



ANEXO 1

FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN CON
EL FINANCIAMIENTO DEL FEDU

1. Título del proyecto

Cambios bioquímicos y enzimáticos sanguíneos en el estado avanzado del adenocarcinoma pulmonar ovino (APO)

2. Área de Investigación

Área de investigación	Línea de Investigación	Disciplina OCDE
Ciencia Animal	Ciencia y producción animal	Salud animal

3. Duración del proyecto (meses)

12

4. Tipo de proyecto

<u>Individual</u>	☐
<u>Multidisciplinario</u>	☒
<u>Director de tesis pregrado</u>	☐

4. Datos de los integrantes del proyecto

Apellidos y Nombres	Coila Añasco Pedro Ubaldo
Escuela Profesional	Medicina Veterinaria y Zootecnia
Celular	951965410
Correo Electrónico	pcoila@unap.edu.pe

Apellidos y Nombres	Ruelas Calloapaza Domingo Alberto
Escuela Profesional	Medicina Veterinaria y Zootecnia
Celular	986363361
Correo Electrónico	druelas@unap.edu.pe



I. Título

Cambios bioquímicos sanguíneos y enzimáticos en el estado avanzado del adenocarcinoma pulmonar ovino (APO)

II. Resumen

La adenomatosis pulmonar ovino (APO) es una enfermedad cancerígena de origen viral de alta prevalencia en el Perú y, sobre todo, en el departamento de Puno, un problema que trae consigo grandes pérdidas económicas en los productores de ovinos. El objetivo del presente estudio es determinar algunos cambios metabólicos sanguíneos que ocurren en el estado avanzado del adenocarcinoma pulmonar ovino (APO) con el propósito de conocer el estado funcional de algunos órganos del animal afectado. Para el estudio, se tomarán muestras sanguíneas de 10 ovinos adultos positivos a APO y 10 sin signos de APO del Centro Experimental Carolina de la UNA-Puno (altitud de 4000 m). La determinación de los animales positivos se realizará por los signos clínicos y por la prueba de levantamiento de los cuartos traseros (prueba de la “carretilla”) ya que los animales con APO avanzado emanan abundante exudado líquido por los ollares al levantar las patas posteriores; además, dos animales serán sacrificados para la confirmación de APO mediante el diagnóstico histopatológico. Serán considerados negativos a APO los que no muestren los mismos signos. Se determinarán los siguientes parámetros bioquímicos sanguíneos: Proteínas totales y fraccionadas (albúminas y globulinas), creatinina, bilirrubina total, nitrógeno ureico (BUN) y la actividad de las siguientes enzimas: alanina transaminasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP) y amilasa. Para la determinación se realizará mediante técnicas colorimétricas-espectrofotométricas en el laboratorio de bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Para la comparación de medias se utilizará la Prueba de t para muestras independientes. Se reportarán los estadísticos descriptivos de tendencia central y de dispersión. El procesamiento de datos se realizará en hoja Excel para luego someterlos al software InfoStat.

III. Palabras claves (Keywords)

APO, bioquímica, enzimas, ovino.

IV. Justificación del proyecto

El adenocarcinoma pulmonar ovino (APO) es un tumor contagioso de las ovejas. Es una enfermedad cancerígena respiratoria progresiva que afecta sobre todo a animales adultos y que se presenta en muchas regiones del mundo. La causa de la enfermedad es un beta-retrovirus denominado retrovirus Jaagsiekte de las ovejas (JSRV) (OIE, 2018).

Hoy en día, la enfermedad está muy diseminada en el Perú entero, siendo un problema de difícil control o erradicación. Un ejemplo, es el Centro Experimental Carolina de la UNA-Puno, donde existe alta prevalencia de la enfermedad, constituyéndose en una de las principales causas de mortalidad en ovinos, según las planillas de contada.

El APO, tiene un largo período de incubación, razón por la cual la enfermedad se manifiesta clínicamente con mayor frecuencia en ovejas de más de dos años de edad, con un máximo de casos a los 4-8 años, pero también se han reportado casos excepcionales en corderos. El APO causa grandes pérdidas económicas en los hatos afectados (Sharp y DeMartini, 2003).

Los signos más importantes del APO, son la dificultad respiratoria progresiva, en particular después del ejercicio; la gravedad de los signos refleja la extensión del desarrollo tumoral en los pulmones. Una característica distintiva, es la acumulación de líquido en el tracto respiratorio, que da lugar a estertores húmedos que son fácilmente detectados por auscultación. La elevación de los cuartos traseros y el descenso de la cabeza de las ovejas afectadas (prueba de la carretilla) pueden ocasionar rinorreas de líquido mucoso espumoso. La tos y la falta de apetito no son comunes, pero una vez que se evidencian los signos clínicos, la pérdida de peso es progresiva y la enfermedad es mortal en semanas o meses. La muerte se acelera a menudo por la superposición de una neumonía bacteriana (Summers et al., 2002).

En la actualidad, el diagnóstico del APO se basa en los signos clínicos y en la anátomo-patología aunque la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede resultar de utilidad como método ante-mortem, pero es cara. No existen pruebas serológicas específicas que puedan utilizarse para el diagnóstico del APO en animales vivos (OIE, 2018). De ahí la necesidad de seguir buscando algunos marcadores que podrían ayudar u orientar en el diagnóstico del APO.

Hay muy poca información con respecto a los cambios metabólicos que ocurren durante evolución de la enfermedad, específicamente, en relación a los cambios en los parámetros bioquímicos y enzimáticos sanguíneos que ocurren en el animal afectado. Esta es la razón por la cual se ha diseñado el presente estudio, cuyo propósito es comparar la actividad de enzimas plasmáticas de animales con diagnóstico de APO (a la prueba de la carretilla) versus los negativos a APO a la misma prueba, considerando que los parámetros bioquímicos y enzimáticos son herramientas clínicas poderosas para determinar el daño que vienen sufriendo determinados órganos del animal, ya que muchas de ellas son órgano-específicas. La elevación o disminución de alguna de ellas puede ser signo de necrosis (destrucción celular), aumento de la permeabilidad de membrana, sobreproducción de enzimas (e.g. neoplasia), menor eliminación (e.g. por obstrucción biliar), y por incremento de células inflamatorias, etc.

V. Antecedentes del proyecto

5.1. El adenocarcinoma pulmonar ovino (APO)

Definición y etiología

El APO o enfermedad de Jaagsiekte, es un tumor pulmonar transmisible de las ovejas causado por el retrovirus de la oveja Jaagsiekte (JSRV). El JSRV induce la transformación neoplásica de las células epiteliales secretoras alveolares y bronquiales y los tumores resultantes pueden crecer hasta ocupar una parte significativa del pulmón. El crecimiento tumoral suele ir acompañado de una sobreproducción de líquido en el pulmón, lo que compromete aún más la respiración normal. El período entre la infección y la aparición de los signos clínicos puede ser de varios meses o años y muchas ovejas infectadas con JSRV no presentan ningún signo clínico durante su vida. Esto permite la propagación de APO a otros animales a través del contacto con animales infectados, pero aparentemente normales (Griffiths et al, 2010)

El cáncer es el resultado del cambio o transformación que van a sufrir las células epiteliales alveolares del tipo II y de las células de clara o células bronquiales no ciliadas del pulmón, pero que tiene un porcentaje bajo de metástasis en los nódulos linfáticos regionales (DeMartini et al, 2003).

Los retrovirus utilizan la transcripción inversa para crear una copia de DNA de cadena doble (un provirus) a partir de su genoma de RNA, que se inserta dentro del genoma de su célula huésped. La transcripción inversa se lleva a cabo utilizando la enzima retrotranscriptasa, que el virus lleva con él dentro de su envoltura. Una vez que el provirus se integra en el DNA de la célula huésped, se transcribe utilizando los mecanismos celulares normales, para producir proteínas y material genético virales. Para que se produzca una infección, primero el virus se fija a la célula huésped en una o varias moléculas receptoras de la superficie celular. De esta manera, el RNA viral ingresa en la célula huésped y se separa de la envoltura externa (pérdida de la envoltura) para poder replicarse dentro de la célula huésped mediante un proceso que requiere enzimas específicas. Los componentes virales recién sintetizados luego se ensamblan en una partícula viral completa. A continuación, se produce la muerte de la célula huésped, con liberación de nuevos virus capaces de infectar a otras células. Cada paso de la replicación viral involucra diferentes enzimas y sustratos. Las consecuencias de la infección viral son muy variables. Muchas infecciones causan enfermedad aguda tras un período de incubación breve, pero algunas son asintomáticas o causan síntomas menores y pueden no advertirse salvo en una visión retrospectiva. Las defensas del huésped logran vencer muchas infecciones virales, pero algunas permanecen en estado de latencia, y algunas causan enfermedades crónicas (Kramer, 2020).

Distribución geográfica

La enfermedad del adenocarcinoma ovino es de distribución mundial causando grandes pérdidas económicas en los países como Escocia, Perú y Sudáfrica. Siendo descrita en el Perú en el año 1945 en la sierra central del país en un inicio (Cuba-Caparó et al, 1961). Posteriormente se fue diseminando a otras regiones esto se dio debido principalmente al intercambio de reproductores mejorados que fueron procedentes de empresas asociativas de la sierra central hacia el sur y fue de esta manera que se infectó a poblaciones de ovinos criollos (Ellis et al, 1993).

Morbilidad y mortalidad

En la mayoría de los casos de APO se produce en ovejas que son mayores de 2 años de edad, el pico de incidencia es en los animales de 3 a 4 años, es raro que se presente en las ovejas menores de 7 a 9 meses de edad. Pero una vez que se manifiestan los tumores, los casos siempre terminan en muerte. Los rebaños que recién se infectan tienen altos índices de mortalidad y de morbilidad, con un 80% de muertes en el rebaño por lo cual cuando el virus del JSRV se encuentra presente durante un largo tiempo, el índice de pérdida anual generalmente es de 2-5%, no obstante, en algunas granjas se han reportado pérdidas de hasta un 20% (OIE, 2018).

Transmisión

El APO puede ser transmitido por la vía respiratoria a través de los aerosoles o microgotas. Ya que el virus se aloja en los exudados respiratorios de las ovejas que están infectadas, así como también se puede encontrar en los tumores, líquidos pulmonares, leucocitos de sangre periférica y los órganos linfáticos; mucho antes de que los tumores se formen, los virus se pueden encontrar en las células linforreticulares. Se ha probado la transmisión horizontal en ovejas de diferentes edades; sin embargo, los neonatos parecen ser específicamente susceptibles a la infección. Muchos autores indican que no hay evidencia, aunque la transmisión en el útero sea significativa en la epidemiología de esta enfermedad; pero estudios recientes indican que el JSRV puede diseminarse por la leche a través del calostro. El Jaagsiekte de la oveja no logra sobrevivir por periodos largos en el medio ambiente (Griffiths et al., 2010).

En los estadios siguientes el virus está sumamente concentrado en las secreciones nasales, particularmente cuando los animales se están alimentando, ya que es ahí que tienen la cabeza baja (Talenas, 2017).

Signos clínicos

Los síntomas clínicos en el APO pueden estar ausentes por periodos de tiempo que varían de meses hasta años y estos síntomas son vistos solamente en animales adultos. Pueden tener un carácter insidioso y ser observados como un hallazgo intercurrente. Las primeras manifestaciones clínicas son tos e intolerancia al ejercicio, hay abundante secreción nasal de exudado acuoso, que se observa mejor cuando los animales están con la cabeza baja, o cuando se tienen los miembros posteriores levantados a nivel de la cabeza (Driemeier et al., 1998).

El primer indicador de OPA en un rebaño es a menudo un mayor número de muertes en ovejas adultas por neumonía que no responde al tratamiento con antibióticos. Los animales afectados tienen dificultades para respirar, especialmente cuando hacen ejercicio, y pueden adelgazar mucho a pesar de tener un apetito normal. Un signo patognomónico del APO es la producción de grandes cantidades de líquido en el pulmón que es espumoso, claro, lechoso o, en ocasiones, rosado y que drena por las fosas nasales de la oveja cuando baja la cabeza. Se pueden recolectar hasta 400 ml por día de estos animales levantando la parte trasera (la prueba de la "carretilla"), aunque 10-40 ml por día es más común (Cousens et al., 2009).

Una vez que se observan los signos clínicos, la oveja por lo general vive solo unos pocos días más y puede morir repentinamente después del ejercicio o la exposición al frío. A pesar de los signos clínicos únicos en algunos animales afectados, en muchos casos no se observa líquido pulmonar. Por lo tanto, un diagnóstico definitivo de APO en un animal siempre requiere la identificación de los hallazgos macroscópicos e histopatológicos característicos mediante un examen post mortem. El APO ocurre en especies de ovejas domésticas y salvajes y no afecta a ningún otro ganado excepto a las cabras, en las cuales se han descrito casos naturales solo en animales afectados sub clínicamente (De las Heras et al., 2003).

Pruebas diagnósticas

El método más exitoso para identificar APO temprano ha sido la prueba de PCR de muestras de lavado broncoalveolar recolectadas de animales vivos. Sin embargo, la técnica de muestreo es laboriosa y solo toma muestras de una pequeña región del pulmón, por lo que también podrían pasar por alto los primeros casos (Voigt et al., 2007).

El trabajo para desarrollar pruebas preclínicas mejoradas para APO continúa, ya que existe una clara demanda por parte de los granjeros y veterinarios. En particular, habría una buena aceptación de la prueba para confirmar el estado de enfermedad de las ovejas de alto valor (Griffiths et al, 2010).

5.2. Cambios metabólicos durante el cáncer

El cáncer constituye el resultado de la transformación genotípica y fenotípica de la célula normal que se caracteriza fundamentalmente por la pérdida del control del crecimiento celular. Diversas sustancias y moléculas derivadas de la actividad del metabolismo celular pueden aparecer en sangre circulante como enzimas, proteínas, metabolitos u hormonas, los cuales pueden ser utilizadas como marcadores tumorales. Entonces, cualquier molécula que puede ser identificada con el proceso de transformación maligna, proliferación, desdiferenciación y metástasis de las células neoplásicas puede, en última instancia, considerarse un marcador tumoral. En los últimos años se han realizado esfuerzos para identificar

marcadores tumorales específicos, así como epítomos igualmente específicos (Yamauchi et al, 2001)

En las células cancerosas el metabolismo se encuentra sumamente alterado. A medida que el tumor se expande, supera los límites de difusión de su suministro de sangre local, lo que conduce a hipoxia y estabilización del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF). HIF inicia un programa de transcripción para solucionar el estrés hipóxico. Por ejemplo, el metabolismo celular se desplaza hacia la glucólisis por el aumento de la expresión de enzimas glucolíticas, transportadores de glucosa e inhibidores del metabolismo mitocondrial. Además, HIF estimula la angiogénesis. Estudios recientes han demostrado que también existe aumento del consumo de glucosa, disminución de la fosforilación oxidativa y producción de lactato concomitante (Hsu P. & Sabatini D., 2008).

Las reacciones biosintéticas en la célula cancerosa están incrementadas lo que demanda un aumento en la demanda de ATP. La síntesis de lípidos, por ejemplo, requiere la cooperación de la glucólisis, el ciclo de Krebs y la vía de las pentosa fosfato. Como el piruvato debe entrar en las mitocondrias en este caso, evita la conversión a lactato y, por lo tanto, no puede contribuir al ATP derivado de la glucólisis. Por esta razón, existe “hambre” de glucosa por las células cancerosas teniendo que recurrir al uso de otras fuentes de energía, como las grasas y proteínas. Recientemente, se ha demostrado que la glutamina puede ser metabolizada por el ciclo del ácido cítrico en las células cancerosas y convertirse en lactato, produciendo NADPH para la biosíntesis de lípidos y oxalacetato para la reposición de los intermedios del ciclo de Krebs (DeBerardinis et al., 2007).

5.3. El perfil metabólico

El perfil metabólico es un conjunto de determinaciones de laboratorio que permiten la caracterización de un individuo o grupo de ellos y tiene por objeto aportar una ayuda clínica para estudiar la naturaleza de los trastornos metabólicos y también ayuda a valorar el estado nutricional y refleja la dinámica metabólica del animal (Campos et al., 2007).

En la realización de un perfil metabólico se determinan los diferentes metabolitos sanguíneos relacionados con el estado funcional de las vías metabólicas las que están determinadas por el consumo de nutrientes al seguir diferentes vías después de su ingestión en el organismo, el estado de estas vías puede verse afectados por los desbalances en el ingreso, transformación o egreso de los ingredientes de la ración consumida por los animales (Hincapie, 2012).

En ganado se puede hacer los perfiles metabólicos los diferentes estadios reproductivos o productivos del animal (gestación, lactancia, antes del parto, después del parto, etc.) o cuando una combinación de factores nutricionales y metabólicos contribuye a menudo al desarrollo de trastornos (Bradford, 2010).

5.4. Antecedentes

Se colectaron muestras de sangre de 97 ovejas sacrificadas (37 machos, 58 hembras), de 4 a 6 meses de edad con el objetivo de determinar algunos parámetros bioquímicos sanguíneos, entre ellos: actividades séricas de aspartato aminotransferasa (AST), gamma-glutamil transferasa (GGT) y fosfatasa alcalina (ALP), y niveles séricos de bilirrubina total y directa, urea y creatinina. Los valores medios obtenidos fueron: AST = $126 \pm 23,9$ U / L; GGT = $54,6 \pm 15,4$ U / L; ALP = $152 \pm 90,7$ U / L; bilirrubina total = $0,28 \pm 0,10$ mg / dL; bilirrubina directa = $0,10 \pm 0,04$ mg / dL; urea = $41,8 \pm 10,3$ mg / dl; creatinina = $1,48 \pm 0,21$ mg / dL. Se concluye que todos los niveles de constituyentes en suero durante el sacrificio estuvieron dentro de los valores normales para la especie (Santana et al, 2009).

Se estudio 12 parámetros bioquímicos sanguíneos de la raza Xisqueta del Pirineo de Lleida, España, especie que se caracteriza por su buena adaptación a las condiciones de alta montaña pero que por diversos factores económicos y sociales se encuentra en peligro de extinción. Debido a la inexistencia de estudios previos a nivel hematológico y bioquímico clínico en la raza, se ha propuesto el análisis de 12 parámetros bioquímicos, cuyos resultados se muestran en la Tabla 1 (Avellanet et al., 2007).

Tabla 1: Estadísticos descriptivos de los parámetros bioquímicos de la raza Xisqueta

Parámetro	Media	CV	Rango
Colesterol (mg/dL)	80.61	19.62	49.5-116.3
Triglicéridos (mg/dL)	63.29	32.21	33-109.7
Creatinina (mg/dL)	0.98	20.36	0.6-1.5
Bilirrubina Total (mg/dL)	0.0035	123.36	0-0.07
Urea (mg/dL)	39.68	20.96	24.9-59.6
Fósforo inorgánico (mg/dL)	6.41	21.55	3.71-10.05
Albúmina (g/dL)	3.48	17.74	0.97-4.19
ALT (UI)	21.97	31.19	12-37
AST (UI)	116.48	21.03	66-194
LDH (UI)	1047.86	15.01	676-1341
GGT (UI)	59.81	29.7	36-102
CK (UI)	189.56	74.26	50-451

Se determinó los parámetros bioquímicos enzimáticos (Transaminasa Glutámico Pirúvica (ALT), Transaminasa Glutámico Oxalacético (AST), Fosfatasa Alcalina (ALP), Gamma Glutamyltransferasa (γ -GT), y Lactato Deshidrogenasa (LDH)) en niños con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) antes del tratamiento antineoplásico. Se estudiaron 30 niños con LLA entre 2 y 15 años, en diversos Centros Neoplásicos de Lima. La colecta sanguínea se realizó en tubos BD Vacutainer® de tapa color rojo, procesados en el analizador semiautomatizado BIOTEC® EMP-168, con reactivos enzimáticos de Wiener Lab Group bajo el método modificado de Szaaz y UV-Optimizado por IFCC, SSCC y SFBC. Resultados: El 60% correspondió a niños y el 46,7% corresponde a las edades entre 2 a 6 años. Los niveles séricos de AST estuvieron incrementados en el 33,3% en niños y el 50% en niñas. Los valores séricos de ALT estuvieron incrementados en el 33,3% de niños y en el 41,7% de niñas; solamente el 25% de niñas presentaron valores incrementados de γ -GT; la ALP estuvo acrecentada en el 44,4% de niños y en el 66,7% de niñas. Por otro lado, los niveles de LDH estuvieron acrecentados en el 55,6% de niños y en el 41,7% de niñas. Conclusión: Las pruebas enzimáticas LDH, AST, ALT y ALP se encuentran aumentados en niños con LLA con respecto a los valores normales, debido al síndrome de lisis tumoral caracterizada por alteraciones electrolíticas, y como consecuencia de la destrucción masiva de células tumorales y la liberación rápida de grandes cantidades de elementos intracelulares (Moya y Pio, 2015).

VI. Hipótesis del trabajo

Considerando que el APO es una enfermedad cancerígena donde el metabolismo se encuentra alterado, es probable que en su estado avanzado existan variaciones en los niveles de algunos parámetros bioquímicos y en la actividad de muchas enzimas.

VII. Objetivo general

Evaluar los cambios en los parámetros bioquímicos sanguíneos y actividad enzimática que ocurre en el estado avanzado del adenocarcinoma pulmonar ovino (APO) del Centro Experimental Carolina de la UNA-Puno ubicado a 4000 msnm..

VIII. Objetivos específicos

1. Cuantificar los niveles plasmáticos de proteínas totales y fraccionadas (albúminas y globulinas), creatinina, bilirrubina total, nitrógeno ureico (BUN) en ovinos con y sin APO.
2. Determinar la actividad enzimática de la alanina transaminasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP) y amilasa en plasma sanguíneo de animales de ovinos con y sin APO.

IX. Metodología de investigación

9.1 Animales

Para el estudio se utilizarán 20 ovinos adultos Corriedale del C.E. Carolina de la UNA-Puno, ubicado a una altitud de 4000 m. De los 20 animales, 10 corresponderán a animales que presenten el estado avanzado del APO (con signos visibles y positivos a la prueba de la carretilla) y 10 a animales sin la enfermedad visible o negativos (grupo control). El tipo y tamaño de muestreo considerado para el presente estudio corresponde al aleatoria y según criterio.

Se incluirán animales adultos, mayores de 4 años. Se excluirán animales jóvenes (menores a 3 años) y enfermos por otras causas y con defectos hereditarios.

9.2. Metodología

a) Fase de campo

- Identificación de animales con y sin APO en el C.E. Carolina.
- Examen clínico del animal y ejecución de la prueba de la carretilla.
- Obtención de muestras de sangre. Utilizando agujas y tubos vacutainer con anticoagulante EDTA (tapa lila), se obtendrán 3-5 mL de sangre por punción en la vena yugular. Labor que se realizará desde las 5 a 7 am. Las muestras, debidamente identificadas y rotuladas, serán colocadas en termo con gel refrigerante (2-8°C) para su conservación y transporte al laboratorio.
- Confirmación histopatológica. Se tomarán muestras de tejido pulmonar en formol al 10% para realizar cortes histopatológicos.

b) Fase de Laboratorio

Esta fase se realizará en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNA-Puno.

- Obtención de plasma sanguíneo mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. El plasma obtenido se almacenará en viales de 2 mL y conservados en refrigeración hasta el momento de su análisis bioquímico.

- Diagnóstico diferencial. Con la finalidad de confirmar el diagnóstico, se sacrificarán 2 animales APO positivos, a la prueba de la carretilla, de los cuales se tomarán muestras de tejido pulmonar para realizar el diagnóstico histopatológico, que es la prueba gold estándar para el APO.
- En la Tabla 1, se presenta los componentes sanguíneos a determinar, para lo cual, se utilizarán reactivos de Wiener Lab © (Argentina).

Tabla 1. Parámetros bioquímicos y enzimáticos sanguíneos a cuantificar y sus unidades de expresión

Parámetro/Actividad	Unidad de medida	Técnica de análisis bioquímico
Bioquímicos		
Proteínas totales	g/dL	Biuret
Albúminas	g/dL	Cresolsulfonftaleína (BCG)
Globulinas	g/dL	Por diferencia
Creatinina	mg/dL	Reacción de Jaffe
Bilirrubina total	mg/dL	Diclorofenildiazonio (DPD)
Nitrógeno ureico (BUN)	mg/dL	Ureasa
Enzimáticos		
ALT	UI/L	Método de Reitman y Frankel
ALP	UI/L	Método de Bessey Lowry optimizado
Amilasa	UI/L	Método cinético

9.3. Análisis estadístico

El estudio será conducido en un diseño completamente al azar (DCA) bajo un Para la comparación de datos de los parámetros bioquímicos se utilizará la Prueba de t de student a un $\alpha=0.05$.

Previo al análisis, los datos se someterán a la prueba de normalidad mediante el test de Shapiro-Francia y la prueba de homogeneidad de varianzas, mediante un análisis gráfico, para lo cual también se utilizará el Infostat.

X. Referencias

- Avellanet, R., Cuenca R., Pastor J. y Jordana J. (2007). Parámetros hematológicos y bioquímico clínicos en la raza ovina Xisqueta. Arch. Zootec. 56 (Sup. 1): 497-501.
- Bradford P. S. 2010. Medicina Interna de Grandes Animales. Cuarta Edition, Publisher Elsevier Mosbi.
- Campos G., Cubillos C. y Rodas G. (2007). Indicadores metabólicos en razas lecheras especializadas en condiciones tropicales en Colombia. En https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/643/1166
- Cousens C, Thonur L, Imlach S, Crawford J, Sales J et al. (2009) Jaagsiekte sheep retrovirus is present at high concentration in lung fluid produced by ovine pulmonary adenocarcinoma-affected sheep and can survive for several weeks at ambient temperatures. Research in Veterinary Science, 87, 154e156.
- De las Heras M, Gonzá lez L, Sharp JM (2003) Pathology of ovine pulmonary adenocarcinoma. Current Topics in Microbiology and Immunology, 275, 25-54.



DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., & Thompson, C.B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 19345–19350.

DeMartini JC, Carlson JO, Leroux C, Spencer T, Palmarini M. (2003) Endogenous retroviruses related to jaagsiekte sheep retrovirus. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 275, 117-137.

Driemeier D, Moojen V, Faccini GS, Oliveira RT (1998). Adenomatose pulmonar ("jaagsiekte") em ovino no Rio Grande de Sul. *Ciênc Rural.*; 28(1):147–50.

Ellis JA, Chavera AEV, DeMartini JC. (1993). Disease conditions in slaughtered sheep from small holder flocks in Peru. *Small Rumin Res.* ;10(3):243–50.

Griffiths D. J., Martineau H. M., and Cousens C. (2010). Pathology and Pathogenesis of Ovine Pulmonary Adenocarcinoma. *J. Comp. Path.*, Vol. 142, 260-283.

Hincapié I. (2012). Perfiles metabólicos. Curso de Graduación de "Buiatría Cuenca, Ecuador.

<http://www.revencyt.ula.ve/storage/repo/ArchivoDocumento/mundopec/v9n1/art04.pdf>.

Hsu P. & Sabatini D. (2008). Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell* 134, Elsevier Inc. DOI 10.1016/j.cell.2008.08.021.

Kramer L. (2020). Generalidades sobre los virus. New York State Department of Health. USA. En: <https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/virus/generalidades-sobre-los-virus>

Moya J. y Pio L. (2015). Parámetros bioquímicos enzimáticos (ALT, AST, ALP, γ-GT, LDH) en niños con leucemia linfoblástica aguda antes del tratamiento antineoplásico. *Horiz Med* 2015; 15 (4): 52-58.

OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). (2018). Manual Terrestre de la OIE.

https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.07.08_Adenocarcinoma_pulmonar_ovino.pdf.

Santana A.M., Gomes da Silva D., Arrigucci P., Pizauro L., Pariz R., de Vasconcellos G. Ormande K., Ávila F. y Jurandir J. (2009). Hemograma e perfil bioquímico sérico de ovinos em idade de abate. *Ciência Animal Brasileira – Suplemento 1 – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria*.

Sharp JM, DeMartini JC. (2003). Natural history of JSRV in sheep. En: Fan H (ed). *Jaagsiekte sheep retrovirus and lung cancer*. New York: Springer. p 55-80.

Summers C., Neill W., Dewar P., Gonzalez L., Van Der Molen R., Norval M. & SHARP J.M. (2002). Systemic immune responses following infection with jaagsiekte sheep retrovirus and in the terminal stages of ovine pulmonary adenocarcinoma. *J. Gen. Virol.*, 83, 1753–1757.

Talenas C, Angel M. Caracterización hispatológica y frecuencia de la adenomatosis pulmonar ovina (APO) en ovinos en el matadero municipal de la Unión – Huánuco. (2017). Univ Nac Hermilio Valdizán. <http://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/1538721>.

Voigt K, Brugmann M, Huber K, Dewar P, Cousens C et al. (2007). PCR examination of bronchoalveolar lavage samples is a useful tool in pre-clinical diagnosis of ovine

pulmonary adenocarcinoma (Jaagsiekte). Research in Veterinary Science, 83, 419e427.

Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. (2001). When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. J Clin Oncol.19(8):2334-2356.

XI. Uso de los resultados y contribuciones del proyecto

La crianza de ovinos en la Región Puno es una actividad económica y social de suma importancia; sin embargo, su crianza va acompañada de enfermedades de diversa etiología, siendo una de ellas el adenocarcinoma pulmonar (APO) que, si bien se conocen la etiología, los signos clínicos, prevalencia, entre otros aspectos, poco o nada se conoce acerca de los cambios metabólicos que ocurren en el animal, como resultado de la enfermedad.

Con los resultados del presente estudio, se conocerá qué cambios metabólicos ocurren en el animal con APO en estado avanzado en relación a aquellos que no lo tienen. A su vez, estos resultados darían una aproximación de los daños o alteraciones que ocurren en los órganos o tejidos del animal afectado, más aún si sabemos que la actividad se desarrolla en el CE Carolina situado a una altitud de 4000 m., donde las condiciones para la vida son muy limitadas en cuanto a oxígeno, sobre todo.

XII. Impactos esperados

i. Impactos en Ciencia y Tecnología

Para la investigación pues los resultados sentarán la base de otros estudios que permitirán ampliar el conocimiento de esta especie que habita en las grandes altitudes. Seguramente, estos animales presentan una serie de particularidades anatómicas y fisiológicas especiales que probablemente tienen que ver con su gran capacidad de adaptación a las condiciones de hipoxia y de escasez de recursos forrajeros de las grandes alturas.

ii. Impactos económicos

La mayor parte de la crianza de ovinos Criollos se encuentra en manos de pequeños productores o familias pobres que habitan el campo de las grandes o medianas altitudes, por lo que juega un rol crucial en la economía de sus propietarios. Por otro lado, son fuente de proteínas de alto valor biológico, que contribuye en la nutrición y alimentación de los niños y pobladores de parajes altoandinos

iii. Impactos sociales

La mayor parte de la crianza de ovinos Criollos se encuentra en manos de pequeños productores o familias pobres que habitan el campo de las grandes o medianas altitudes, por lo que juega un rol crucial en la economía de sus propietarios. Por otro lado, son fuente de proteínas de alto valor biológico, que contribuye en la nutrición y alimentación de los niños y pobladores de parajes altoandinos.

iv. Impactos ambientales

El estudio no tendrá ningún impacto negativo sobre el medio ambiente puesto que seguirá la correcta disposición de residuos sólidos hospitalarios.

XIII. Recursos necesarios

Materiales de campo

- Sogas
- Algodón
- Alcohol y tintura de yodo
- Tijera/Rasuradora
- Jeringas de 5 ml
- Tubos y agujas Vacutainer con EDTA (tapa lila)
- Conservador con gradilla y geles refrigerantes
- Cámara fotográfica y registros

Materiales de laboratorio

- Micropipetas de rango variable de distintas capacidades: 5-10 uL, 20-100 uL y 100-1000 uL
- Pipetas de distintas capacidades
- Tubos de ensayo de 10 mL
- Gradillas
- Papel filtro.

Equipo de laboratorio

- Baño maría
- Espectrofotómetro UV/VIS Modelo T6U, marca PERSEE de procedencia USA
- Vortex
- Refrigeradora
- Cronómetro
- Cámara fotográfica.

Reactivos

- Kits para la determinación de la parámetros bioquímicos y enzimáticos.
- Agua destilada
- Alcohol absoluto

Recursos Humanos

- Ayudante de campo
- Patólogo
- Técnicos laboratoristas

XIV. Localización del proyecto (indicar donde se llevará a cabo el proyecto)

El estudio se realizará en el C.E. Carolina de la UNA-Puno, ubicado en el distrito de Puno, en el kilómetro 8 de carretera vía Puno-Moquegua a una altitud de 4000 m.

El análisis de las muestras se realizará en el Laboratorio de Bioquímica, cito en la Ciudad Universitaria de la ciudad de Puno

XV. Cronograma de actividades

Actividad	Trimestres 2023							
	I	II	III	IV				
Elaboración del proyecto								



Adquisición de materiales y reactivos de laboratorio							
Selección de animales y toma de muestras							
Análisis de muestras							
Procesamiento de datos y análisis							
Redacción del informe final							

XVI. Presupuesto

DETALLE	Unidad de medida	Cantidad	Costo unitario	Costo Total
REACTIVOS				4,700
- Kit para bioquímica y enzimas	Kits	8	400	3200
- Agua destilada	Litros	5	100	500
- Otros	Varios			1000
MATERIALES				800
- Caja térmica + hielo	Unidad	1	100	100
- Tubos y agujas vacutainer	Ciento	1	200	200
- Algodón, desinfectantes y antibióticos	Varios			200
- Material de escritorio e impresión	Varios			200
- Imprevistos				100
SERVICIOS				4,500
- Pasajes y viáticos	Viáticos	10	100	1,000
- Personal de apoyo (laboratoristas)	Jornal	20	100	2,000
- Otros servicios	Servicio	Varios	1000	1,000
- Imprevistos				500
TOTAL			S/.	10,000