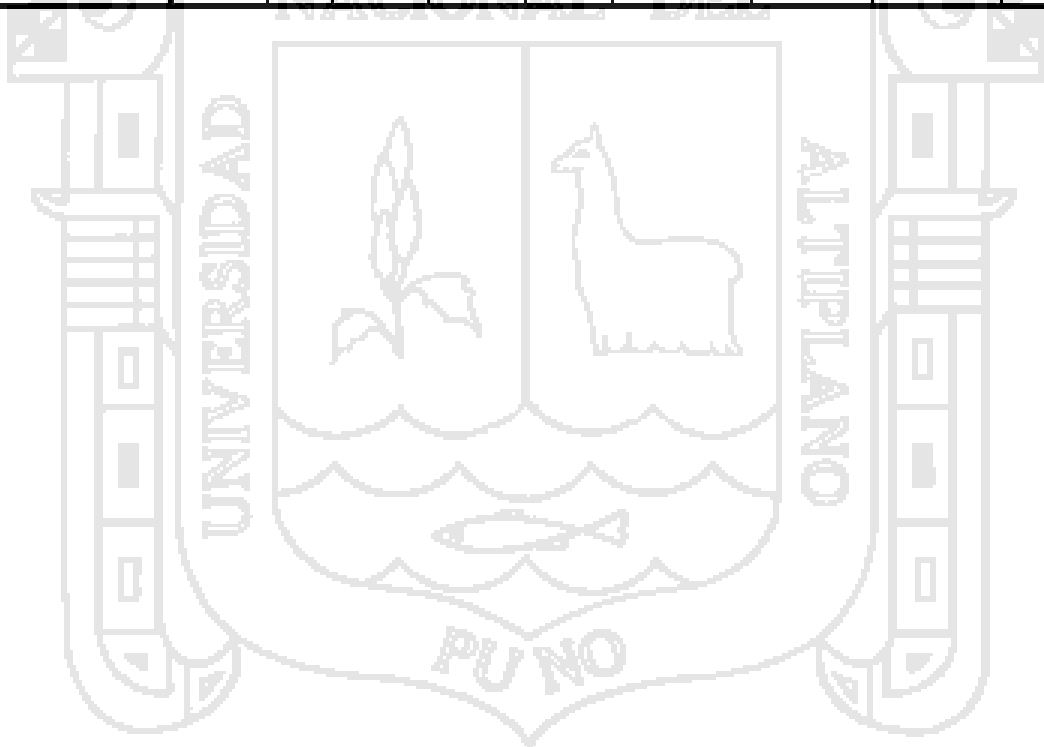
ANEXOS 9: VALORES DE GGT NEGATIVOS A FASCIOLA EN VACUNOS.

NEGATIVOS a 37°C									
F=1158									
Nº	t=0min	t=1min	t=2min	t=3min	Δ1	Δ2	Δ3	ΔPROM	AE
1	0,790	0,839	0,875	0,902	0,049	0,036	0,027	0,037	43,23
2	1,323	1,370	1,399	1,417	0,047	0,029	0,018	0,031	36,28
3	0,910	0,972	0,995	1,004	0,062	0,023	0,009	0,031	36,28
4	1,140	1,203	1,239	1,274	0,063	0,036	0,035	0,045	51,72
5	1,159	1,223	1,262	1,298	0,064	0,039	0,036	0,046	53,65
6	0,910	0,972	0,995	1,004	0,062	0,023	0,009	0,031	36,28
7	0,917	0,969	1,040	1,060	0,052	0,071	0,020	0,048	55,20
8	1,190	1,215	1,280	1,310	0,025	0,065	0,030	0,040	46,32
9	0,790	0,839	0,875	0,902	0,049	0,036	0,027	0,037	43,23
10	0,807	0,845	0,860	0,880	0,038	0,015	0,020	0,024	28,18
11	0,778	0,835	0,872	0,901	0,057	0,037	0,029	0,041	47,48
12	1,140	1,203	1,239	1,274	0,063	0,036	0,035	0,045	51,72
13	1,200	1,223	1,262	1,298	0,023	0,039	0,036	0,033	37,83
14	0,790	0,839	0,875	0,902	0,049	0,036	0,027	0,037	43,23
15	1,323	1,370	1,399	1,417	0,047	0,029	0,018	0,031	36,28
PROM									43,13
MIN									28,18
MAX									55,20
D.S.									7,89
C.V.									18,30



ANEXO 10: PRUEBA DE “t” PARA GGT EN VACUNOS CON Y SIN FASCIOLA

	Prueba de Levene		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	GL	Sig. (2-tailed)	Diferencia de medias	Error estándar	95% Confidence Interval of the Difference	
								Bajo	Alta
GGT Equal variance assumed	15,494	,000	12,328	28	,000	67,52867	5,47774	56,30803	78,74930
GGT Equal variance not assumed			12,328	18,386	,000	67,52867	5,47774	56,03766	79,01967



ANEXO 11: VALORES DE AST o GOT EN OVINOS CON Y SIN FASCIOSIS.

GOT $y = 0.0088x + 0.0037$						
Nº	POSITIVOS			NEGATIVOS		
	Blanco = 0.423			Blanco = 0.423		
	A bruta	A neta	AE	A bruta	A neta	AE
1	0,638	0,215	85,24	0,570	0,147	58,04
2	0,736	0,313	124,44	0,620	0,197	78,04
3	0,742	0,319	126,84	0,605	0,182	72,04
4	0,679	0,256	101,64	0,554	0,131	51,64
5	0,644	0,221	87,64	0,616	0,193	76,44
6	0,655	0,232	92,04	0,600	0,177	70,04
7	0,665	0,242	96,04	0,597	0,174	68,84
8	0,628	0,205	81,24	0,616	0,193	76,44
9	0,697	0,274	108,84	0,545	0,122	48,04
10	0,640	0,217	86,04	0,550	0,127	50,04
11	0,645	0,222	88,04	0,570	0,147	58,04
12	0,636	0,213	84,44	0,612	0,189	74,84
13	0,635	0,212	84,04	0,619	0,196	77,64
14	0,719	0,296	117,64	0,554	0,131	51,64
15	0,657	0,234	92,84	0,621	0,198	78,44
	PROM		97,13	PROM		66,01
	MIN		81,24	MIN		48,04
	MAX		126,84	MAX		78,44
	D.S.		15,29	D.S.		11,68
	C.V.		15,74	C.V.		17,69



ANEXO 12: PRUEBA DE “t” PARA AST EN OVINOS CON Y SIN FASCIOLA

	Prueba de Levene		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	GL	Sig. (2colas)	Diferencia de medias	Error estándar	95% Confidence Interval of the Difference	
								Bajo	Alto
GO T	0,714	0,405	6,264	28	0,000	31,12000	4,96785	20,94382	41,29618
			6,264	26,183	0,000	31,12000	4,96785	20,91191	41,32809



ANEXO 13: VALORES DE ALT o GPT EN OVINOS CON Y SIN FASCIOSIS

GPT $y = 0.0068x + 0.0089$						
Nº	POSITIVOS			NEGATIVOS		
	Blanco = 0.44			Blanco = 0.44		
	A bruta	A neta	AE	A bruta	A neta	AE
1	0,510	0,070	8,99	0,501	0,061	7,66
2	0,520	0,080	10,46	0,485	0,045	5,31
3	0,512	0,072	9,28	0,500	0,060	7,51
4	0,507	0,067	8,54	0,491	0,051	6,19
5	0,515	0,075	9,72	0,487	0,047	5,60
6	0,505	0,065	8,25	0,488	0,048	5,75
7	0,538	0,098	13,10	0,483	0,043	5,01
8	0,505	0,065	8,25	0,490	0,050	6,04
9	0,507	0,067	8,54	0,498	0,058	7,22
10	0,522	0,082	10,75	0,504	0,064	8,10
11	0,510	0,070	8,99	0,484	0,044	5,16
12	0,508	0,068	8,69	0,502	0,062	7,81
13	0,511	0,071	9,13	0,496	0,056	6,93
14	0,515	0,075	9,72	0,487	0,047	5,60
15	0,519	0,079	10,31	0,488	0,048	5,75
	PROM		9,51	PROM		6,38
	MIN		8,25	MIN		5,01
	MAX		13,10	MAX		8,10
	D.S.		1,27	D.S.		1,06
	C.V.		13,33	C.V.		16,55



ANEXO 14: PRUEBA DE “t” PARA ALT EN OVINOS CON Y SIN FASCIOLA

	Prueba de Levene		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	GL	Sig. (2colas)	Diferencia de medias	Error estándar	95% Confidence Interval of the Difference	
								Bajo	Alto
GPT Equal variances assumed	0,000	0,999	7,367	28	0,000	3,13867	,42607	2,26590	4,01143
Equal variances not assumed			7,367	27,106	0,000	3,13867	,42607	2,26460	4,01273



ANEXOS 15: VALORES DE GGT POSITIVOS A FASCIOLA EN OVINOS.

POSITIVOS A 37°C									
F = 1158									
Nº	t=0min	t=1min	t=2min	t=3min	$\Delta 1$	$\Delta 2$	$\Delta 3$	$\Delta PROM$	AE
1	0,954	1,065	1,208	1,356	0,111	0,143	0,148	0,134	155,17
2	1,143	1,310	1,332	1,492	0,167	0,022	0,160	0,116	134,71
3	1,120	1,254	1,332	1,450	0,134	0,078	0,118	0,110	127,38
4	1,114	1,312	1,485	1,600	0,198	0,173	0,115	0,162	187,60
5	0,989	1,239	1,337	1,417	0,250	0,098	0,080	0,143	165,21
6	1,265	1,526	1,558	1,690	0,261	0,032	0,132	0,142	164,05
7	0,997	1,203	1,408	1,570	0,206	0,205	0,162	0,191	221,18
8	1,237	1,375	1,473	1,578	0,138	0,098	0,105	0,114	131,63
9	1,120	1,342	1,440	1,526	0,222	0,098	0,086	0,135	156,72
10	0,950	1,048	1,244	1,429	0,098	0,196	0,185	0,160	184,89
11	1,265	1,526	1,558	1,750	0,261	0,032	0,192	0,162	187,21
12	0,997	1,203	1,408	1,460	0,206	0,205	0,052	0,154	178,72
13	1,686	1,836	1,957	2,140	0,150	0,121	0,183	0,151	175,24
14	1,110	1,342	1,440	1,526	0,232	0,098	0,086	0,139	160,58
15	0,899	1,048	1,244	1,429	0,149	0,196	0,185	0,177	204,58
	PROM								168,99
	MIN								127,38
	MAX								221,18
	D.S.								26,47
	C.V.								15,66

ANEXO 16: VALORES DE GGT NEGATIVOS A FASCIOLA EN OVINOS

NEGATIVOS a 37°C									
F=1158									
N°	t=0min	t=1min	t=2min	t=3min	$\Delta 1$	$\Delta 2$	$\Delta 3$	$\Delta PROM$	AE
1	1,239	1,359	1,403	1,451	0,120	0,044	0,048	0,071	81,83
2	1,810	1,885	1,972	2,060	0,075	0,087	0,088	0,083	96,50
3	1,287	1,359	1,403	1,492	0,072	0,044	0,089	0,068	79,13
4	0,984	1,062	1,130	1,167	0,078	0,068	0,037	0,061	70,64
5	1,417	1,510	1,640	1,700	0,093	0,130	0,060	0,094	109,24
6	1,825	1,940	1,567	2,114	0,115	-0,373	0,547	0,096	111,55
7	1,061	1,131	1,193	1,264	0,070	0,062	0,071	0,068	78,36
8	1,062	1,140	1,234	1,305	0,078	0,094	0,071	0,081	93,80
9	1,790	1,885	1,972	2,090	0,095	0,087	0,118	0,100	115,80
10	1,287	1,359	1,403	1,490	0,072	0,044	0,087	0,068	78,36
11	0,984	1,062	1,117	1,167	0,078	0,055	0,050	0,061	70,64
12	1,810	1,885	1,972	2,060	0,075	0,087	0,088	0,083	96,50
13	1,240	1,359	1,403	1,451	0,119	0,044	0,048	0,070	81,45
14	0,984	1,062	1,100	1,167	0,078	0,038	0,067	0,061	70,64
15	1,061	1,131	1,193	1,264	0,070	0,062	0,071	0,068	78,36
	PROM								87,52
	MIN								70,64
	MAX								115,80
	D.S.								15,34
	C.V.								17,53



ANEXO 17: PRUEBA DE “t” PARA GGT EN OVINOS CON Y SIN FASCIOLA

	Prueba de Levene		t-test for Equality of Means							
	F	Sig.	t	GL	Sig. (2colas)	Diferencia de medias	Error estándar	95% Confidence Interval of the Difference		
								Bajo	Alto	
GGT	Equal variances assumed	3,163	0,086	10,314	28	0,000	81,47133	7,89947	65,29000	97,65267
	Equal variances not assumed			10,314	22,454	0,000	81,47133	7,89947	65,10801	97,83465

