



134
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

DETERMINACION DE LOS NIVELES DE LAS
ENZIMAS CPK (CREATIN - FOSFOQUINASA)
Y TGO (TRANSAMINASA GLUTAMICO
OXALACETICA) EN SUERO DE OVINOS
CON ANTECEDENTES CLINICOS DE
ENFERMEDAD DE MUSCULO
BLANCO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
SOCORRO MARISA SALGADO MORENO

DIRECTOR DE TESIS:
M.V.Z. ALFREDO CUELLAR ORDAZ



Cuautitlán Izcalli, Estado de México 1986.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Página

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	4
OBJETIVOS	15
MATERIAL Y METODOS	16
RESULTADOS	25
DISCUSION	34
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFIA	41

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue conocer la utilidad --- diagnóstica de las determinaciones de las enzimas CPK y TGO para la enfermedad de músculo blanco. Asimismo se efectuó un estudio complementario de los hallazgos a la necropsia e his topatológicos de muestras tomadas de animales que murieron - durante la realización del estudio. Se estudiaron 45 corde-- ros de dos explotaciones comerciales ubicadas en el Estado - de México incluidos en dos grupos: Grupo A con 25 y Grupo B con 20 animales. En el grupo A las muestras sanguíneas se ob tuvieron a los 1, 10 y 15 días después del nacimiento; el -- grupo B se muestreó una sola vez a los corderos de 1 a 15 -- días de edad escogidos al azar. En la determinación de CPK - se empleó el método de CPK-Nac activado y en la determina-- ción de TGO el método de Raitman Frankel modificado. El pro-- medio general de la CPK en el grupo A fue de 3233 U/l y en - grupo B de 427 U/l. En la media de cada uno de los muestreos efectuados los días 1, 10 y 15 hubo un incremento de la enzi ma CPK sin diferencias significativas. El promedio de la en-- zima TGO en el grupo A fue de 103 USP/ml el cual es superior al nivel normal de corderos citado por la literatura 56 ± 31 USP/ml). El coeficiente CPK/TGO mostró que todos los anima-- les del grupo A quedaron como sospechosos de daño muscular - esquelético. En el estudio histopatológico del músculo semi-- tendinoso de los animales muertos (n=2) se observó fragmenta ciones, ondulaciones y degeneración de Zenker en pequeños -- focos de la fibra. Se considera que la determinación de CPK se puede emplear como una prueba de rutina en el diagnóstico de esta enfermedad ya que la muerte de un cordero pagaría el precio de más de una determinación.

INTRODUCCION

Debido a la gran explosi3n demogr3fica una de las preocupa--
ciones es la nutrici3n humana y es tambi3n la de generar al--
ternativas para ello, una de estas alternativas ha venido a
ser la carne de ovino y subproductos; pero ahora el problema
es que la oferta nacional no satisface la demanda, recurri3n--
dose sistem3ticamente a la importaci3n (P3rez, 1981).

Tan importante es la nutrici3n humana como la animal, para -
que haya mayor producci3n, en este aspecto la ciencia de la
nutrici3n ha avanzado a grandes pasos desde el siglo XIX has--
ta estos d3as, comprobando por ejemplo la esencialidad de --
ciertos minerales y vitaminas (Maynard, 1983).

Actualmente se tiene mayor informaci3n sobre los requerimien--
tos nutricionales de los animales, no s3lo para asegurar el
funcionamiento normal de todos los procesos org3nicos compro--
metidos, sino tambi3n para prevenir problemas de deficien--
cias (Maynard, 1983).

Pero desgraciadamente los aportes de la ciencia no crecen al
parejo de las situaciones espec3ficas que prevalecen para --
ciertas especies dom3sticas o productivas, tal es el caso del
ganado ovino de M3xico, el cual debido a su muy particular --
sistema de producci3n y condici3n socioecon3mica de sus pro--
piedades padece problemas de deficiencias nutricionales. Este
sistema se desarrolla generalmente con animales criollos a ba

se de pastoreo diurno en praderas nativas o naturales con re fugio nocturno, lo cual a su vez implica que esta alimenta-- ción dependa tanto en calidad como en cantidad del tiempo de pastoreo y de la época del año (Orcasberro, 1983*; Pérez, -- 1981).

Con lo anterior se pueden ver afectados los requerimientos - necesarios de nutrientes para el crecimiento, desarrollo y - producción del ovino.

Uno de los problemas de inquietud en la actualidad es la de-- ficiencia de vitamina E y/o Selenio (Se), el cual constituye un problema sumamente complejo en condiciones de pastoreo. - Por otro lado, la suplementación como alternativa en el mejo_ ramiento de esta alimentación aún no se practica en la gene_ ralidad de los rebaños. Este problema deficitario es impor-- tante por los índices de mortalidad que ocasiona, las gran-- des pérdidas económicas además de la depreciación de la can-- nal, la poca ganancia de peso de los animales sobrevivientes y el alto costo para su prevención (Jensen, 1982; Orcasberro, 1983*).

* Apuntes sobre Nutrición en Ovinos. Material presentado en el Curso de Producción Ovina. Departamento de Zootecnia de Universidad Autónoma - Chapingo, Abril - Mayo, 1983.

ANTECEDENTES

La enfermedad de Músculo Blanco en ovinos también es conocida como "Distrofia muscular", "Miopatía alimentaria", "Rigidez de los corderos" y "White muscle disease", aunque su -- etiología no está muy clara, se piensa que es debida a una -- deficiencia nutricional de vitamina E y/o Se (Berrocal, 1980; Jensen, 1982; Jubb y Kennedy, 1970; Medway, 1980).

La enfermedad es de distribución mundial causando grandes -- pérdidas del ganado ovino (Underwood, 1971).

Según datos citados por Mc Murray y col. en 1982, la enferme-- dad ha sido descrita clínicamente por varios autores desde -- el año de 1953. En 1958 en Oregon se publicaron estudios que demostraron que esta enfermedad se podía prevenir completa-- mente con la dministración de pequeñas cantidades de Se en -- el alimento de la oveja, lo cual hizo más evidente que este síndrome obedece a una deficiencia de este mineral en la dita. Las condiciones de estudios en que la deficiencia de Se causa la enfermedad de Músculo Blanco se han descrito en Australia por Gardner en 1969.

Parece haber una interrelación de la vitamina E y el Se por lo que el cuadro obedece a veces a la deficiencia de cual-- quiera de los dos (Mc. Murray et al, 1982).

Esta enfermedad afecta a borregos de todas las edades indis-

tintamente del sexo, aunque su ocurrencia es mayor en animales de 2 a 4 semanas de edad hasta los 3 meses (Dent et al, 1979; Jensen, 1982).

ANTECEDENTES, ORIGEN Y FUNCION DEL SELENIO.

La primera importancia que se le dio al Se fue relacionada con su toxicidad. Marco Polo se refirió a plantas venenosas las cuales causaban dislocación en los cascos de los caballos. Cronológicamente en 1857 Calvary, observó signos tóxicos similares en caballos, en 1929 científicos de la USDA identificaron el Se como principio tóxico (Nutrición animal INIP, 1985*).

A partir de 1950 ya existía evidencia respecto a que el Se era un nutriente esencial aunque sus funciones metabólicas no estaban muy claras (Mc. Donald et al, 1976).

Posteriormente siguieron varios trabajos como el de Schwars y col. en 1957 demostraron que el selenito de sodio prevenía la necrosis hepática en ratas. Patterson y col. en el mismo año encontraron que el Se prevenía la diátesis exudativa en pollos. Para el año de 1958 Muth y col. comprueban que el Se era una protección contra la enfermedad de músculo blanco en rumiantes jóvenes, en 1973 Rotruch et al, identificó el Se en la enzima glutatión peroxidasa (Nutrición animal, INIP, 1985).

* Apuntes de la Maestría de Nutrición Animal INIP, México 1985.

El Se en las plantas se absorbe en forma de selenatos y selenitos del suelo y con estos elementos biosintetizan análogos del selenio o aminoácidos sulfurados como selenocistina, selenocisteína, selenometationina y seleniocistationina. El tejido de la planta lo incorpora a proteínas, las cuales son - la forma dietética del selenio orgánico para borregos y ganado en general (Jensen, 1982; Strought, 1985).

La deficiencia de Se puede obedecer a las siguientes condiciones:

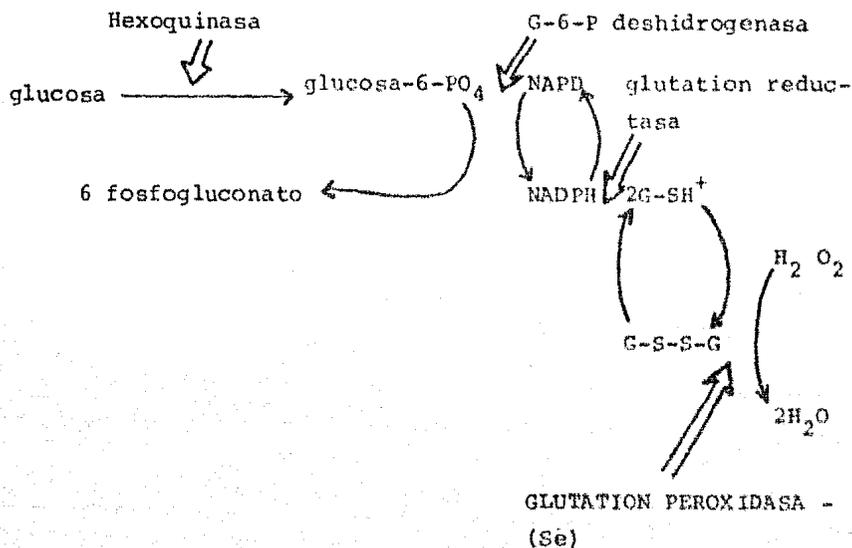
- a) El nivel del Se en el suelo, aunque no hay relación directamente proporcional entre la cantidad de Se y la absorción por parte de la planta (Maynard, 1983; Strought, -- 1985).
- b) Factores que afectan el aprovechamiento del Se en el consumo de las plantas, como los pH alcalinos que aumentan - la absorción (Nutrición animal, INIP, 1985).
- c) Factores que afectan la acumulación de Se en las plantas; como la presencia de azufre en el suelo que compite con - el Se debido a su similitud estructural para ser absorbido por la planta (Strought, 1985).
- d) La especie de la planta como por ejemplo la alfalfa y el trébol tienen una capacidad mínima para absorber el Se -- del suelo, además los pastos nativos tienen bajas cantidades de Se en comparación con los de cultivos implantados (Mc Donald y col., 1976; Maynard, 1983; Strought, 1985).

- e) Edad y fase de crecimiento de la planta cuando se ocupa como alimento, ya que la distribución del Se a través de la planta es primero raíz, luego tallo, hojas, y flores - (Orcasberro, 1983; Strought, 1985).
- f) Ambiente físico; ya que a mayor precipitación pluvial aumenta la acumulación de Se en la planta (Mc. Donal y col. 1976; Orcasberro, 1983; Strought, 1985).
- g) La reducción de los compuestos de Se por las bacterias de la flora ruminal, especialmente los compuestos como selenoproteínas para transformarlas en Se elemental (Maynard, 1983; Orcasberro, 1983).

El selenio se encuentra en todas las células y tejidos animales como una selenoproteína localizada en músculo del corazón y músculo esquelético, y también se encuentra en los aminoácidos azufrados de la porción hemo del citocromo C en los ovinos y en algunos ácidos aminonucleicos (RNA).

Respecto a su absorción por parte del animal es escasa la información del mecanismo que el organismo usa para incorporar el Se en las células así también el mecanismo de activación y reducción del SeH. Sin embargo, Stadtman en 1974 reporta que este proceso es similar al metabolismo de los sulfatos, usando las mismas enzimas (Strought, 1985).

La función del Se como antioxidante es como parte principal de la enzima glutatión peroxidasa, la cual cataliza la siguiente reacción:



G-SH⁺ glutation selenio hidrogenasa (reducida)

G-S-S-G (oxidada)

(Muth, 1970; White, 1977; Wood, 1979; Rodwell, 1982; Nutrición Animal, INIP, 1985)

ANTECEDENTES, ORIGEN Y FUNCION DE LA VITAMINA E (Vit. E)

La vit. E se descubrió hace 50 años y se encuentra en forma natural como alfa, beta gama y delta tocoferoles. La forma - alfa es la más estudiada y al parecer la más importante.

Se ha comprobado en los animales de laboratorio que la cantidad

dad de Vit. E necesaria como requerimiento dietético depende de los siguientes factores:

- a) Cantidad de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta -- (Maynard, 1983).
- b) La presencia de otros antioxidantes liposolubles naturales o de síntesis en la dieta al igual que en el animal - (Maynard, 1983; Combs, 1985).
- c) Al parecer, también la cantidad de Se en la dieta ya que Koller 1981 citado por Strought, 1985 mostró que este retiene a la vit. E en el plasma (Rodwell, 1983; Strought, 1985).

Al parecer cada gramo de ácido graso poliinsaturado en la -- dieta aumenta las necesidades de Vit. E (Maynard, 1983). -- Checke y col. en 1969 y Dawley 1982 mencionan que altos niveles de ácidos grasos aumentan el requerimiento de Vit. E como antioxidante en las membranas de eritrocitos, microsomas y mitocondrias debido a que son altamente susceptibles a la peroxidación (Maynard, 1983).

La interrelación que parece existir entre la Vit. E y el Se puede radicar en que ambos son pilares esenciales en su función como antioxidantes. El Se en forma de una selenoproteína (enzima glutatión peroxidasa), mencionada anteriormente, la cual reduce los peróxidos normalmente formados en procesos biológicos de los alcoholes y la Vit. E como tal (alfa - tocoferol) que evita la producción de peróxidos, ya que termina la reacción en cadena aparentemente con la neutraliza--

* Combs, G.F.; Advance Nutrition. Apuntes de la Maestría de Nutrición - Animal. INIP, México, 1985.

ción de los radicales libres, previniendo así la peroxidación de los lípidos de las membranas salvoguardando su integridad (Mc. Donald y col., 1976; Mc. Murray, 1982; Maynard, 1983; Rodwell, 1983; Strought, 1985).

Por lo tanto, se deduce que la peroxidación es lo que produce el daño celular a nivel de fibra muscular que es característico en la enfermedad de músculo blanco y además la defensa del organismo en contra de la peroxidación está influenciada por la cantidad de Vit. E y Se que se le da al animal en la dieta (Mc. Murray y col., 1983).

Según Mc. Murray y col., 1982 todo proceso degenerativo en los tejidos involucra una interacción tripartita en donde los protagonistas son los ácidos poliinsaturados como el linoleico, linolénico y araquidónico; y como antagonistas la Vit. E y el Se. Pero a pesar de que estos tres factores son los principales en las condiciones patológicas, actúan otros factores químicos por su habilidad de causar daño en el desarrollo que siguen los ácidos poliinsaturados. Estos otros factores químicos pueden ser los provenientes del metabolismo del oxígeno, en el cual sus productos son tóxicos tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical Oxidrilo (OH) y el oxígeno como tal (O_2). Estos metabolitos una vez producidos pueden iniciar el daño a los lípidos, ácidos nucleicos y proteínas celulares, alterando así la capacidad funcional de la membrana celular. También puede haber alteración en el RNAt causando problemas en la transducción del mensaje genético. El daño en las proteínas se refleja en la pérdida de la actividad enzimática y con ello también la función catalítica. Estos efectos solos o en conjunto resultan en

daño del tejido con la subsecuente aparición clínica de enfermedad del animal (Mc. Murray y col., 1983).

Al parecer la Vit. E es la primera línea de defensa contra la peroxidación de los fosfolípidos de las membranas celulares y el Se como componente de la glutatión peroxidasa proporciona la segunda línea de defensa para destruir los peróxidos que aún en una adecuada cantidad de Vit. E se forman - (White, 1977; Rodwell, 1982; Combs, 1985).

Ahora bien se mencionó también a los ácidos poliinsaturados como protagonistas y que pueden seguir caminos in vivo o in vitro de peroxidación, con la producción de hidroperóxidos. Los hidroperóxidos forman radicales OH libres que causan daño a los tejidos (Mc. Murray y col., 1983).

CUADRO CLINICO.

Por otro lado, la enfermedad de músculo blanco está clasificada dentro del síndrome de claudicación e inmovilidad en la clínica ovina debido a los signos característicos de falta de coordinación y debilidad muscular. Los animales afectados toman la posición de perro sentado o arrastran el tren posterior (Dent y Cols., 1979; Jensen, 1982). Puede haber cambios morfológicos en el animal debido a la proyección de la escápula. Generalmente el cuadro va unido a bajas de peso (Jennings, 1970; Jubb y Kennedy, 1980; Jensen, 1982).

Según Jubb y Kennedy (1980) la enfermedad puede tener una presentación variada, encontrándose en general tres síndromes -

que son: cardiaco, respiratorio y muscular esquelético. Cuando se afecta el corazón, puede existir muerte repentina, edema pulmonar por falla cardiaca con signos de neumonía, presentando además pulso débil y acelerado. Cuando se afecta el aparato respiratorio, principalmente se ven más afectados -- los músculos faríngeos siendo esto más frecuente en corderos, por lo tanto pueden morir de asfixia y/o deficiencia respiratoria por el daño a los músculos intercostales. Cuando está afectada la musculatura esquelética, hay debilidad, parálisis y en casos crónicos tumefacción intensa con endurecimiento. Debido a esta variedad de su presentación clínica es muy importante hacer un diagnóstico acertado ya que se puede estar tratando terapéuticamente una neumonía y en verdad puede ser un cuadro de músculo blanco (Mc. Murray y col., 1982).

La enfermedad llega a tener una morbilidad por arriba del 50% sobre todo en animales de 2 a 3 semanas de edad y que provienen de madres que tuvieron deficiencias de Vit. E y/o durante la gestación. La mortalidad es de un 70% en animales afectados y no tratados. El curso de la enfermedad es de 1 a 2 semanas (Jensen, 1982).

Cuando los animales mueren de esta enfermedad los hallazgos a la necropsia son: afección de los músculos principalmente -- los de las extremidades e intercostales, presentando macroscópicamente áreas pálidas amarillentas o blancas en su eje longitudinal. Esas lesiones tienden a estar bien delimitadas en ciertos ejes de fibras, dando la impresión de carne cocida de pollo o de carne de pescado. El tejido muscular dañado es inelástico, se desgarrar fácilmente, es friable y seco (Jubb y - Kennedy, 1980; Jensen, 1982).

En el corazón hay flacidez del ventrículo derecho con lesión endocárdica, por lo que los pulmones estarán congestionados y edemáticos (Jensen, 1982).

Histopatológicamente se encuentra que hay necrosis, degeneración granular y hialina de los músculos afectados, donde el sarcoplasma está dañado pero el sarcolema permanece intacto. Las fibras aparecen tumefactas haciéndose menos ostensibles las estriaciones, además se van haciendo más delgadas para desaparecer al final, quedando una sustancia homogénea en el interior de la fibra, que se tiñe por eosina, recibiendo el nombre de hialina. La ruptura de las fibras deja un espacio en el interior del sarcolema donde penetran los macrófagos (monocitos y células multinucleadas) destinadas a eliminar el sarcoplasma degenerado, además también se encuentra una proliferación de núcleos musculares. En los últimos estadios de la enfermedad se puede encontrar fibrosis con depósitos de calcio en algunas ocasiones (Jennings, 1970; Smith y cols. 1974; Berrocal, 1980; Jubb y Kennedy, 1980; Jensen, 1982).

Otros datos que nos permiten los análisis clínicos, de los anteriores, son las pruebas de bioquímica clínica. En ésta uno de los exámenes más útiles en particular es la medición de los niveles de las enzimas séricas, las cuales son producto o intervienen directamente en el metabolismo celular. Clasificándose según su origen y función en específicas e inespecíficas. Las enzimas celulares o enzimas específicas de órgano, serán eliminadas de su lugar de origen en una proporción mayor a lo normal cuando se presente un daño celular o una alteración en la permeabilidad de la membrana celular (Kaneko, 1980; Bruton y cols., 1981).

Para el diagnóstico de esta enfermedad se han recomendado la determinación de los niveles séricos de las enzimas CPK (crea^tín fosfoquinasa y crea^tín cina^sa) y TGO (transaminasa glutami^co oxalacética). El origen tisular de la TGO en orden decreciente de producción es en el corazón, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas. La elevación de los valores normales es atribuible a entidades como hepatitis aguda, ictericia obstructiva, cirrosis hepática, neoplasia del hígado, infartos al miocardio y atrofia muscular (Manual QFB, FES-C, -1980*; Kaneko, 1980).

Para complementar el diagnóstico y poder descartar estas entidades, también se determina la enzima CPK; que es más específica para valorar daño muscular ya que sus niveles se elevan en el suero cuando hay daño en los componentes celulares, además de que su producción en orden decreciente es en el corazón y músculo esquelético. Para determinar si el daño muscular obedece a una deficiencia de selenio se puede determinar los valores de Se en suero indirectamente por la valoración de la actividad de la glutatión peroxidasa (Anderson, -1979; Dibartola y col., 1977; Duncan, 1977; Wood, 1979; Manual QFB, FES-C, 1980*; Kaneko, 1980; Eruton y col., 1981; -Jensen, 1982; Orcasberro, 1983).

Debido que estas enzimas se encuentran en pequeñas concentraciones en el plasma o el suero, es difícil medirlas directamente en forma cuantitativa por lo cual se miden en base a su actividad in vitro bajo ciertas condiciones, en donde la actividad enzimática es directamente proporcional a la concentración de la enzima (Kaneko, 1980).

* Manual de QFB de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (1980).
Químico Farmacobiólogo, Laboratorio Clínico, F.E.S.C., U.N.A.M.

OBJETIVOS

- I. Determinar los niveles de CPK (creatin fosfoquinasa) y TGO (transaminasa glutámico oxalacética) en el suero - de ovinos con antecedentes clínicos de la enfermedad - de músculo blanco.

- II. Evaluar la utilidad de las determinaciones de CPK y -- TGO para el diagnóstico de la enfermedad de músculo -- blanco en ovinos.

- III. Relacionar los niveles de dichas enzimas con los hallazgos a la necropsia e histopatología de los animales -- que llegaron a morir dentro de las fases de muestreo.

MATERIAL Y METODOS

Localización de las explotaciones examinadas.

El presente trabajo se realizó en dos explotaciones ovinas - comerciales. La primera (grupo A) ubicada en Visitación, Municipio de Melchor Ocampo, México; la segunda (grupo B) ubicada en Teoloyucan, México.

Animales con antecedentes clínicos de músculo blanco (grupo A)

Se utilizaron 25 corderos elegidos al azar de los primeros - 45 partos sucitados en el mes de Diciembre, estos provenían de madres de raza indefinida encastados con Suffolk y Rambouillet. El fin productivo de esta explotación son animales para abasto y su alimentación consiste en pastoreo diurno después del corte de alfalfa y pasto nativo.

Por otro lado, la explotación tiene evidencia de casos clínicos de la enfermedad de músculo blanco desde hace varias épocas de parición, los cuales se confirmaron con análisis histopatológicos. Por lo anterior existe como medida de control rutinaria la administración de Vit. E. A estos 25 corderos - no se les aplicó Vit. E.

Animales sin antecedentes de músculo blanco (grupo B)

Se escogieron al azar 20 corderos de animales entre 1 a 15 días de edad provenientes de madres encastadas con Suffolk y Rambouillet. La explotación tiene como fin productivo ovinos para pie de cría. Su alimentación es en corral a base de con centrado preparado en la explotación.

Este rebaño no ha tenido antecedentes de la enfermedad de -- músculo blanco.

Diseño experimental: Se realizaron 3 muestreos sanguíneos para las determinaciones enzimáticas de CPK y TGO, de cada uno de los 25 corderos del grupo A: el primer muestreo se realizó al día de nacidos, el segundo a los 10 y el tercero a los 15 días. También se obtuvo el peso corporal en cada uno de los muestreos.

Para el grupo B solo se realizó un muestreo tomando al azar animales de 1 a 15 días de edad. Lo anterior en base a que no se encontraron valores normales de los niveles de CPK determinados por el método ocupado en este trabajo.

Los corderos al nacimiento se identificaron con el número de parto correspondiente dentro del rebaño del grupo A, éste número se les pintó en la grupa con pintura de aceite.

Muestreo: Las muestras sanguíneas se tomaron por venopunción en la yugular con aguja y Tubos Vacutainer (Kelly, 1972; Todd y Sanford, 1978).

Los pesajes realizados se hicieron con una balanza.

Las muestras se llevaron al laboratorio y fueron colocados - en baño María a 37°C durante 20 minutos para que se separara el coágulo.

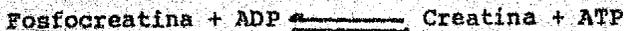
Posteriormente se centrifugaba para separar el suero, a - - 2,000 rpm durante 10 minutos. El suero obtenido se colectaba con una pipeta Pasteur y una jeringa adaptada para succionar; este suero se pasaba a tubos limpios, centrifugándolos nueva - mente a 2,000 rpm durante 5 minutos con el fin de eliminar - completamente las células sanguíneas para evitar la contami - nación por hemólisis. El suero centrifugado dos veces se co - locó en tubos limpios identificados con el número del corde - ro para ser almacenados a - 4°C durante 24 horas, después de este tiempo se efectuaron las determinaciones enzimáticas.

DETERMINACIONES ENZIMATICAS.

La determinación de los niveles séricos de CPK en ovinos se realizó por el método de CK - NAC activado (prueba UV optima - da, Merk-1-Test, Art. 614328, Diagnostica Merk, México).

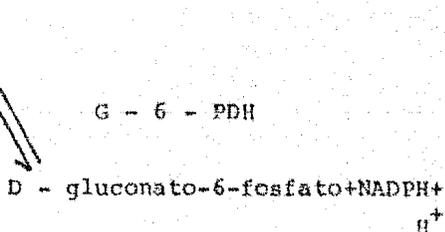
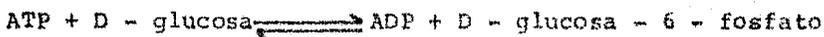
El fundamento de la creatín fofoquinasa (CPK) o creatín cina - sa (CK) es catalizar la transferencia de fosfato de creatina al ADP según la siguiente reacción:

CPK



El ATP que se forma en presencia de glucosa hexocinasa (HC), NADP y glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G - 6 - PDH) reacciona de la siguiente manera:

HC



La velocidad del aumento de NADPH se mide fotométricamente; sus valores son directamente proporcionales a la actividad de CPK en el material de muestra.

La prueba contiene N - acetilcisteina (NAC) como activador de la CPK en suero nativo, que no ha sido almacenado a temperaturas entre + 15°C ----- + 25°C (+ 2°C ----- + 8°C); gracias a este activador este método evita la interferencia de la glutatión reductora encontrada en el suero que reacciona con el glutatión gastando en esta reacción NADPH, lo que daría lugar a valores de CPK demasiado bajos.

Paso de la técnica: El baño María se regula a la temperatura de 25°C (temperatura de medición), el espectrofotómetro UV se calibra para lecturas de 365 nm de longitud de onda cuidando que las cubetas que se vayan a emplear tengan un cm. de espesor.

El equipo de reactivos de CPK - NAC activado de Merk contiene por separado en un frasco con el número 1 la solución amortiguadora (1x85 ml) y 30 viales que contienen la enzima - coenzima - sustrato con el número 2.

Para la preparación de la solución reactiva, se disuelve el contenido del frasco 2 (enzima - coenzima - sustrato) con -- 2.5 ml del frasco 1 (solución amortiguadora); un vial por cada suero problema.

Se mantuvieron la solución reactiva y las cubetas a temperatura constante, posteriormente a 2.5 ml. de solución reactiva se les pipeteo 0.10 ml de suero problema, previamente des congelado a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Después se -- mezclo y se mantuvo a temperatura constante durante 3 minutos; se pasó a la cubeta para medir la extinción (absorbancia) cada minuto, durante 4 minutos con cronómetro.

Ya tomadas las lecturas de absorbancia (densidad óptica) en el espectotómetro se procedió al cálculo para determinar las U/l. (unidades por litro) de CPK.

CALCULO: Se le aplicó al promedio de los cambios de extinción por minuto (E/min.) la siguiente fórmula:

Medición a 365 nm.: $E/\text{min.} \times 7429 = \text{actividad por volumen -- (U/l).}$

Interferencias: Las inyecciones intramusculares de fármacos y los traumatismos pueden llevar a un incremento de CPK en suero. En la prueba no interfiere la hemólisis hasta una con

concentración de hemoglobina de 200 mg/dl. Por otro lado, la --
concentración de bilirrubina en suero afecta a la enzima CPK
(Davison et al, 1981).

La determinación de la enzima TGO (Transaminasa glutámico --
oxalacética) en suero de ovinos se realizó con el método de
Reitman - Frankel modificado (Sigma de México, S.A. no.64171).

En este método, el ácido oxalacético se descompone en ácido
pirúvico que reacciona con la dinitro fenil hidrazina, for--
mando el piruvato de dinitrofenilhidrazina. Con la adición
del hidróxido de sodio se produce un color café rojizo pro--
porcional a la concentración de la enzima.

Pasos de la técnica: Se preparó el baño María a temperatura
constante de 37°C. El espectrofotómetro se calibró a 520 nm
de longitud de onda.

El equipo de reactivos contenía tres frascos enumerados, con
las soluciones reactivas las cuales se prepararon en su tota
lidad, ocupando en cada ocasión sólo lo necesario y lo demás
se almacenó en refrigeración a - 4°C.

El frasco con el número 1 contenía el sustrato amortiguador
(ácido aspártico y alfacetoglutárico en solución amortiguado
ra pH 7.4), el frasco con el número 2 era el desarrollador
de color (DNPH): solución de 2.4 dinitrofenilhidrazina, y el
número 4 era un patrón para la curva de calibración.

La solución número 3 no la incluía el equipo y correspondía
al hidróxido de sodio 0.4 normal que se preparó por separado.

Se prepararon varios tubos de ensaye en una gradilla cada uno con el número de suero problema correspondiente, posteriormente a cada uno se le agregó 1 ml del reactivo No. 1 - (amortiguador 1 y se le colocaron en el baño María a 37°C durante 5 minutos midiendolos con cronómetro. Transcurrido el tiempo se les agregaba a cada tubo 0.2 ml del suero problema que le correspondía (el suero previamente descongelado a temperatura ambiente $22\pm 1^{\circ}\text{C}$), se mezcló bien y se incubaron a 37°C durante una hora exactamente (intervalos de + 30 segundos entre cada muestra son satisfactorios).

Después del tiempo de incubación se sacaron del baño María y se les añadió 1 ml del reactivo número 2 (DNPH desarrolla dor de color) se mezclaron y se dejaron reposar 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron a los -- tubos 10 ml de hidróxido de sodio 0.4 N, se mezcló y se dejarón reposar otros 5 minutos.

La lectura se efectuaba ajustando el aparato a 100% de transmitancia con un blanco de agua destilada. Un blanco de reactivos usando 0.2 ml de agua destilada en lugar de suero se -- corrió con cada determinación.

El porcentaje de transmitancia de las lecturas de los sueros se lefa en unidades Sigma Frankel por mililitro de suero en la curva de calibración.

Examen post - mortem : Los animales que murieron dentro de -- la fase de muestreo fueron llevados al laboratorio de Parasitología de la FES - C donde se les realizó la necropsia , tomándose muestras de los órganos y tejidos afectados. Para

dilucidar afección muscular se mandaron muestras de músculo cardiaco y esquelético para histopatología, estas muestras fueron fijadas en formol al 10% y procesadas con las técnicas de rutina para inclusión y sección en parafina. Los cortes montados en portaobjetos se tiñieron con el colorante hematoxilina - eosina.

Análisis de Datos: Para la comparación entre los muestreos - del grupo A (con evidencias clínicas de la enfermedad de - músculo blanco), tanto para los niveles séricos de la enzi - ma CPK y TGO se elaboró un análisis de varianza y para la - comparación de los promedios obtenidos de los niveles séri - cos de CPK en el grupo A en comparación con los del grupo B (animales sin antecedentes de músculo blanco) se utilizó una prueba de "t" de Student (Hayslett, 1985).

Por otro lado se calculó la correlación entre peso vivo (kg) y cada uno de las dos determinaciones enzimáticas (CPK y - TGO) del grupo A (Hayslett, 1985).

RESULTADOS

Determinación de la enzima sérica CPK

El promedio de la enzima CPK en el grupo A (animales con antecedentes clínicos de la enfermedad de músculo blanco) fue de 3,233 U/l el cual es basatante superior a los valores promedio del grupo B (animales sin antecedentes de músculo -- blanco) de 427 U/l . Además se observó que el grupo A durante los tres muestreos realizados manifestó un incremento de la enzima la cual estadísticamente no fue significativo* -- (cuadro 1) .

Lo anterior se ve apoyado estadísticamente con la figura 1 - en donde se obtuvo que los tres muestreos del grupo A se comportaron de una manera similar con respecto a la enzima, ya que los tres tuvieron una distribución ligeramente sesgada hacia la izquierda. Por otro lado el grupo B mostrado en la figura 1 su comportamiento fue de una distribución con tendencia normal.

Determinación de la enzima sérica TGO

En la evaluación de la enzima TGO del grupo A de sus tres - muestreos se obtuvo un promedio de 103 USF/ml el cual es superior al citado por la literatura, pero el promedio del tercer muestreo está dentro de los valores normales éste en com

paración a los dos primeros muestreos del grupo A manifestó una baja súbita para alcanzar valores normales (cuadro 2).

Esto se ve apoyado y más claro en la figura 2 en donde se observó que los dos primeros muestreos , el comportamiento fue similar teniendo una distribución poblacional normal, - mientras que el último muestreo está sesgado a la izquierda.

Correlación del peso vivo (kg) y los valores séricos de las enzimas CPK y TGO .

La correlación calculada entre el peso vivo y las U/l de la enzima CPK para el primer muestreo del grupo A fue de $r=0.07$ para el segundo 0.02 y para el tercero $r= 0.08$ lo cual indica que el incremento de los kg de peso vivo no explican - el aumento de la enzima.

La correlación del peso vivo con los niveles de la enzima - TGO (USF/ml) del grupo A en sus tres muestreos no indicó relación alguna del comportamiento de la enzima y el incremento de peso.

Cociente CPK/TGO

Del cálculo del cociente CPK/TGO del grupo A en sus tres - muestreos se obtuvieron datos por arriba del promedio de 27^* considerándose así como sospechosos todos los animales de - probable daño muscular esquelético.

Hallazgos a la necropsia

En los dos corderos que murieron, a la necropsia mostraron ligera palidez de masas musculares de los miembros posteriores en pequeños focos. Por otro lado la presencia de líquido en cavidades no fue un hallazgo significativo. Los animales evidenciaron mal estado de carnes.

Estudio histopatológico

En el estudio histopatológico de las muestras de tejido muscular obtenido de los corderos que murieron dentro de la etapa de estudio y pertenecientes al grupo A se encontraron fragmentaciones u ondulaciones de las fibras musculares, de generación de Zenker en pequeños focos de la fibra caracterizados por áreas de material eosinofílico. En los cortes de músculo cardíaco no se observaron cambios de lesión aparente.

CUADRO I

NIVELES PROMEDIO DE CPK EN SUERO DE CORDEROS DEL GRUPO A --
 (CON ANTECEDENTES CLINICOS DE MUSCULO BLANCO) EN SUS TRES --
 MUESTREOS Y PARA EL GRUPO B (SIN ANTECEDENTES DE MUSCULO --
 BLANCO) UN MUESTREO.

MUESTREO	GRUPO A	U/L	GRUPO B	U/L
1	n=25	2,830+ 667	n=20	427 + 290
2	n=23	3,213+ 1,063		
3	n=23	3,877+ 634		

FIGURA 1
FRECUENCIA Y DISTRIBUCION DE LOS NIVELES DE CPK
EN OVINOS DEL GRUPO A EN CADA MUESTREO

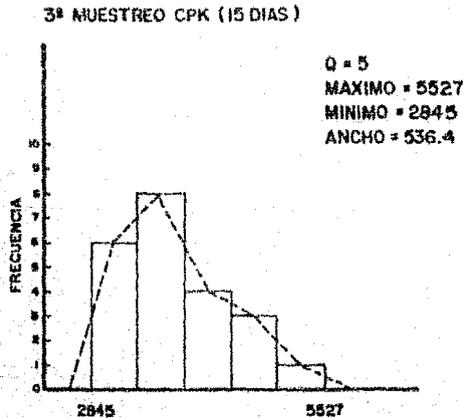
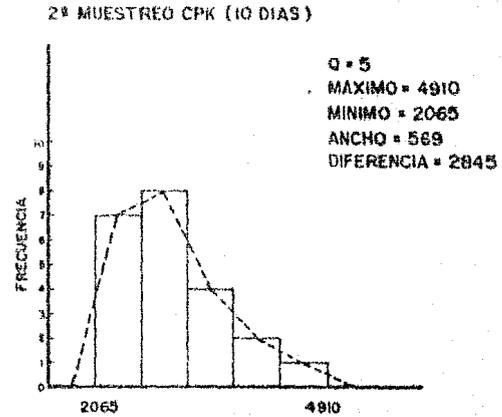
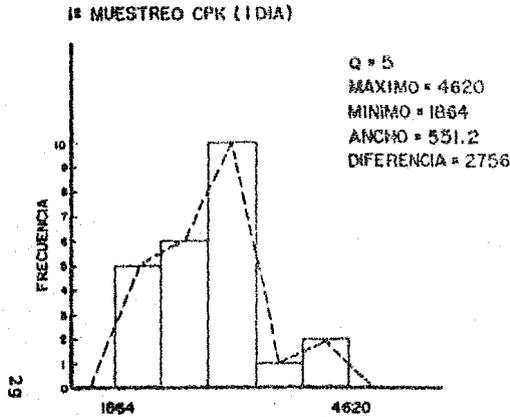
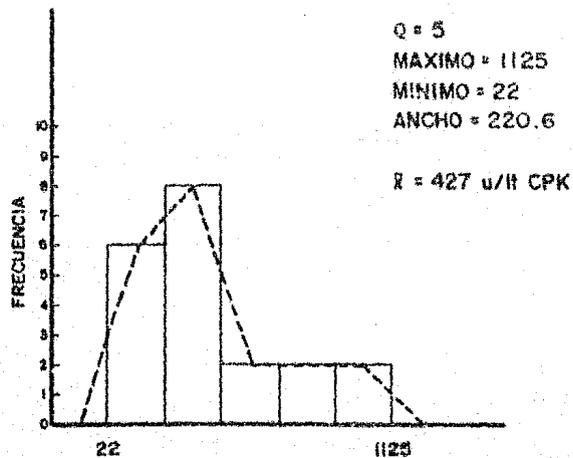


FIGURA 1'
FRECUENCIA Y DISTRIBUCION DE LOS NIVELES DE CPK
EN OVINOS DEL GRUPO B

MUESTREO GRUPO CONTROL CPK



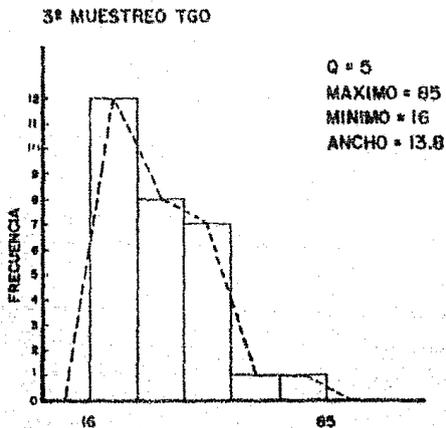
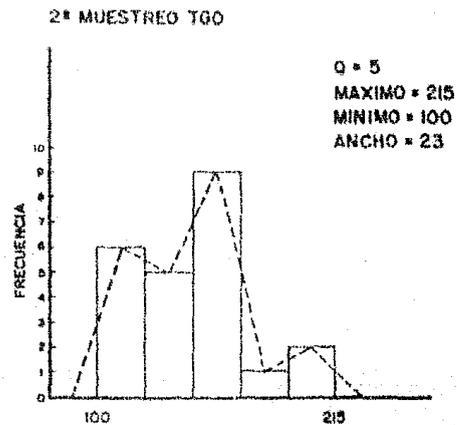
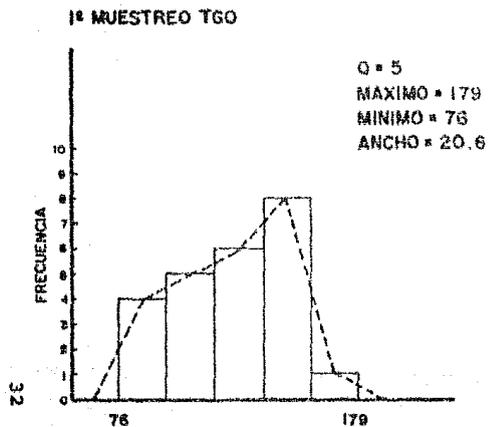
CUADRO 2

NIVELES PROMEDIO DE TGO EN SUERO DE CORDEROS CON ANTECEDENTES CLINICOS DE MUSCULO BLANCO (GRUPO A), POR MUESTREO Y VALORES PROMEDIO DE TGO CITADOS POR LA LITERATURA.

MUESTREO	GRUPO A USF/ml	GRUPO B USF/ml
I	126 \pm 26 n = 25	
II	148 \pm 30 n = 23	26 \pm 31 **
III	35 \pm 19 n = 23	

** Kaneko (1983)

FIGURA 2
 FRECUENCIA Y DISTRIBUCION DE LOS NIVELES DE TGO
 EN OVINOS DEL GRUPO A EN CADA MUESTREO



CUADRO 3

Coeficientes CPK/TGO obtenidos para cada uno de los corderos en sus tres muestreos del grupo A.

1ER. MUESTREO		2DO. MUESTREO		3ER. MUESTREO	
CORDERO	CPK/TGO	CORDERO	CPK/TGO	CORDERO	CPK/TGO
1	29	1	29	1	21
2	32	2	17	2	80
3	20	3	22	3	71
4	35	4	14	4	108
5	14	5	16	5	100
6	28	6	25	6	152
7	18	7	25	7	124
8	16	8	19	8	166
9	16	9	20	9	105
10	17	10	15	10	163
11	20	11	25	11	282
12	23	12	24	12	128
13	33	13	17	13	151
14	26	14	16	14	95
15	24	15	23	15	48
15	17	16	23	16	214
17	30	17	20	17	141
18	26	18	28	18	86
19	17	19	14	19	79
20	18	20	31	20	51
21	30	21	24	21	214
22	24	22	22	22	62
23	19	23	muñic	23	muñic
24	19	24	muñic	24	muñic

DISCUSION

La enfermedad de músculo blanco es de gran importancia debido a las grandes pérdidas que ocasiona en nuestro país, pero a pesar de ello es poca la atención que se le ha dado a su diagnóstico en el área de bioquímica clínica para no tener que llegar hasta la muerte del animal y confirmarla por un estudio histopatológico.

Por lo que respecta a la determinación de las enzimas Creatin fosfoquinasa CPK (alta especificidad) y Transaminasa Glutámico Oxalacética TGO (reactiva especificidad) no se encontró ningún trabajo que analice la importancia del comportamiento de éstas en el diagnóstico de daño muscular en ovinos.

Los valores de CPK obtenidos en este trabajo mostrados en el cuadro 1, indican que el grupo A se encuentra por arriba de los del grupo B, que los hace sospechosos de músculo blanco, ya que como menciona Duncan (1980) en esta enfermedad los valores séricos de CPK se ven muy aumentados.

No se pudo establecer comparaciones con otros autores que figuran en la literatura consultada, pues no indican el método empleado ni como efectuaron las conversiones para el cálculo en unidades por litro (U/l) de los niveles de CPK.

Lo anterior da una gran variabilidad poco coherente, tal es el caso de Whanger (1980) quien obtuvo niveles de CPK de $2,635 \pm 3,683$ U/ml ($2,635,000$ U/l) en animales con dietas deficientes en selenio. Por otro lado, Muth (1971) con valores de 66 ± 22 U/l también en animales con dietas deficientes en selenio y Dent , et al(1979) el cual reporta $200 - 600$ U/l en animales clínicamente enfermos con claudicación, estos datos en comparación con los valores obtenidos en este trabajo de $3,320$ U/l para animales sospechosos de músculo blanco son realmente diferentes, por lo cual tan sólo se hacen comparaciones con los corderos del grupo B el cual es de animales sin antecedentes de músculo blanco y sus niveles de CPK séricos fueron determinados bajo las mismas condiciones y método que el grupo A.

La diferencia de los valores citados por diferentes autores en comparación a los obtenidos de este trabajo posiblemente se deba a diferentes técnicas para las determinaciones de los niveles séricos de CPK, a las condiciones del manejo de la muestra, ya que es una enzima muy sensible pues aumenta cuando hay traumatismos recientes; altas concentraciones de hemoglobina; a la temperatura de almacenamiento (pues no resiste la congelación y a -4 °C más de 24 horas) y por último a la presencia de bilirrubina (Davison et al, 1981 ; Ruiz,1978).

Así pues, solo podrán compararse aquellos valores que estén determinados bajo las mismas condiciones para la medición del nivel sérico de CPK, así como de su conversión en U/l (Kaneko, 1980; Ruiz 1978).

El aumento de CPK es una de las señales más específicas de daño muscular (Kaneko, 1980) sin embargo, también aumenta cuando hay infarto al miocardio. Para el diagnóstico de daño muscular esquelético se recomienda determinar la enzima TGO que es una enzima de realtiva especificidad.

Los niveles de TGO obtenidos en este trabajo se muestran en el cuadro 2, observandose que los dos primeros muestreos - del grupo A existe una similitud a los valores citados por - Mc. Donald et al, (1970) de 200 USF/ml (unidades Sigama Fran Rel por mililitro) en animales con dietas deficientes en se lenio. Los resultados citados por Khanger et al, (1978) osci lan entre 261 ± 202 y $1,542 \pm 2,828$ USF/ml en animales con - dietas deficientes en selenio. El primer rango es comparable con los obtenidos en este trabajo para el grupo A como se - muestra en el cuadro 2 y el segundo con los reportados por Jensen (1982) , quien da valores de 2,000-3,000 USF/ml en animales enfermos de músculo blanco.

Los valores normales obtenidos por Kaneko (1980) coinciden con los del tercer muestreo del grupo A.

La variación entre los tres muestreos del grupo experimental puede deberse a algún error en el manejo de la muestra pués el método de determinación de los niveles de TGO en ambos -- casos fue el mismo.

Por otro lado, algunos autores mencionan que los valores de la enzima TGO vuelve a sus niveles normales de 10 a 14 días después de finalizar la necrosis muscular, ~~o probable cambi-~~

hepático que no fue evaluado en este trabajo. Esto puede explicar los valores obtenidos en el tercer muestreo del grupo A ya que estos fueron de animales muestreados a los 15 días de edad y siguieron con vida.

En la relación CPK y TGO para el diagnóstico de músculo blanco Boerhinger (1980) establece que un coeficiente CPK/TGO de 27 con rango de 13 - 56 indica la existencia de una lesión de músculo esquelético descartando así lesiones del miocardio.

Otra manera posible para esa diferenciación, es la medición de la isoenzima CK-MB (fracción miocárdica de la creatinínasa) la cual en el 95% de los casos se eleva dentro de las 24 horas siguientes al infarto al miocardio aún cuando se manifieste en forma subclínica. La catividad máxima se observa a las 18 horas en comparación a su proporción frente a la actividad de CPK total (Boerhinger,1980).

Hubiera sido deseable tomar muestras de diferentes músculos (biopsias) de cada uno de los animales del grupo A ya que como se ve en el cuadro 3, la mayoría son sospechosos de probable lesión de músculo esquelético, el estudio histopatológico de estas muestras podría reafirmar el diagnóstico de degeneración hialina o de Zenker (Jensen,1982).

Se tomaron muestras de músculo cardíaco y semitendinoso a los corderos que murieron dentro del período del presente trabajo. La elección de estos músculos obedeció a que son los más afectados. Al examen histológico no se encontró en

forma clara la degeneración hialina o de Zenker, sin embargo, se encontraron pequeños focos en la fibra muscular del músculo semitendinoso, esto indica que la cifra del coeficiente CPK/TGO puede ser válido, al igual que la determinación de CPK para el diagnóstico de la enfermedad de músculo blanco.

Con respecto a la utilidad de CPK para el diagnóstico de músculo blanco es importante y de ayuda; se supone así tomando en cuenta que los animales del grupo A provenían de una explotación que se sabe padece de músculo blanco, lo anterior es apoyado con los datos obtenidos por Tortora* (1985) quien de 9 corderos de este rancho a 4 de ellos les observó, a la necropsia e histopatología daños severos de músculo blanco.

* Tortora, J.L. (1985) comunicación personal.

CONCLUSIONES:

- 1.- Los valores séricos de CPK en el presente estudio para los animales provenientes de una explotación con antecedentes de la enfermedad de músculo blanco muestran una notable alteración ya que en comparación con los valores obtenidos para animales sin antecedentes de esta enfermedad se encuentran significativamente muy elevados.
- 2.- No se encontró semejanza alguna de los niveles séricos de CPK con los reportados por otros autores en ovinos con deficiencia de Selenio y/o sospechosos de músculo blanco.
- 3.- De los niveles séricos de TGO se encontró similitud en la fase final de la evaluación con los citados por otros autores en ovinos con deficiencia de Vit. E y/o Selenio o sospechosos de músculo blanco.
- 4.- De los niveles séricos de TGO sólo hubo diferencia significativa entre los primeros dos muestreos en comparación con el tercero del grupo A en estudio.
Por lo que considero que es importante tomar un grupo control también para esta enzima.
- 5.- De los valores obtenidos del coeficiente CPK/TGO se obtuvo que todos los animales caían dentro del rango de animales sospechosos de daño muscular esquelético, incluyendo los dos corderos muertos a los que en el estu-

dio histopatológico se les encontró degeneración hialina o de Zenker en forma focal del músculo semitendinoso.

- 6.- De lo anterior se concluye que la enzima CPK sí es de validez en el diagnóstico de la enfermedad de músculo blanco.
- 7.- De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, y los analizados por la literatura citada, también se concluye que siempre que se efectúe una determinación de los niveles séricos de CPK se deberá hacer bajo el mismo método y siempre con un grupo control debido a que sólo se pueden comparar valores determinados de igual manera. Considerando también que es una enzima muy sensible.
- 8.- Los resultados también indicaron que se puede prescindir de la determinación de la enzima TGO pues la alteración de CPK es suficientemente notoria para el diagnóstico de daño muscular.
- 9.- De acuerdo al costo del equipo de reactivos para la determinación de la enzima CPK se considera que se puede emplear como una prueba de rutina ya que sólo la muerte de un cordero pagaría el precio de más de una determinación.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Anderson, P.H.; Barret, S. and Patterson, D.S.P. (1976).
The significance of elevated plasma CPK activity in muscle disease of cattle.
J. Caomp. Path. 86: 130-137.
- 2.- Artiza S. y Ponzoni R. (1980).
Temas selectos de ovinos No. 2. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, México.
- 3.- Berrocal, A. (1980).
Enfermedades que responden a la deficiencia de vitamina E y Selenio en suinos y rumiantes de Costa Rica.
Cienc. Vet. 2: 159-167.
- 4.- Bruton, A.; Ocampo, C.L.; Auro, O.A.; Sumano, L.H.; y Basurto, C.H. (1981).
Evaluación de la interferencia provocada por el levamisol, el tiabendazol y refoxanide en los resultados de pruebas de laboratorio clínico en bovinos.
Vet. Mex. 12: 223-228.
- 5.- Davison, D.F.; Hainsworth, I.R.; Rowan, R.; Kousourou, G. and Colgan, M. (1981).
Possible effect of bilirubin concentration on the in vitro lability of creatin kinase during storage.
Ann. Clin. Biochem. 18: 185-186.

- 6.- Dent., A.C.; Richards, R.B. and Nairn, M.E. (1979).
Congenital Progressive ovine muscular dystrophy in Western Australia.
Aus. Vet. J. 55: 297.
- 7.- Dibartola, S.P. and Tasker, A.B. (1977).
Elevated serum Creatin Phosphokinase: A study of 53 cases and review of its diagnostic usefulness in clinical veterinary medicine.
Amer. Ani. Hosp. Assoc. 13: 744-753.
- 8.- Duncan, J. R. (1977).
Veterinary laboratory medicine. Clinical pathology.
The Iowa State University Press, Ames. Iowa USA: 95.
- 9.- Hayslett, Hot. (1985).
Estadística simplificada.
Ed. Minerva - Doubleday, México, D.F.
121 - 127; 178 - 199.
- 10.- Jensen, E. (1982).
Disease of sheep.
Lea and Febeger. USA:
- 11.- Jennings, A. (1970).
Patología animal.
Ed. La Prensa Médica Mexicana: 280-282.
- 12.- Jubb, K.F.V. and Kennedy, P.C. (1980).
Pathology of domestic animals.
Ed. Academic Press, New. York, USA: 482.

- 13.- Kaneko, J.J. (1980).
Clinical Biochemistry of domestic animals.
3er. Ed.; Ed. Academic Press; USA: 561.
- 14.- Kelly, A. (1983).
Diagnóstico clínico veterinario. 5a. Ed.
Ed. Continental, México: 303 - 308.
- 15.- Maynard, L.A. (1983).
Nutrición animal. 4a. Edición
Ed. Mc. Graw Hill: México, 281-285
- 16.- Mc. Donald, D.W.; Christian, R.G.; Whenham, G.R. and --
Howell, J. (1976).
A review of some aspects of vitamin E - Selenium respon
sive disease with a note on their possible incidence -
in Alberta.
Can. Vet. J. 17: 16-71.
- 17.- Mc. Murray, C.H. and Rice, D.A. (1982).
Vitamin E and selenium deficiency diseases.
Irish Vet. J. 36: 56-67.
- 18.- Medway, W. (1975).
Patología clínica veterinaria.
Ed. UTREA, Hispano Americana, México. 1a. Ed. 6, 17, 19, 66.
- 19.- Muth. O.H. (1970).
Selenium responsive disease of sheep.
J. Am. Vet. Med. Ass. 157: 1507-1511.

- 20.- Muth, O.H.; Whanger, P.D.; Weswing, P.H. and Oldfield, J.E. (1971).
Occurrence of myopathy in lambs of ewes fed added arsenic in selenium - deficient ration.
Am. J. Vet. Res. 32:10
- 21.- Pérez, I.A. (1981).
Situación actual de la ovinocultura en México.
Mem. Curso de actualización: aspectos de producción ovina, FMVZ, México: 1-12.
- 22.- Rodwell, M.M.; Martin, W.D. y Mayes, A.P. (1982).
Bioquímica de Harper 8a. Edición.
Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, D.F. 129-175, 234-300
- 23.- Rotruck, J.T.; Pope, A.L.; Ganther, H.E.; Swanson, A.; Hafeman, D.C. and Hoeksta, W.C. (1973).
Selenium biochemical role as a component of glutathione peroxidase.
Science 197: 588-590.
- 24.- Ruiz, S.H. (1978).
Enzimología clínica.
Mem. 2do. curso de actualización en bioquímica clínica veterinaria, U.N.A.M.: 47-105.
- 25.- Runells, R.A. (1968).
Principios de patología veterinaria.
Ed. Continental: México 7a. Ed. 768.

- 26.- Smith, H.A.; Jones, T.C. and Hunt, R.D. (1974).
Veterinary Pathology. 5a. Ed.
Lea and Febiger, Philadelphia, USA; 44, 992, 994, 1049,
1051.
- 27.- Strought, M.K.A. (1985).
Niveles de selenio en alfalfa y sangre de vacas Holstein
y correlación entre niveles de Se y glutatión peroxida-
sa.
Tesis maestría. P.M.V.Z., U.N.A.M.
- 28.- Todd y Sanford (1978).
Diagnóstico clínico por el laboratorio.
6a. Ed., Editorial Salvat: 105-106.
- 29.- Underwood, E.U. (1971).
Trace elements in human and animals nutrition.
Academic Press; New York; USA; 334-342.
- 30.- Whanger, P.D.; Weswing, P.H.; Schmitz, J.A. and Oldfield,
J.E. (1978).
Effects of various methods of selenium administration -
on white muscle disease, glutathione peroxidase and --
plasma enzyme activities in sheep.
J. Anim. Sci. 47: 1157-1166.
- 31.- White, H.S. (1977).
Principios de Bioquímica.
Ed. Mc. Graw Hill, México: 1054-1055.

32.- Wood, P.H.A. and Smith, J.E. (1979).

Pathogenesis and diagnosis of selenium deficiency.

Agr. Pract. Vet. Med. Small anim. Clin. 74: 206-207.