



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



**VALORES DE REFERENCIA DE LAS CONCENTRACIONES NORMALES
DE LAS HORMONAS TIROIDEAS: TRIYODOTIRONINA (T₃) Y
TIROXINA (T₄) EN ALPACAS (*Vicugna pacos*) DEL CENTRO
EXPERIMENTAL “LA RAYA” DE LA UNA – PUNO**

TESIS

PRESENTADA POR:

ADELIS PUCHURTINTA IRCO

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

PUNO - PERÚ

2024



Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

VALORES DE REFERENCIA DE LAS CONCENTRACIONES NORMALES DE LAS HORMONAS TIROIDEAS: TRIYODOTIRONINA (T3

AUTOR

ADELIS PUCHURTINTA IRCO

RECuento DE PALABRAS

14432 Words

RECuento DE CARACTERES

74150 Characters

RECuento DE PÁGINAS

93 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

9.0MB

FECHA DE ENTREGA

Jun 25, 2024 10:24 AM EST

FECHA DEL INFORME

Jun 25, 2024 10:26 AM EST

● 10% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 10% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 5% Base de datos de trabajos entregados
- 3% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 20 palabras)



Firmado digitalmente por COILA
ANASCO Pedro Ubaldó FAU
20145496170 hard
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 25.06.2024 10:32:14 -05:00



Firmado digitalmente por COILA
ANASCO Pedro Ubaldó FAU
20145496170 hard
Motivo: Soy Vº Bº
Fecha: 25.06.2024 10:32:44 -05:00

Resumen



DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a mis queridos padres, a mi hermana Kelly, mi hermano Jean Carlos, en especial a mi querida madre Victoria Ircó Quispe por ser mi fuente de inspiración, por su infinito amor e incondicional apoyo. Este trabajo ha sido posible gracias a ellos.



AGRADECIMIENTOS

A la prestigiosa y primera casa de estudios de la región Puno, la Universidad Nacional del Altiplano, por acogerme en su seno para formarme como profesional.

A la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, a sus docentes y administrativos, por todos los conocimientos y servicios brindados en mi estadía.

A los miembros del jurado revisor, infinitos agradecimientos por sus valiosas sugerencias que mejoraron significativamente el presente informe.

A mi director de tesis Dr. Pedro Ubaldo Coila Añasco, siempre recordaré su invaluable guía y las largas jornadas en el laboratorio y también en el trabajo de campo.

A los encargados del laboratorio de Bioquímica y Patología veterinaria, por el apoyo en el proceso de muestreo en el Centro Experimental “La Raya”.



ÍNDICE GENERAL

Pág.

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

ACRÓNIMOS

RESUMEN15

ABSTRACT.....16

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....18

1.1.1. Objetivo general18

1.1.2. Objetivos específicos18

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. MARCO TEÓRICO19



2.1.1. La alpaca	19
2.1.2. Anatomía de la glándula tiroides.....	21
2.1.2.1. Ubicación	21
2.1.3. Fisiología de la tiroides	22
2.1.3.1. Importancia	22
2.1.3.2. Funciones	23
2.1.3.3. Hormonas que secreta	24
2.1.3.3.1.T ₃ (Triyodotironina).....	25
2.1.3.3.2.T ₄ (Tiroxina o tetrayodotironina).....	25
2.1.4. Eje hipotálamo – hipófisis – tiroides.....	26
2.1.5. Factores que modifican los niveles de hormonas tiroideas	29
2.1.6. Métodos de determinación de T ₃ y T ₄	30
2.1.6.1. Inmunoensayo enzimático.....	31
2.1.6.2. Pruebas hormonales concentración de T ₄ libre	31
2.2. ANTECEDENTES	32

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO	36
3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL	36
3.2.1. Animales	36



3.3. METODOLOGÍA	37
3.3.1. Toma de muestras	37
3.3.2. Fase de Laboratorio.....	38
3.3.2.1. Determinación de la concentración de T ₃ (triyodotironina).....	38
3.3.2.2. Determinación de la concentración de T ₄ (tiroxina total)	41
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4. NIVELES DE LA HORMONA TRIYODOTIRONINA (T₃) EN ALPACAS HUACAYA DE DIFERENTE SEXO Y EDAD	46
4.2. NIVELES DE LA HORMONA TIROXINA O TETRAYODOTIRONINA (T₄) EN ALPACAS HUACAYA DE DIFERENTE SEXO Y EDAD.....	54
V. CONCLUSIONES.....	61
VI. RECOMENDACIONES	62
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ANEXOS.....	67

Área: Salud animal.

Tema: Triyodotironina (T₃) y tiroxina (T₄) en alpacas.

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 27 de junio de 2024



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Concentraciones hormonales medianas (mínimas – máximas) en suero de alpacas domésticas.....	32
Tabla 2 Valores de T ₄ L en ovinos (nmol/l)	33
Tabla 3 Valores promedio de Triglicéridos, T ₄ y T ₃ en el tiempo de estudio.....	34
Tabla 4 Niveles de hormonas tiroideas (T ₃ y T ₄) en ovinos, grupo A y grupo B	35
Tabla 5 Hormona tiroidea, triyodotironina (T ₃) y tiroxina (T ₄), concentraciones en ovejas con antecedentes de alopecia difusa y atrofia tiroidea.....	35
Tabla 6 Distribución de alpacas según edad y sexo.....	37
Tabla 7 Estadísticos descriptivos de las concentraciones de triyodotironina (T ₃) expresados en nmol/L en alpacas Huacaya según clase y sexo.....	46
Tabla 8 Estadísticos descriptivos de T ₃ expresados en nmol/L de alpacas Huacaya según clase.....	49
Tabla 9 Estadísticos descriptivos de T ₃ expresados en nmol/L de alpacas Huacaya según sexo.	52
Tabla 10 Estadísticos descriptivos de las concentraciones de tiroxina (T ₄) expresados en nmol/L en alpacas Huacaya según clase y sexo.....	54
Tabla 11 Estadísticos descriptivos de T ₄ expresados en nmol/L de alpacas Huacaya según clase.....	57
Tabla 12 Estadísticos descriptivos de T ₄ expresados en nmol/L de alpacas Huacaya según sexo	59



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Eje hipotálamo – hipófisis – tiroides, simplificado.....	27
Figura 2 Curva de calibración de T ₃	40
Figura 3 Curva de calibración de T ₄	43
Figura 4 Estadístico descriptivo de hormona triyodotironina (T ₃) (nmol/L) en alpacas Huacaya según edad.....	51
Figura 5 Estadístico descriptivo de hormona triyodotironina (T ₃) (nmol/L) en alpacas Huacaya según sexo.....	53
Figura 6 Estadístico descriptivo de hormona tiroxina (T ₄) (nmol/L) en alpacas Huacaya según edad.....	58
Figura 7 Estadístico descriptivo de hormona tiroxina (T ₄) (nmol/L) en alpacas Huacaya según sexo.....	60



ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1: Análisis de la varianza para niveles de hormona triyodotironina (T3) (nmol/L) en alpacas Huacaya de diferente sexo y edad.	67
ANEXO 2: Prueba de rango múltiple de Tukey para niveles de hormona triyodotironina (T3) (nmol/L) en alpacas Huacaya de diferente edad.	67
ANEXO 3: Prueba de rango múltiple de Tukey para niveles de hormona triyodotironina (T3) (nmol/L) en alpacas Huacaya de diferente sexo.	67
ANEXO 4: Análisis de la varianza para niveles de hormona tetrayodotironina (T4) (nmol/L) en alpacas Huacaya de diferente sexo y edad.....	68
ANEXO 5: Prueba de rango múltiple de Tukey para niveles de hormona tetrayodotironina (T4) (nmol/L) en alpacas Huacaya de diferente edad.	68
ANEXO 6: Prueba de rango múltiple de Tukey para niveles de hormona tetrayodotironina (T4) (nmol/L) en alpacas Huacaya de diferente sexo.	68
ANEXO 7: Identificación de predio (alpacas hembra) y personal de apoyo para la recolección de muestras sanguíneas.....	69
ANEXO 8: Colecta de muestra sanguínea método venopunción por la vena yugular en tuis hembras.	70
ANEXO 9: Colecta de muestra sanguínea método venopunción por la vena yugular en tuis machos	71
ANEXO 10: Colecta de muestra sanguínea método venopunción por la vena yugular en hembras adultas.....	71



ANEXO 11: Colecta de muestra sanguínea método venopunción por la vena yugular de crías hembras y machos.	72
ANEXO 12: Colecta de muestra sanguínea método venopunción por la vena yugular de machos adultos.....	72
ANEXO 13: Muestras sanguíneas en tubos vacutaener rotulados en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.....	73
ANEXO 14: Centrifugación de muestras sanguíneas para posteriormente llevarlas a congelación.	73
ANEXO 15: Sistemas de prueba AccuBind ® USA de T3 (código 125-300) y T4 (código 225-300).....	74
ANEXO 16: Procedimiento de prueba de T3 en el laboratorio de Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, pipeteo de 0.005 ml de suero de referencia control dentro del pozo designado en la microplaca.	74
ANEXO 17: Procedimiento de prueba de T3, adición de sustrato de trabajo a todos los pozos de la microplaca.....	75
ANEXO 18: Microplaca de T3, luego de adicionar la solución de parada en cada pozo lista para la lectura de absorbancia.	75
ANEXO 19: Lectura de las absorbancias de la microplaca de T3 en ELISA.....	76
ANEXO 20: Procedimiento de prueba de T4 en el laboratorio de Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, pipeteo de 0.005 ml de suero de referencia control dentro del pozo designado en la microplaca.	77
ANEXO 21: Procedimiento de prueba T4, adición de sustrato de 350 µl de buffer de lavado, se repitió dos veces adicionales, haciendo un total de tres lavados.	78



ANEXO 22: Microplaca de T4, luego de adicionar la solución de parada en cada pozo lista para la lectura de absorbancia.	78
ANEXO 23: Lectura de las absorbancias de la microplaca de T4 en ELISA.....	79
ANEXO 24: Determinación de los parámetros de T3 expresados en nmol/L, tabla de análisis de varianza.	79
ANEXO 25: Tabla de Análisis de Varianza (SC tipo III) de T3	80
ANEXO 26: Test: Tukey determinación de T3 en función a edad (Alfa=0,05, DMS=0,13990, error: 0,0338 y gl:56)	81
ANEXO 27: Test: Tukey determinación de T3 en función a sexo (alfa=0,05, DMS: 0,09505, error: 0,0338 y gl:56).....	81
ANEXO 28: Supuestos de normalidad de T3, Shapiro – Wilks (modificado)	82
ANEXO 29: Análisis de varianza: homogeneidad de varianza (Prueba de Levene) para T3	82
ANEXO 30: Cuadro de Análisis de Varianza (SC tipo III) para T3.....	83
ANEXO 31: Estadísticos descriptivos de T3, medidas resumen en función a la edad	83
ANEXO 32: Estadísticos descriptivos de T3, medidas resumen en función al sexo	83
ANEXO 33: Estadísticos descriptivos de T3, medidas resumen en función a la edad con los valores mínimos y máximos.	84
ANEXO 34: Determinación de los parámetros de T4 expresados en nmol/l, análisis de varianza	84
ANEXO 35: Cuadro de Análisis de Varianza (SC tipo III) de T4.....	84
ANEXO 36: Test: Tukey determinación de T4 en función a edad (alfa=0,05, DMS: 10,23639, error: 180,7749 y gl:56)	84



ANEXO 37: Test: Tukey determinación de T4 en función a sexo (alfa=0,05, DMS: 6,95435, error: 180,7749 y gl:56)	85
ANEXO 38: Supuestos de normalidad de T4, Shapiro – Wilks (modificado)	86
ANEXO 39: Análisis de varianza: homogeneidad de varianza (Prueba de Levene) para T4	86
ANEXO 40: Cuadro de Análisis de Varianza (SC tipo III) para T4.....	86
ANEXO 41: Estadísticos descriptivos de T4, medidas resumen en función a la edad	87
ANEXO 42: Estadísticos descriptivos de T4, medidas resumen en función al sexo	87
ANEXO 43 Estadísticos descriptivos de T4, medidas resumen en función a la edad con los valores mínimos y máximos.	87
ANEXO 44 Protocolo del sistema de prueba para T3.....	88
ANEXO 45 Protocolo del sistema de prueba para T4.....	90
ANEXO 46 Declaración jurada de autenticidad de tesis	92
ANEXO 47 Autorización para el depósito de tesis en Repositorio Institucional	93



ACRÓNIMOS

CHO:	Colesterol
CSA:	Camélidos sudamericanos.
DS:	Desviación estándar
DIT:	Diyodotirosina
EDTA:	Acido Etilen Diamino Tetracético
ELISA:	Enzime Linked Immunosorbent Assay
HPT:	Hipotálamo- hipofisiario-tiroideo
HT:	Hormonas tiroideas
INEI:	Instituto Nacional de Estadística e Informática
MIT:	Monoyodotirosina
T₃:	Triyodotironina
T₄:	Tetrayodotironina
T₄L:	T ₄ libre
TBA:	Albúmina fijadora de tiroxina
TBG:	Globulina fijadora de tiroxina
TBPA:	Prealbúmina fijadora de tiroxina
Tg:	Tiroglobulina
TRH:	Factor liberador de tirotropina
TSH:	Hormona estimulante de la tiroides
TT:	Transtirretina
TT₃:	Triyodotironina total
TT₄:	Tiroxina total



RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue establecer los valores de referencia de las hormonas tiroxina (T_4) y triyodotironina (T_3) en alpacas Huacaya del Centro Experimental La Raya, considerando las variables sexo y clase animal. Para el estudio se colectaron 60 muestras de sangre de alpacas clínicamente sanas de ambos sexos (machos y hembras) y grupos etarios (crías, tuis y adultos). La cuantificación de los valores de T_3 y T_4 se realizaron en el Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAPuno utilizando la técnica de ELISA con reactivos de AccuBind® USA; y, los datos obtenidos se analizaron en un Diseño de Bloques Completo al Azar (DBCA) previo análisis de los supuestos básicos de normalidad (prueba de Shapiro Wilks) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Para este análisis se utilizó el programa InfoStat v. 2020e. Los resultados obtenidos indican tanto en T_3 y T_4 no existe efecto del sexo animal ($p > 0.05$) pero si existe efecto altamente significativo de la clase animal ($p \leq 0.01$). Las medias obtenidas para T_3 (nmol/L) fueron: 1.23 en crías, 1,62 en tuis y 0.42 en adultos; y para T_4 (nmol/L): 124.11 en crías, 97.53 para tuis y 110.88 para adultos. Se concluye que los niveles hormonales de T_3 y T_4 en alpacas no es influenciado por el sexo animal, pero sí por la edad, siendo mayor en animales crías, disminuyendo conforme aumenta la edad del animal.

Palabras clave: Alpaca, Edad, ELISA, Sexo, T_3 , T_4



ABSTRACT

The objective of the present study was to establish the reference values of the hormones thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) in Huacaya alpacas from the La Raya Experimental Center, considering the variables sex and animal class. For the study, 60 blood samples were collected from clinically healthy alpacas of both sexes (males and females) and age groups (kids, tuis and adults). The quantification of T3 and T4 values were carried out in the Pathology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of UNA-Puno using the ELISA technique with AccuBind ® USA reagents; and, the data obtained were analyzed in a Randomized Complete Block Design (DBCA) after analysis of the basic assumptions of normality (Shapiro Wilks test) and homogeneity of variances (Levene test). For this analysis, the InfoStat v program was used. 2020e. The results obtained indicate both in T3 and T4 there is no effect of animal sex ($p>0.05$) but there is a highly significant effect of animal class ($p\leq 0.01$). The means obtained for T3 (nmol/L) were: 1.23 in hatchlings, 1.62 in tuis and 0.42 in adults; and for T4 (nmol/L): 124.11 in hatchlings, 97.53 for tuis and 110.88 for adults. It is concluded that the hormonal levels of T3 and T4 in alpacas are not influenced by animal sex, but by age, being higher in young animals, decreasing as the age of the animal increases.

Keywords: Alpaca, Age, ELISA, Sex, T₃, T₄



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La crianza de las alpacas se está expandiendo a nivel global, con una población de 3,685 millones, lo que representa un incremento del 50.2% en comparación al censo agropecuario que se realizó en 1994. La raza Huacaya domina con el 80.4% de la distribución total, seguida por la raza Suri con un 12.2% y cruzados con un 7.3%. En la sierra, la proporción de alpacas de la raza Huacaya es mayor, alcanzando el 78.9% (INEI, 2012).

Las hormonas tiroideas participan en diversos procesos biológicos como el metabolismo, desarrollo, crecimiento, respiración, reproducción, metamorfosis, comportamiento migratorio, actividad del sistema nervioso central, así como en la adaptación y maduración neuronal, entre otros (Calixto, 2019). El correcto funcionamiento de las vías metabólicas depende de las HT, las cuales tienen efectos específicos sobre diferentes órganos, manteniendo así la homeostasis entre los tejidos (Osorio & Correa, 2013).

Establecer los valores de referencias de las hormonas T_4 y T_3 es crucial no sólo para comprender la respuesta del animal a las presiones ambientales de selección sino también para proporcionar datos que actualmente son desconocidos en la fisiología endocrina de las alpacas. Por ello, conocer los parámetros de referencia de estas hormonas en alpacas de la Región Puno, es muy importante, considerando que el hábitat de las alpacas sobrepasa los 4000 m de altitud, ambiente caracterizado por una hipoxia, frío extremo y pobre calidad nutritiva de los pastos.



Las TH han sido relativamente poco estudiadas en mamíferos, específicamente en alpacas, ya que la mayoría de las investigaciones se enfocan en patologías de la glándula tiroides y en la medición de concentraciones de las hormonas tiroideas en diversas especies, con mayor énfasis en perros y gatos. En Perú, son pocos los estudios sobre la anatomía y fisiología referidas a la glándula tiroides en alpacas. En este contexto, el presente estudio se realizó con el propósito de profundizar la función tiroidea de la alpaca mediante la cuantificación de los niveles de la T_3 y T_4 y así establecer los valores de referencia que permitan identificar posibles problemas hormonales que puedan afectar el desarrollo productivo de las alpacas.

1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.1. Objetivo general

Evaluar los valores de referencia de las concentraciones normales de las hormonas tiroideas triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4) en alpacas (*Vicugna pacos*) del Centro Experimental “La Raya” de la UNA- PUNO.

1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar los niveles de la hormona triyodotironina (T_3) en alpacas Huacaya según sexo y edad.
- Determinar los niveles de la hormona tiroxina o tetrayodotironina (T_4) en alpacas Huacaya según sexo y edad.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. MARCO TEÓRICO

2.1.1. La alpaca

América del Sur y Central es una de las regiones más importantes para la domesticación, siendo el origen de las plantas cultivadas y animales domesticados esenciales, entre estos se encuentra el pavo, el conejillo de indias y los principales herbívoros domésticos de la zona, la llama y la alpaca (Zeder, 2006). A pesar de la significativa importancia económica de la llama y alpaca en la región y su creciente cría a nivel mundial, los orígenes y evolución siguen siendo poco conocidos. Sin embargo, los genomas de referencia de los camélidos sudamericanos, tanto domésticos como silvestres, apoyan convincentemente la hipótesis de que la alpaca fue domesticada partir de la vicuña y la llama a partir del guanaco (Fan et al., 2020).

La alpaca, nativa de los Andes peruanos, se encuentra principalmente en la región sur y central de Perú, donde se estima que reside el 95% de la población de cuatro millones de alpacas en Sudamérica. Las alpacas se reproducen y crían adecuadamente en condiciones donde la temperatura oscila entre 20 °C a 30 °C en un mismo día, y a altitudes que van desde los 3,000 hasta más de 4,500 metros sobre el nivel del mar (Montalvo, 2020).

La alpaca es una especie ganadera con grandes potencialidades productivas y comerciales, su crianza genera un menor impacto ambiental y una huella de carbono



reducida, gracias a las características morfológicas, nutricionales, fisiológicas, etológicas y hábitos de consumo. Estos atributos contribuyen a la conservación del ecosistema en el que habitan, es posible que las alpacas sean animales ideales para una ganadería sostenible (MINAGRI, 2019).

Las alpacas son animales desarrollados para la producción de fibra blanca y fina, a través de un trabajo de selección intensiva, han logrado alcanzar los estándares fenotípicos, fisiológicos y zootécnicos requeridos para la raza Suri y Huacaya. Por lo tanto, es necesario reconocer su lugar en la escala evolutiva de estandarización de razas y animales domésticos (Bustinza et al., 2021).

Son utilizados como mascotas y en el sector de turismo como medio de transporte y creación de artesanías, gracias a su gran fortaleza también se utilizan en la labranza agrícola de las áreas altoandinas. Estos productos son obtenidos principalmente de especies domésticas como la llama y la alpaca (Esquivel et al., 2018).

Los camélidos sudamericanos son mamíferos herbívoros que principalmente habitan en países como Perú, Bolivia, Chile, Argentina y Ecuador, constituyen una importante fuente de ingresos económicos para el sector pecuario de las poblaciones andinas de Sudamérica, ya que proporcionan diversos productos como fibra, carne, piel y cuero. (Esquivel et al., 2018).

La alpaca es una especie con notables cualidades, tiene la capacidad de adaptarse a casi todos los climas del mundo, produce una de las fibras de origen animal más finas y lujosas del mundo, y su carne tiene un alto valor nutritivo con bajo



contenido de grasa. Además, su piel tiene características ideales para la industria del cuero, la crianza de alpacas deja una huella ambiental mínima y son dóciles, curiosos e inteligentes, lo que los hace fáciles de entrenar siendo ideales para las actividades de recreación (Contreras, 2019).

2.1.2. Anatomía de la glándula tiroides

2.1.2.1. Ubicación

Desde un punto de vista anatómico, la glándula tiroides es uno de los órganos endocrinos de mayor tamaño, con un peso promedio de 20 g, está situada en la parte anterior e inferior del cuello, rodeando la tráquea tanto por delante y laterales a la tráquea. Su forma se asemeja a la de una mariposa, con un lóbulo derecho que es un poco más grande, y un lóbulo izquierdo conectados entre sí por un istmo (Jácome et al., 2022).

La posición de la glándula tiroides puede variar entre las diferentes especies domésticas, aunque generalmente se encuentra en la parte ventral de la tráquea y caudal a la laringe, está compuesta por dos lóbulos situados a ambos lados de la tráquea, los cuales están conectados por un estrecho fragmento llamado istmo. Algunas especies pueden presentar variaciones en la presencia o el grosor del istmo; por ejemplo, en pequeños rumiantes puede ser poco perceptible, mientras que en equinos puede ser delgado y en bovinos particularmente ancho. En cerdos, entre los dos lóbulos laterales existe un lóbulo adicional conocido como piramidal. Las hormonas producidas en la



glándula tiroides son factores indispensables para la regulación metabólica (Diessler et al., 2022).

Anatómicamente, la glándula tiroides está estructurada por folículos compuestos de células epiteliales secretoras, cuya función es absorber el yodo circulante en la sangre, que luego a través de enzimas es sometido a un proceso de oxidación, para obtener T₃ y T₄. Una de las enzimas es la peroxidasa que se suma al peróxido de hidrógeno (Chávez et al., 2019).

2.1.3. Fisiología de la tiroides

2.1.3.1. Importancia

Las hormonas tiroideas (TH) desempeñan un papel fundamental crucial en la regulación de la actividad metabólica a lo largo de todas las etapas de la vida. Su interacción con otros sistemas hormonales permite a las HT ajustar los cambios metabólicos y también modificar el crecimiento y el mantenimiento, respondiendo a las condiciones del entorno (Behringer et al., 2018).

Las HT, desempeñan un papel importante en la regulación de la función cardíaca, inicialmente se creía que su mecanismo de acción clásico de acción principal era genómico; sin embargo, investigaciones más recientes han ampliado los conocimientos sobre cómo estas hormonas regulan la fisiología y patología del corazón, incluyendo tanto mecanismos genómicos como no genómicas de las TH y sus metabolitos (THM) (Rutigliano & Zucchi, 2017).



Las TH son hormonas antiguas y tienen un impacto no solo en el desarrollo, crecimiento y metabolismo de los vertebrados, sino también en el metabolismo de algunas bacterias. Estas hormonas son sintetizadas en la glándula tiroides, aunque en peces, debido a la ausencia de una glándula tiroides claramente definida, son sintetizadas por las células foliculares (Rabah et al., 2019).

2.1.3.2. Funciones

Las hormonas tiroideas incrementan el uso de oxígeno y contribuyen a la termogénesis, aumentando así el metabolismo basal, la producción de calor y la captación máxima de oxígeno. Además, promueven la absorción de glucosa y galactosa, favoreciendo la movilización de grasa y de carbohidratos, aumenta la disponibilidad de sustratos metabólicos, activando de manera general el metabolismo (Jácome et al., 2022).

La hormona tiroidea promueve en mamíferos la síntesis de la hormona del crecimiento y posiblemente la producción hepática de IGF-1 con estas dos hormonas que actúa sinérgicamente en el aumento de receptores periféricos. Es evidente que las hormonas tiroideas son indispensables para el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso, facilitando la maduración de los axones, la formación de mielina y el crecimiento de las dendritas (Jácome et al., 2022)

Las hormonas tiroideas desempeñan un papel permisivo en la maduración sexual y la reproducción en mamíferos, mientras que en animales



inferiores interviene en la descamación y en el cambio de plumaje (Jácome et al., 2022)

La hormona tiroidea afecta al sistema cardiovascular aumentando el gasto y la frecuencia cardiaca, mejorando la contractibilidad sistólica y la relajación diastólica. También promueve la vasodilatación y la hiperemia, todo esto aumenta el flujo plasmático renal (Jácome et al., 2022).

A medida que la lactancia progresa, la producción de leche y la concentración de triyodotironina disminuye, mientras que la concentración de tiroxina aumenta. Los cambios en las concentraciones de hormonas tiroideas de T₃ y T₄ afectan la producción de leche en las ovejas durante la lactancia especialmente en las ovejas que tienen ciclos reproductivos estacionales (Flis & Molik, 2021)

2.1.3.3. Hormonas que secreta

En mamíferos, las hormonas tiroideas (HT) está representada por dos moléculas, la T₄ que en realidad actúa como una prohormona y la triyodotironina (T₃), cuya principal fuente es la metabolización periférica de la T₄, aunque también es secretada directamente por la glándula tiroides. Las TH regulan el crecimiento, desarrollo y la maduración del cerebro, además de intervenir en el metabolismo celular y en la producción de calor o termogénesis (Jácome et al., 2022)



2.1.3.3.1. T₃ (Triyodotironina)

La T₃ es mucho más activa que la T₄ y puede generarse a partir de T₄ en órganos como el hígado, el corazón y los riñones, mediante la eliminación de un átomo de yodo por enzimas desyodasas, en las células diana la T₃ atraviesa la membrana plasmática y se une al receptor nuclear de T₃, esta unión activa la transcripción de ciertos genes (Diessler et al., 2022). Entre el 60 y el 80% de la T₃ circulante proviene de la desyodación enzimática de la T₄ en las células, mientras que la glándula tiroides produce solo una pequeña cantidad de T₃. Su interés clínico es limitado debido a su localización intracelular y la mínima cantidad de T₃ segregada por la glándula tiroides. La T₃ también estimula la producción de la globulina fijadora de los esteroides sexuales o SHBG en el hígado (Jácome et al., 2022)

La triyodotironina induce a la expresión de yodotironina desyodasa en la grasa parda, el hígado y los riñones. Además, la T₃ provoca un aumento en la expresión de proteínas desacopladoras, la fosforilación oxidativa desacopladora y un aumento de la producción de calor (Tsibulnikov et al., 2020).

2.1.3.3.2. T₄ (Tiroxina o tetrayodotironina)

Sólo es producida por las células foliculares tiroideas (Diessler et al., 2022), aproximadamente el 95% de la T₄ que llega a las células diana se convierte en T₃ (Chávez et al., 2019). La tiroxina es la principal hormona circulante en la sangre y es completamente sintetizada por la glándula tiroides,



lo que significa que proporciona una información directa sobre el funcionamiento de esta glándula.

La adaptación al frío induce la desyodación de la tiroxina (T_4), lo que resulta en un aumento de los niveles de triyodotironina (T_3) en la sangre tanto en humanos como en animales (Tsibulnikov et al., 2020).

Mecanismo de regulación y liberación de la T_3 y T_4

2.1.4. Eje hipotálamo – hipófisis – tiroides

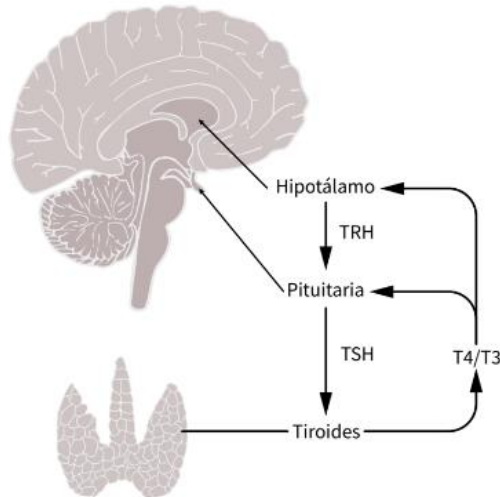
La secreción de la Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH) está principalmente regulada por la retroalimentación negativa de las hormonas tiroideas (T_4 y T_3). Este efecto de retroalimentación negativa de las HT ya sea en forma libre o unida, es el principal mecanismo que regula la secreción de TSH; sin embargo, la estimulación continua de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) tiene un papel permisivo en la secreción de TSH (Ferguson, 2007).

Existen dos factores que regulan la función y el tamaño de la glándula tiroides: positivamente, la TSH (Hormona Estimulante de la Tiroides) y negativamente, el contenido de yodo. La TSH es una glicoproteína compuesta por dos subunidades (alfa y beta) y los mismos genes que producen las subunidades beta que son los encargados de producir los receptores de TSH (Jácome et al., 2022)

Cuando los niveles de T_3 y T_4 son elevados, el hipotálamo es estimulado y suprime la liberación del factor liberador de tirotropina, lo que reduce la secreción de tirotropina a nivel de la hipófisis anterior (Chávez et al., 2019).

Figura 1

Eje hipotálamo – hipófisis – tiroides, simplificado



Nota: El control endocrino de la glándula tiroidea se lleva a cabo a través del eje hipotálamo-hipófisis-tiroidea.

La hormona liberadora de tirotrópica (TRH) se produce en el núcleo supraóptico del hipotálamo y está regulado por un mecanismo de retroalimentación negativo. Su producción disminuye cuando aumentan los niveles de T₄ libre, que es transformada en T₃ en la hipófisis o el hipotálamo mediante la acción de una enzima llamada 5' monodeyodinasas (DT) tipo II, que es específica de estos tejidos (Jácome et al., 2022).

El primer mecanismo resulta importante; sin embargo, un incremento de la TRH estimula la producción tanto de FSH como de prolactina, la sensibilidad del tirocito disminuye cuando la TSH aumenta, lo cual atribuye a una menor expresión del gen receptor de TSH. Cuando el receptor se activa por la TSH, desencadena una cascada de AMPc, y los receptores de TSH localizados en la membrana basolateral de las células foliculares tiroideas, al activarse, promueven la tiroxinogénesis al



estimular la síntesis del transportador yodo/sodio (symporter), la peroxidasa tiroidea y la tiroglobulina (Tg). Además, aumentan la endocitosis epitelial tiroidea por la TSH y favorecen la liberación de hormona tiroidea en la circulación (Jácome et al., 2022)

La tiroglobulina contiene aproximadamente 120 residuos de tirosina y se sintetiza en el RER y el complejo de Golgi, luego es incorporada en vesículas y se secretada por exocitosis hacia la luz del folículo. Los átomos de yoduro presentes en la sangre de los capilares interfoliculares difunden a través de los vasos sanguíneos, siendo transportados por las células foliculares al citoplasma mediante proteínas simportadoras de yodo/yoduros dependientes de la ATPasa (Adenosin trifosfatasa). La concentración intracelular de yodo puede ser 30 a 40 veces mayor que la concentración sanguínea, posteriormente los iones de yoduro se difunden hacia el dominio apical de la membrana plasmática y se transportan hacia la luz del folículo, en el coloide el yoduro se oxida a yodo por peróxido de hidrogeno en una reacción catalizada por la peroxidasa tiroidea (TPO)(Diessler et al., 2022).

En las microvellosidades de las células foliculares, la peroxidasa tiroidea facilita la adición de uno o dos átomos de yodo al aminoácido tirosina presentes en la tiroglobulina, lo cual da lugar a la formación de yodotirosinas. La formación de T_3 y T_4 ocurre mediante la unión de yodotirosinas: la unión de un residuo de diyodotironina y un residuo de monoyodotirosina forma T_3 , mientras que la unión de dos residuos de diyodotironina forma T_4 . Estas moléculas que aún están ligadas a una molécula de Tg se almacenan en el coloide de la luz del folículo (Diessler et al., 2022).



2.1.5. Factores que modifican los niveles de hormonas tiroideas

Existen diversos factores que pueden alterar la secreción normal de las hormonas tiroideas, lo cual puede resultar en disminuciones en los índices de productividad y conllevar a la muerte del animal. En aves, la liberación de hormonas tiroideas puede ser influenciada por factores como la temperatura, el periodo de incubación, la dieta, el ayuno, la producción, los fotoperiodos y el estrés (Osorio et al., 2011).

La secreción de hormonas tiroideas no presenta variaciones circadianas en los animales, las concentraciones hormonales en rumiantes no se ven influenciadas por el momento del día en que se tomen las muestras (Matamoros et al., 2003).

En bovinos jóvenes, existen diferencias entre sexo y edad, las hembras tienen concentraciones hormonales más altas, mientras que, en adultos, los machos presentan valores superiores (Osorio & Vinasco, 2016).

Varios medicamentos reducen las concentraciones de T_4 y T_3 en los animales (Scott- Moncrieff, 2012), entre los más conocidos los glucocorticoides, las sulfanomidias, los anticonvulsivos, la furosemida, la fenilbutazona, la clorpromazina, los salicilatos y compuestos antitiroideos como el propiltiouracilo y el metimazol (Matamoros et al., 2003).

La deficiencia de selenio en los forrajes provoca una disminución de los niveles de T_3 , ya que el selenio es un componente esencial de la desyodasa tipo I, que es fundamental para la producción de T_3 a nivel periférico (Contreras et al., 2002).



En las zonas de mayor altitud, los niveles de yodo orgánico son inferiores en comparación con las zonas más cercanas al mar, donde el contenido de yodo en el suelo puede ser más alto. El yodo es utilizado fundamentalmente por el organismo para la formación de hormonas tiroideas, y su ingesta en niveles inadecuados puede resultar en una estimulación excesiva de la hipófisis para aumentar la producción de hormonas (Padrón et al., 2000).

El balance energético: la regulación de las hormonas tiroideas es un mecanismo de defensa del organismo frente a situaciones de balance de energía negativo y la gravedad del déficit está relacionada con la magnitud de la disminución de T_4 (Matamoros et al., 2003).

El estrés desempeña un papel crucial, ya que durante situaciones prolongadas de estrés las concentraciones básicas de las hormonas tiroideas disminuyen, lo cual constituye un mecanismo de protección del organismo similar al observado en situaciones de balance de energía negativo (Matamoros et al., 2003). Las enfermedades sistémicas crónicas o agudas, como las enfermedades renales, hepáticas, infecciosas, entre otras, provocan una disminución en las concentraciones basales de T_4 y T_3 .

2.1.6. Métodos de determinación de T_3 y T_4

La medición de hormonas como T_3 , T_4 y TSH se considera esencial en los diagnósticos in vitro para evaluar la función tiroidea. Este enfoque ha impulsado avances significativos en las técnicas de ensayo en las últimas tres décadas,



destacándose los métodos sofisticados como radioinmunoensayos y, más recientemente, usando técnicas como EIA, ELISA, FIA y quimioluminiscencia.

2.1.6.1. Inmunoensayo enzimático

En este método del kit AccuBind® USA, la muestra del paciente se añade al pozo de una microplaca junto con el suero de referencia. Luego, se agrega el conjugado de la enzima-T₄ y se mezclan los reactivos, se produce una reacción competitiva entre el conjugado de la enzima y la tiroxina libre por un número limitado de sitios de unión para los anticuerpos inmovilizados en el pozo. Después de completar el periodo de incubación requerido, el conjugado enzima-anticuerpo de tiroxina se separa del conjugado no unido enzima-tiroxina mediante decantación, la actividad enzimática presente en la superficie del pozo se cuantifica mediante una reacción con un sustrato adecuado que produce un cambio de color.

2.1.6.2. Pruebas hormonales concentración de T₄ libre

La prueba de tiroxina es una prueba de sangre que ayuda a diagnosticar enfermedades en la tiroides, la tiroxina también conocida como T₄, es un tipo de hormona tiroidea, una prueba de T₄ mide los niveles de T₄ en la sangre. Para medir la fT₄ es la diálisis de equilibrio. Un exceso o una cantidad insuficiente de T₄ puede ser un signo de enfermedad de la tiroides (Nuñez et al., 2010).

2.2. ANTECEDENTES

Durante un estudio llevado a cabo en Estados Unidos, específicamente en las granjas de Tennessee, se proporcionaron valores de hormonas esteroides y tiroideas en alpacas, para ello se extrajo sangre de alpacas macho sanas (35 intactas y 2 castradas) y hembras (48 no preñadas y 3 preñadas) y no hubo diferencias significativas en las concentraciones medianas de progesterona, estradiol, tiroxina (T₄) y triyodotironina (T₃) entre alpacas macho intactos y hembras no preñadas (Tabla 1). Esta información proporciona concentraciones de hormonas suprarrenales, gonadales y tiroideas en alpacas para ayudar con el diagnóstico de trastornos endocrinos (Fecteau et al., 2023).

Tabla 1

Concentraciones hormonales medianas (mínimas – máximas) en suero de alpacas.

Hormona	Estado fisiológico					
	Todo (n=88)	MI (n=30)	MPP (n=5)	MC (n=2)	FNP (n=48)	FP (n=3)
Cortisol (µg/dL)	1,0 (<1,0–2,9)	1,0 (<1,0–2,9)	<1,0 (<1,0–1,2)	<1,0 (<1,0)	<1,0 (<1,0–1,5)	<1,0 (<1,0)
Progesterona (ng/ml)	<0,2 (<0,2–4,1)	<0,2 (<0,2–0,4)	<0,2 (<0,2)	<0,2 (<0,2)	<0,2 (<0,2–2,0)	2,2 (1,5–4,1)
Estradiol (pg/ml)	<10,0 (<10,0–137,7)	<10,0 (<10,0–36,8)	<10,0 (<10,0–36,4)	<10,0 (<10,0)	<10,0 (<10,0–137,7)	11,8 (<10,0–17,3)
Testosterona (ng/dL)	<15,0 (<15,0–403,0)	141,5 (22,0–403,0)	19,4 (<15,0–39,2)	<15,0 (<15,0)	<15,0 (<15,0–15,2)	<15,0 (<15,0)
Androstenediona (ng/ml)	0,3 (0,1–2,1)	0,8 (0,2–2,1)	0,4 (0,1–0,5)	0,1 (0,1)	0,1 (0,1–1,0)	0,1 (0,1–0,5)
17-hidroxiprogesterona (ng/ml)	0,1 (<0,1–3,4)	0,2 (<0,1–1,9)	0,1 (<0,1–3,4)	<0,1 (<0,1)	<0,1 (<0,1–1,0)	0,1 (0,1–0,2)
T ₄ (nmol/L)	87,5 (50,2–166,1)	86,2 (55,4–166,1)	86,2 (59,2–151,9)	95,3 (82,4–108,1)	91,4 (50,2–132,6)	78,5 (55,4–87,5)
T ₃ (nmol/L)	2,41 (0,7–6,2)	2,4 (0,7–6,2)	1,9 (1,7–2,8)	3,2 (2,9–3,6)	2,6 (1,1–5,8)	2,6(1,4–2,7)

Nota: n (número de animales), MI (macho intacto), MPP (macho prepuberal), MC (macho castrado), FNP (hembra no gestante) y FP (hembra gestante)

En un estudio realizado en Bogotá (Colombia), se establecieron valores de referencia en las concentraciones de la TSH y T₄ libre para ovejas menores de 7 meses, analizando la

influencia del sexo en los valores obtenidos de ambas hormonas. Se obtuvieron muestras de sangre de 48 ovinos en estado de ayuno (25 machos y 23 hembras menores de 7 meses de edad), las concentraciones de TSH y T₄ libre se determinaron mediante inmunoensayo enzimático. Los valores de T₄ libre expresados en nmol/L de ovinos machos menores de 7 meses es 0.66 y de hembras menores de 7 meses es 0.44 (Tabla 2). Se concluyó que el sexo causa una variación en la secreción de T₄ libre en ovinos jóvenes (Osorio et al., 2016).

Tabla 2

Valores de T₄L en ovinos (nmol/L)

	Machos	Hembras
Promedio	8,5	5,7
Mínimo	3,9	1,7
Máximo	15,1	9,4
DS	3,1	2,7

Nota: Valores mín., máx, DS y promedio de T₄ libre

Se llevó a cabo un estudio en Colombia, en la granja experimental Tunguavita de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), se seleccionaron 32 vacas de la raza Holstein, se dividió aleatoriamente en 4 tratamientos: G1, 8 vacas con suplemento de trébol rojo según sus requerimientos, G2: 8 vacas con suplemento de trébol rojo 25% adicional, G3: 8 vacas con suplemento de trébol rojo 50% adicional y G4: 8 vacas sin ningún suplemento durante 60 días. Antes de la suplementación se midieron variables como estradiol, progesterona, LH, T₃, T₄, TSH y BUN. Los niveles de T₃ expresados en nmol/L fueron a los 60 días 1.30 ± 0.07 , 1.29 ± 0.08 , 1.33 ± 0.06 y 1.36 ± 0.05 respectivamente, los niveles de T₄ expresados en nmol/L a los 60 días fue de 97.75 ± 3.26 , 98.25 ± 4.47 , 98.75 ± 3.92 y 85.25 ± 2.42 , respectivamente (Tabla 3). En conclusión, la T₃ y T₄ mostraron un

comportamiento similar durante los 0, 30 y 60 días en los respectivos grupos (Tabla 3) (Rodriguez et al., 2020).

Tabla 3

Valores promedio T_4 y T_3 en el tiempo de estudio.

T_4 (nmol/L)				
0 días	88,75±8,31 c	89,25±8,51 c	89,75±8,37 c	68,63±10,68 c
30 días	89,75±6,76 c	90,25±5,36 c	90,75±5,89 c	88,63±8,36 c
60 días	97,75±3,26 c	98,25±4,47 c	98,75±3,92 c	85,25±2,42 c
T_3 (nmol/L)				
0 días	1,30±0,10 c	1,31±0,12 c	1,30±0,09 c	1,30±0,09 c
30 días	1,14±0,09 c	1,05±0,08 c	1,31±0,09 c	1,36±0,09 c
60 días	1,30±0,07 c	1,29±0,08 c	1,33±0,06 c	1,36±0,05 c

Nota: Grupo 1 (8 vacas con suplemento de trébol rojo), Grupo 2 (8 vacas con suplemento de trébol rojo 25% adicional), Grupo 3 (8 vacas con suplemento de trébol rojo 50% adicional), Grupo 4 (8 vacas sin ningún suplemento)

Con el propósito de determinar la correlación entre los niveles de hormonas tiroideas (T_3 y T_4) y los niveles de zinc y cobre en 100 ovejas de dos granjas diferentes (50 ovejas/ cada una), se realizó un estudio en Egipto. Cada grupo de ellas se subdividió en 5 subgrupos (10 animales/ cada uno). Se recolectaron muestras de sangre para estimar las concentraciones de T_3 , T_4 , Zn y Cu. Los resultados (Tabla 4) mostraron que los niveles de T_3 y T_4 fueron significativamente mayores ($p < 0,01$) en los corderos que en otras ovejas en ambos grupos (A y B) y se encontró una fuerte correlación lineal negativa con los niveles de T_3 y T_4 en las ovejas preñadas del grupo A y los machos del grupo B, y en los niveles de T_3 y T_4 en las ovejas no preñadas de ambos grupos (A y B) en la Tabla 4 (El-Tawab et al., 2022).

Tabla 4

Niveles de hormonas tiroideas (T_3 y T_4) en ovinos, grupo A y grupo B

		Subgrupo				
		1	2	3	4	5
T_3 nmol/L	Grupo A	2,8±0,3	2,3±0,3	1,8±0,2	2,3±0,4	1,9±0,1
	Grupo B	2,2±0,09	2,0±0,07	0,7±0,3	1,8±0,2	2,0±0,1
T_4 nmol/L	Grupo A	159,6±21,9	136,4±21,9	88,8±7,7	124,9±29,6	95,3±12,9
	Grupo B	124,9±14,2	102,9±7,7	124,9±23,2	95,3±10,3	104,3±10,3

Nota: 1: Corderos (1-7 días), 2: cordero adulto (2-4 años), 3: Hembras adultas no preñadas (2 a 4 años), 4: hembras preñadas (2 a 4 años), 5: ovejas lactantes (2 a 4 años)

Por otro lado, en Brasil se realizó un estudio en el que la población animal estudiada fue un total de 150 ovejas que fueron sometidas a necropsia entre 2016 y 2018. Estas ovejas tenían antecedentes de enfermedad cutánea difusa, cabe destacar que este estudio es el primero que examinó las deficiencias de zinc determinado la causa del hipotiroidismo en ovejas las concentraciones de T_3 y T_4 estuvieron por debajo de los valores de referencia para la especie en la Tabla 5 (Guedes et al., 2021).

Tabla 5

Hormona tiroidea, triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4), concentraciones en ovejas con antecedentes de alopecia difusa y atrofia tiroidea.

Hormona (nmol/L)	Oveja					Valores normales
	Granjas					
	1	2	3	4	5	
T_3	2,23	NE	2,01	2,05	2,03	2,04 -5,85
T_4	40,58	NE	40,55	45,08	41,03	49,68- 146,46

Nota: NE: No evaluado



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

La colecta de muestras se realizó en el Centro Experimental “La Raya” de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNA – Puno, ubicado en el distrito de Santa Rosa, provincia de Melgar y Región de Puno, situado entre 4,200 a 5,500 metros sobre el nivel del mar, corresponde al ámbito ecológico de puna húmeda, durante el año presenta dos épocas bien definidas, noviembre a abril corresponde a la época de lluvias y los meses de mayo a octubre a la época seca, con temperatura máxima de 14.13°C, mínima de - 10.18°C, temperatura promedio de 5.56°C, la precipitación pluvial anual con 725 mm y una humedad relativa de 61.83% (SENAMHI, 2021).

El análisis de las muestras se realizó en el Laboratorios de Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNA- Puno.

3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

3.2.1. Animales

Para el estudio se utilizaron 60 alpacas de la raza Huacaya y se agruparon en función a los factores sexo y edad. La distribución se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

Distribución de alpacas según edad y sexo

EDAD	SEXO		TOTAL
	Macho	Hembra	
Crías	10	10	20
Tuis	10	10	20
Adultos	10	10	20
TOTAL	30	30	60

Fuente: Datos de la investigación

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Toma de muestras

Para la toma de muestras, se siguió el siguiente procedimiento que se detalla a continuación:

- Identificación y determinación de la edad del animal.
- Examen clínico del animal a fin de establecer su estado de salud. Sólo se eligieron animales que mostraban un aparente buen estado sanitario, excluyendo animales enfermos.
- Registro de datos de cada animal: Número de arete, sexo, color y edad.
- Obtención de muestras de sangre. Utilizando agujas y tubos vacutainer sin anticoagulante (tapa roja), se obtuvo 3 mL de sangre por punción en la vena yugular, labor que se realizó desde las 3 a 8 am. Las muestras, debidamente identificadas y rotuladas, fueron colocadas en termo con gel refrigerante (2-8°C) para su conservación y transporte al laboratorio.



3.3.2. Fase de Laboratorio

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 min y posterior a ella fueron refrigerados para su posterior análisis.

3.3.2.1. Determinación de la concentración de T₃ (triyodotironina)

La determinación cuantitativa de la concentración de T₃ libre en suero sanguíneo se realizó utilizando la técnica de un inmunoensayo enzimático en microplaca (ELISA) utilizando kit de AccuBind ® USA.

Principio: Inmunoensayo enzimático competitivo TIPO 5

Los reactivos esenciales requeridos para un inmunoensayo enzimático en fase sólida incluyen al anticuerpo inmovilizado, el conjugado enzima-antígeno y un suero que contiene el antígeno nativo, una reacción de competencia resulta entre el antígeno nativo y el conjugado enzima-antígeno para un número limitante de sitios de unión insoluble. Después de lograr el equilibrio, la fracción ligada al anticuerpo se separa del antígeno no ligado mediante decantación o aspiración. La actividad enzimática, determinada por la reacción con un sustrato que genere luz, dentro de la fracción de enlace de anticuerpos será inversamente proporcional a la concentración del antígeno libre nativo. Al utilizar varias referencias de sueros de valores conocidos de antígenos, se puede generar una curva dosis respuesta a partir de la cual se evalúa la concentración de antígeno de una muestra desconocida.



- **Preparación de los reactivos**

- Se preparó el reactivo de trabajo A, solución de conjugado T₃-Enzima, se diluyó el conjugado T₃- enzima 1:11 con el buffer del conjugado T₃/T₄ total en un contenedor adecuado.
- Se preparó el tampón para lavado, se diluyó los contenidos del concentrado de lavado a 1000 ml con agua desionizada en una probeta
- Se preparó la solución de substrato de trabajo, se vertió el contenido del vial ámbar marcado como solución “B”.

- **Procedimiento de prueba**

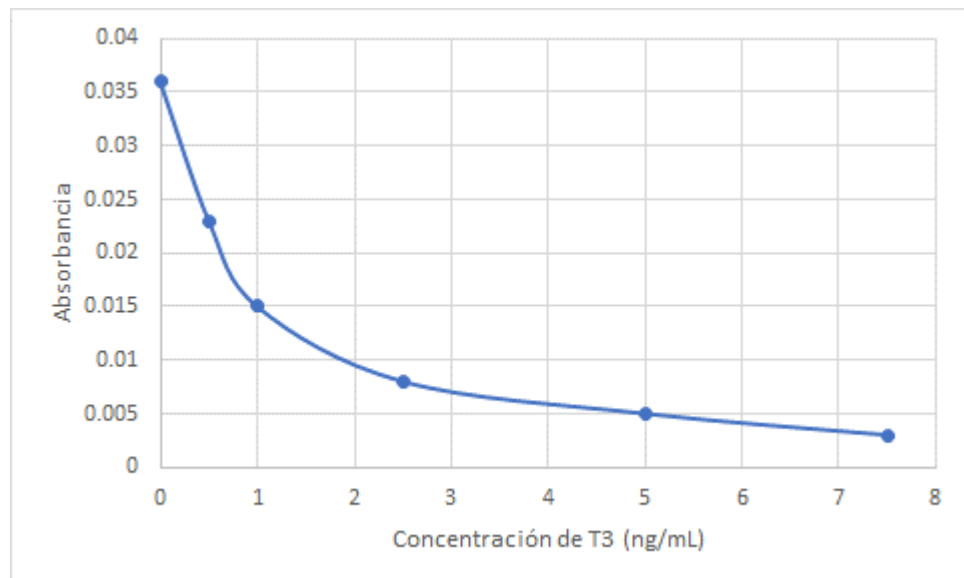
- Se formateó los pozos de la microplaca para cada suero de referencia para que así sea ensayada en duplicado.
- Se pipeteó 50 µL de suero de muestra dentro del pozo asignado.
- Se adicionó 100 µL de reactivo de trabajo A, reactivo enzima-T₃ a todos los pozos.
- Se agitó ligeramente la microplaca por 30 segundos para mezclar y cubrirla.
- Se incubó 60 min a temperatura ambiente
- Se descartó los elementos de la microplaca por decantación y se secó con papel absorbente.
- Se adicionó 350 µL de buffer de lavado se decantó por golpe y secado, se repitió dos veces adicionales, haciendo un total de 3 lavados.

- Se adicionó 100 μL (microlitros) de solución de sustrato de trabajo a todos los pozos.
 - Se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos.
 - Se adicionó 50 μL de solución de parada para cada pozo y se mezcló ligeramente por 20 segundos.
 - La microplaca de T_3 fue analizada en ELISA para la lectura de las absorbancias en cada pozo.
- **Cálculo de la concentración**

Con las lecturas de los estándares provistos por el fabricante, se elaboró la curva de calibración (Figura 2) con el cual se calculó la concentración de T_3 en cada muestra.

Figura 2

Curva de calibración de T_3



Nota: Elaboración propia



3.3.2.2. Determinación de la concentración de T₄ (tiroxina total)

La determinación cuantitativa de la tiroxina total en suero sanguíneo se realizó utilizando la técnica de un inmunoensayo enzimático en microplaca (ELISA) utilizando kit de AccuBind ® USA.

Principio: Inmunoensayo enzimático competitivo método análogo para T₄ libre (TIPO 5)

Después mezclar el anticuerpo inmovilizado, el conjugado enzima-antígeno y el suero que contiene el antígeno nativo, se obtiene una reacción de competencia entre el antígeno nativo y el conjugado enzima-antígeno para un número limitado de sitios de unión insolubilizados. Después que el equilibrio se mantiene, la fracción unida al anticuerpo es separada del antígeno no unido mediante decantación o aspiración. La actividad enzimática determinada con un sustrato que genera luz, en la fracción unida al anticuerpo, el cual es inversamente proporcional a la concentración nativa del antígeno. Al utilizar varias referencias séricas diferentes de valores de antígenos conocidos, se puede generar una curva de respuesta de dosis a partir de la cual se establece la concentración de antígeno de una sustancia desconocida.

- **Preparación de los reactivos**

- Se preparó el reactivo de trabajo A, solución de conjugado T₃-Enzima, se diluyó el conjugado T₃- enzima 1:11 con el buffer del conjugado T₃/T₄ total en un contenedor adecuado.



- Se preparó el tampón para lavado, se diluyó los contenidos del concentrado de lavado a 1000 ml con agua desionizada en una probeta
- Se preparó la solución de sustrato de trabajo, se vertió el contenido del vial ámbar marcado como solución “B”.
- **Procedimiento de prueba**
 - Se formateó los pozos de la microplaca para cada suero de referencia para que así sea ensayada en duplicado.
 - Se pipeteó 25 μ L de suero de muestra dentro del pozo asignado.
 - Se adicionó 100 μ L de reactivo de trabajo A, reactivo enzima-T₄ a todos los pozos.
 - Se agitó ligeramente la microplaca por 30 segundos para mezclar y cubrirla.
 - Se incubó 60 min a temperatura ambiente
 - Se descartó los elementos de la microplaca por decantación y se secó con papel absorbente.
 - Se adicionó 350 μ L de buffer de lavado se decantó por golpe y secado, se repitió dos veces adicionales, haciendo un total de 3 lavados.
 - Se adicionó 100 μ L de solución de sustrato de trabajo a todos los pozos.
 - Se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos.
 - Se adicionó 50 μ L de solución de parada para cada pozo y se mezcló ligeramente por 20 segundos.

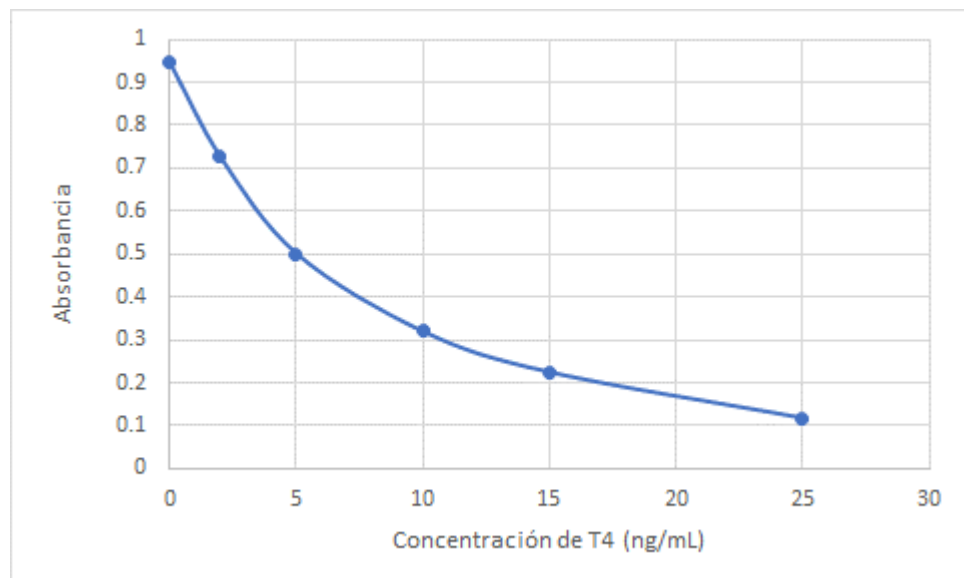
- La microplaca de T₄ fue analizada en ELISA para la lectura de las absorbancias en cada pozo.

- **Cálculo de la concentración**

Con las lecturas de los estándares provistos por el fabricante, se elaboró la curva de calibración (Fig. 3) con el cual se calculó la concentración de T₄ en cada muestra.

Figura 3

Curva de calibración de T₄



Nota: Ilustración de la absorbancia y concentración de T₄ proporcionado por AccuBind ® USA

- **Recursos necesarios**

Materiales de campo

- Sogas
- Algodón



- Alcohol y tintura de yodo
- Tubos y agujas Vacutainer (tapa roja)
- Cooler con gradilla y geles refrigerantes
- Cámara fotográfica y registros

Materiales de laboratorio

- Lector de Microplacas
- Lavador de microplacas
- Micropipetas mono y multicanal
- Papel filtro
- Vortex
- Refrigeradora
- Tips de micropipetas
- Material de bioseguridad (mandil, tapabocas, guantes y gorro)
- Papel parafilm

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La sistematización de datos se realizó en hoja Excel y luego analizados estadísticamente en el programa InfoStat versión 2020e. Se reportan los siguientes estadísticos descriptivos: media, error estándar de la media (EE), desviación estándar (DS), coeficiente de variación (CV) y valores extremos (mínimo y máximo).

El análisis de la varianza (ANVA) se realizó en un Diseño de Bloques Completo al Azar cuyo modelo matemático fue:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$



Donde:

Y_{ij} : variable de respuesta.

μ : Media general de la variable en estudio

α_i : Efecto del sexo ($i=1, 2$)

B_j : Efecto de la edad ($j=1, 2, 3$) (bloque)

ε_{ij} : Error experimental

Para la comparación de medias se utilizó la Prueba de Significancia de Tukey a un $\alpha=0.05$.

Previo al análisis de datos, se realizaron pruebas de normalidad utilizando el método de Shapiro Wilks y prueba de homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4. NIVELES DE LA HORMONA TRIYODOTIRONINA (T₃) EN ALPACAS

HUACAYA DE DIFERENTE SEXO Y EDAD

En la Tabla 7, se muestran los resultados descriptivos para los niveles de la hormona triyodotironina (T₃) en alpacas de raza Huacaya, los estadísticos generados servirán de referencia.

Tabla 7

Estadísticos descriptivos de las concentraciones de triyodotironina (T₃) expresados en nmol/L en alpacas Huacaya según clase y sexo.

Clase	Sexo	n	Media	E.E.	C.V. (%)	Mínimo	Máximo
Cría	Hembra	10	1.25	0.05	12.00	0.92	1.38
	Macho	10	1.20	0.05	13.33	0.92	1.45
Tui	Hembra	10	1.61	0.10	18.63	1.31	2.07
	Macho	10	1.63	0.08	15.34	1.23	2.07
Adulto	Hembra	10	0.43	0.02	16.28	0.32	0.55
	Macho	10	0.41	0.02	12.20	0.32	0.48

Fuente: Datos de la investigación

En la tabla se observa que las crías hembra tienen una media de 1.25 ± 0.05 nmol/L, mientras para crías machos es de 1.20 ± 0.05 nmol/L. Para tui hembra es de 1.61 ± 0.10 nmol/L y para tui macho de 1.63 ± 0.08 nmol/L. Para adulto hembra este valor es de 0.43 ± 0.02 nmol/L y para adulto macho de 0.41 ± 0.02 nmol/L, los niveles de la hormona T₃ en alpacas de la Raza Suri y Huacaya (Fecteau et al., 2023) muestran una concentración de 2.4 nmol/L y 2.57 nmol/L en hembras no gestantes, valores significativamente más altos que los



observados en el estudio. Esta diferencia puede atribuirse a la fuerte influencia de factores ambientales y de altitud en las concentraciones de estas hormonas (Padrón et al., 2000) el estudio realizado a más de 4000 m.s.n.m. contrasta con el realizado en Tennessee a 274 m.s.n.m., lo cual explica la variabilidad en los resultados obtenidos.

Valorando algunos estadísticos se observa que el valor mínimo es para la clase adulto tanto hembra como macho con 0.32 nmol/L, mientras el valor máximo se obtuvo para la clase tui tanto hembra como macho con 2.07 nmol/L, la media más alta fue para tui macho con 1.63, el coeficiente de variación fue menor para la cría hembra con 12.00%, el más elevado para tui hembra con 8.63%, el error estándar fue menor para adulto hembra y macho con 0.02 nmol/L y el más alto para tui hembra con 0.10 nmol/L. En alpacas de la raza Suri y Huacaya (Fecteau et al., 2023) se observaron valores mínimos de 0.7 nmol/L para machos intactos y un máximo de 6.2 nmol/L para la misma clase. Estos valores mínimos y máximos son superiores a los obtenidos en nuestro estudio. Esta diferencia resalta la variabilidad significativa que existe según el sexo y la edad, como se ha observado en investigaciones previas (Osorio & Vinasco, 2016).

En el Anexo 1, se presentan los resultados del análisis de varianza para los valores de triyodotironina (T_3), la fuente de variación clase resultó significativa ($p < 0.05$), mientras que la fuente sexo resultó ser no significativa ($P > 0.05$), de lo cual se interpreta que al menos una clase presenta valores de triyodotironina diferente al resto, para verificar diferencias específicas se procedió a ejecutar la prueba de rango múltiple de Tukey. A diferencia de lo observado en un estudio previo en alpacas de las razas Suri y Huacaya (Fecteau et al., 2023) se encontró que la concentración en machos castrados fue notablemente mayor que en el resto de los otros grupos y la variable sexo mostró ser significativa en la variación observada



entre hembras gestantes y no gestantes, con valores considerablemente más altos en estas últimas. Sin embargo, al comparar con estudios en ovinos, se encontró que la edad es un factor significativo tanto en corderos recién nacidos como en adultos, así como en hembras durante la etapa de lactancia (El-Tawab et al., 2022).

En el Anexo 2, se presentan los resultados de la prueba de rango múltiple de Tukey, se observa que la clase tui presenta la media más elevada de triyodotironina (letra A), el cual es estadísticas superior y diferente del resto de clases, el segundo lugar es ocupado por la clase cría (letra B) que a su vez es estadísticamente diferente al resto de clases, mientras que la clase adulto ocupa el tercer lugar (letra C) con la media más baja de los tres. Existen diferencias significativas entre grupos de edad (Osorio & Vinasco, 2016). Al comparar con ovinos, se encontró que los valores de hormonas en crías (corderos de 1 a 7 días de nacidos) son considerablemente más altos que en corderos adultos (El-Tawab et al., 2022).

En base a los resultados se acepta la hipótesis planteada, es decir: Los valores de referencia de la T_3 en alpacas del Centro Experimental La Raya difieren en las distintas edades del animal. En el Anexo 3, se presentan los resultados de la prueba de rango múltiple de Tukey, se observa que para ambos sexos se obtuvo la misma letra (A), señalando las medias de ambos no son estadísticamente diferentes, por lo que se evidencia que los valores de hormona triyodotironina no presenta diferencias según el sexo de la alpaca de raza Huacaya.

La concentración de T_3 mostró variaciones significativas según el sexo en alpacas de las razas Huacaya y Suri, se encontraron valores considerablemente más altos en hembras vacías y preñadas en comparación con las otras clases, aunque solo se observó una diferencia

significativa con los machos castrados, cuyos niveles superaron el promedio de todas las categorías (Fecteau et al., 2023). Sin embargo, al comparar con otra especie (ovinos), se observa que las concentraciones de T_3 en machos son significativamente mayores que en hembras, indicando que existe una diferencia según sexo (El-Tawab et al., 2022).

En base a los resultados se acepta la hipótesis nula, es decir: Los valores de referencia de la T_3 en alpacas del Centro Experimental La Raya no son diferentes entre machos y hembras.

Tabla 8

Estadísticos descriptivos de T_3 expresados en nmol/L de alpacas Huacaya según clase.

Clase	n	Media	E.E.	C.V. (%)	Mínimo	Máximo
Cría	20	1.23 ^b	0.03	13.01	0.92	1.45
Tui	20	1.62 ^a	0.06	16.67	1.23	2.07
Adulto	20	0.42 ^c	0.01	14.29	0.32	0.55

Fuente: Datos de la investigación

En la Tabla 8, se muestran los resultados descriptivos para los niveles de hormona triyodotironina (T_3) en alpacas de raza Huacaya según edad, donde el ANVA y la prueba de Tukey demuestra que existe diferencias altamente significativas entre las clases estudiadas ($P \leq 0.01$).

Las concentraciones de T_3 de alpacas de la raza Suri y Huacaya mostraron variaciones significativas entre diferentes grupos: machos prepuberales (tuís) con 6,7 nmol/L, machos intactos con 7,4 nmol/L, hembras vacías con 7.1 nmol/L y hembras preñadas con 6,1 nmol/L. No se encontraron similitudes en los datos entre el estudio realizado en Tennessee y el realizado en Perú, estas diferencias podrían atribuirse a factores ambientales como el clima

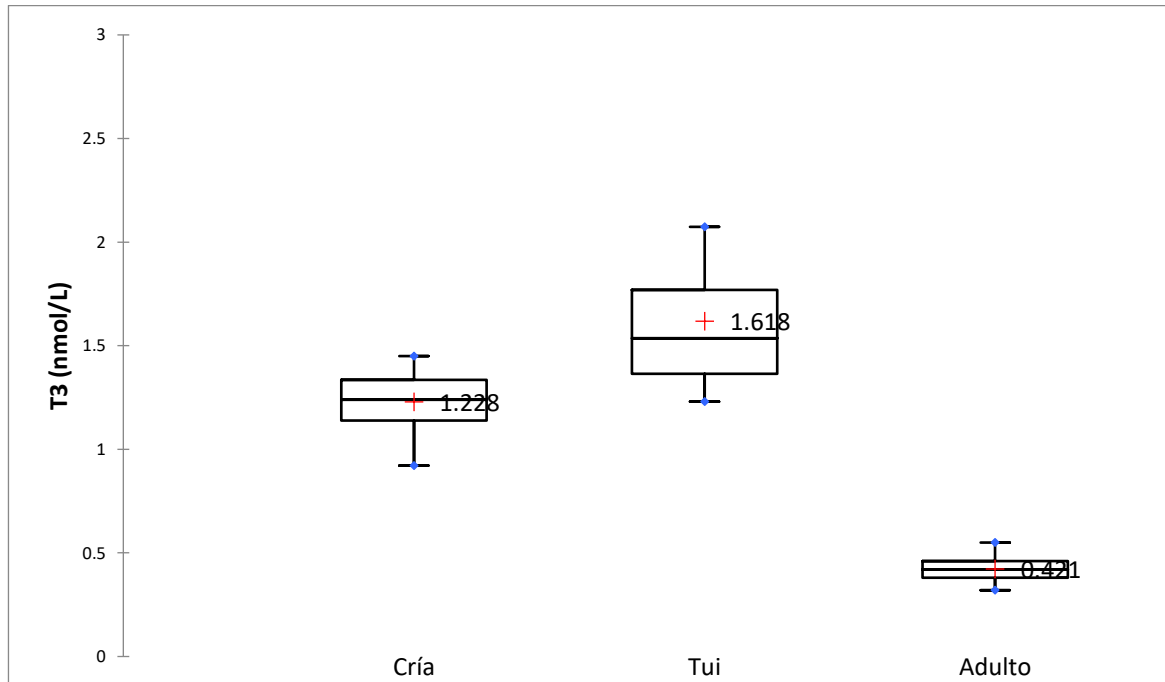


y la altitud (Padrón et al., 2000), así como a diferencias en la alimentación, incluyendo posibles deficiencias de selenio en los forrajes administrados a los animales estudiados(Contreras et al., 2002).

Valorando algunos estadísticos se observa que el valor mínimo es para la clase adulto con 0.32 nmol/L, mientras el valor máximo se obtuvo para la clase tui con 2.07 nmol/L, la media más elevada fue para tui con 1.62 nmol/L, el coeficiente de variación fue menor para las crías y mayor en tuis, el error estándar fue menor en adultos y mayor en tuis. En alpacas de las razas Suri y Huacaya, se observa una relación similar con los del estudio, donde los machos prepuberales presentan concentraciones mayores que los machos castrados adultos (Fecteau et al., 2023). Sin embargo, haciendo una comparación con ovinos se observa una variación relacionada con la edad, con concentraciones diferentes entre corderos de 1 a 7 días de nacidos y corderos adultos (El-Tawab et al., 2022). Estas diferencias indican que existe una variabilidad significativa relacionada con la edad en ambos estudios (Osorio & Vinasco, 2016).

Figura 4

Estadístico descriptivo de hormona triyodotironina (T₃) (nmol/L) en alpacas Huacaya según edad.



Nota: Diagrama de cajas de T₃ expresados en nmol/L, en función a edades con los siguientes valores en cría 1.228, tui 1.618 y adulto 0.421

En la Figura 4, el diagrama de cajas permite apreciar de manera gráfica los resultados señalados previamente, se evidencia que el mayor valor de media es para la clase tui, seguido de las crías y por último los adultos, la mayor variación es observada para la clase tui y la menor variación en la clase adulta, indicando que los valores de triyodotironina son más estables en la edad adulta de las alpacas de raza Huacaya, mientras que en la edad de tui la misma presenta una mayor variación. Los valores mínimos y máximo muestran una distribución regular para las tres edades, sin embargo, en el estudio realizado en Tennessee con alpacas de las razas Suri y Huacaya, los valores mínimos y máximos no muestran una distribución regular según las edades, pero las concentraciones de T₃ son más estables en la

edad adulta, ya que muestran menos variabilidad en comparación con los prepuberales (Fecteau et al., 2023). Esto confirma que la edad es un factor determinante en la modificación de los niveles de hormonas tiroideas (Osorio & Vinasco, 2016).

Tabla 9

Estadísticos descriptivos de T₃ expresados en nmol/L de alpacas Huacaya según sexo.

Sexo	n	Media	E.E.	C.V. (%)	Mínimo	Máximo
Hembra	30	1.10 ^a	0.10	49.09	0.32	2.07
Macho	30	1.08 ^a	0.10	50.00	0.32	2.07

Fuente: Datos de la investigación

En la Tabla 9, se muestran los resultados descriptivos para los niveles de hormona triyodotironina (T₃) en alpacas de raza Huacaya según sexo, el ANVA demuestra que no existe diferencia en los niveles de T₃ entre machos y hembras ($P > 0.05$).

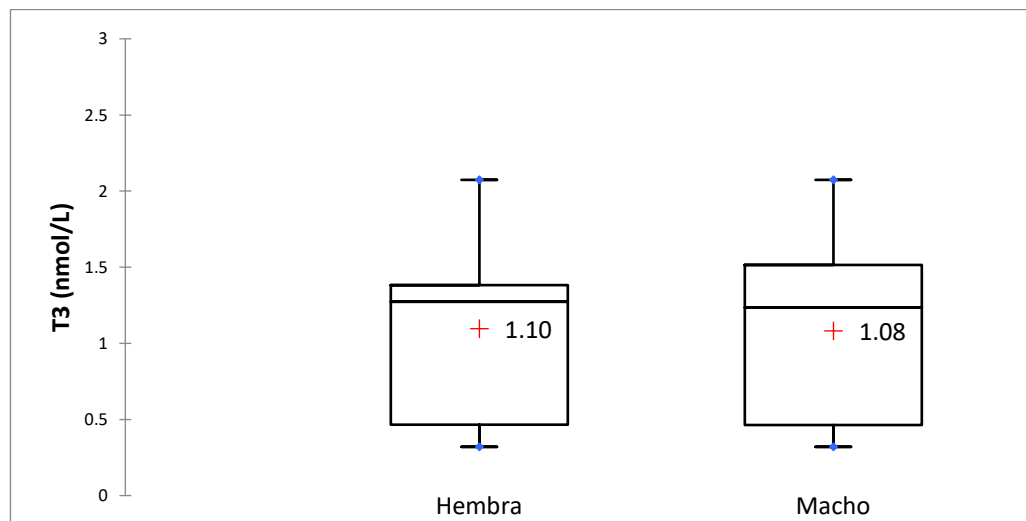
Los valores encontrados son menores a los encontrados por Fecteau et al. (2023) quienes estudiando alpacas de las razas Suri y Huacaya, encontraron valores de T₃ en hembras de 2.6 nmol/L y en machos 2.5 nmol/L. Estas diferencias pueden atribuirse a factores como la altitud (Padrón et al., 2000) y la posible deficiencia de selenio en los forrajes, los cuales pueden influir en la variabilidad de los niveles de hormonas tiroideas, incluida la T₃ (Contreras et al., 2002).

Valorando algunos estadísticos se observa que el valor mínimo es el mismo tanto para hembras y machos con 0.32 nmol/L, el valor máximo también es el mismo con 2.07 nmol/L, la media también es ligeramente superior para hembras con 1.10, el coeficiente de variación ligeramente mayor en machos con 50.0%, el error estándar es el mismo con 0.10 nmol/L. Los valores mínimos tanto para hembras como para machos en alpacas de las razas Suri y

Huacaya en Tennessee muestran una marcada diferencia (Fecteau et al., 2023) , en comparación con los obtenidos en el estudio.

Figura 5

Estadístico descriptivo de hormona triyodotironina (T₃) (nmol/L) en alpacas Huacaya según sexo.



Nota: Diagrama de cajas de T₃, en función a sexo (hembra y macho)

El diagrama de cajas mostrado en la Figura 5, permite apreciar de manera gráfica los resultados señalados previamente, se evidencia que el mayor valor de media es para la hembra con 1.10, sin embargo, muy cercano al macho con 1.08, por lo que como se señaló no existen diferencias entre los mismos ($p < 0.05$). Al observar los valores máximos y mínimos se tiene un valor máximo para cada sexo que eleva ligeramente la media de cada grupo, aunque en alpacas de la raza Suri y Huacaya en un estudio realizado en Tennessee, se observa una variación significativa entre sexos, siendo las hembras considerablemente superiores en niveles de T₃ en comparación con los machos (Fecteau et al., 2023) además, al comparar con otra especie como los ovinos, se constata que los machos tienen niveles más

altos de T₃ en comparación con las hembras (El-Tawab et al., 2022). Esto confirma que el sexo es un factor determinante en la modificación de los niveles de hormonas tiroideas (Osorio & Vinasco, 2016).

4.2. NIVELES DE LA HORMONA TIROXINA O TETRAYODOTIRONINA (T₄) EN ALPACAS HUACAYA DE DIFERENTE SEXO Y EDAD.

En la Tabla 10, se muestran los estadísticos descriptivos para los niveles de la hormona T₄ en alpacas de raza Huacaya que servirán de referencia.

Tabla 10

Estadísticos descriptivos de las concentraciones de tiroxina (T₄) expresados en nmol/L en alpacas Huacaya según clase y sexo.

Clase	Sexo	n	Media	E.E.	C.V. (%)	Mínimo	Máximo
Cría	Hembra	10	123.2	6.1	15.6	100.6	148.4
	Macho	10	125.0	4.4	11.2	109.7	149.6
Tui	Hembra	10	96.5	2.5	8.1	87.4	109.7
	Macho	10	98.6	2.2	7.1	85.6	105.5
Adulto	Hembra	10	110.0	4.1	11.9	90.3	129.0
	Macho	10	111.7	5.3	15.0	90.3	130.5

Fuente: Datos de la investigación

La concentración de la hormona T₄ en alpacas de la Raza Suri y Huacaya muestra diferentes valores según la clase: en un macho adulto sin castrar es de 86.2 nmol/L, en un macho castrado es 95.3 nmol/L, en un macho prepuberal es 86.2 nmol/L, en una hembra no gestante es de 91.4 nmol/L y en una alpaca preñada es de 78.5 nmol/L (Fecteau et al., 2023). Estos valores son inferiores a los obtenidos en el estudio, y esto puede explicarse por la fuerte influencia de factores ambientales, como la altitud (Padrón et al., 2000), la deficiencia de



selenio en los forrajes (Contreras et al., 2002) y las condiciones de estrés al que están sometidos (Matamoros et al., 2003).

Valorando algunos estadísticos se observa que el valor mínimo es para la clase tui macho con 85.6 nmol/L, mientras el valor máximo se obtuvo para la clase cría macho con 149.6 nmol/L, la media más alta fue para cría macho con 125.0 nmol/L, el coeficiente de variación fue menor para tui macho con 7.1%, el más elevado para cría hembra con 15.6%, el error estándar fue menor para tui macho con 2.2 y el más alto para cría hembra con 6.1. En el estudio realizado en alpacas de la raza Suri y Huacaya, los valores mínimos observados en machos intactos y alpacas preñadas fueron iguales, más no en las demás clases (Fecteau et al., 2023), lo que confirma que la edad es un factor determinante en la variación de los niveles de hormonas tiroideas (Osorio & Vinasco, 2016).

En el Anexo 4, se presentan los resultados del análisis de varianza para los valores de T₄, la fuente de variación clase resultó significativa ($p < 0.05$), mientras que la fuente sexo resultó ser no significativa ($P > 0.05$), de lo cual se interpreta que al menos una clase presenta valores de T₄ diferente al resto, para verificar diferencias específicas se procedió a ejecutar la prueba de rango múltiple de Tukey, sin embargo, en alpacas de la raza Suri y Huacaya en Tennessee la variable sexo es muy significativa y no se encontraron valores determinantes para la variable edad (Fecteau et al., 2023), esto lleva a concluir que tanto la edad como el sexo son factores clave en la variación de los niveles de hormonas tiroideas (Osorio & Vinasco, 2016).

En el Anexo 5, se presentan los resultados de la prueba de rango múltiple de Tukey, se observa que la clase cría presenta la media más elevada de T₄ (letra A), el cual es



estadísticas superior y diferente del resto de clases, el segundo lugar es ocupado por la clase adulto (letra B) que a su vez es estadísticamente diferente al resto de clases, mientras que la clase tui ocupa el tercer lugar (letra C) con la media más baja de los tres. En el estudio de alpacas de la raza Suri y Huacaya en Tennessee, no se pudo establecer una diferencia clara entre las clases (Fecteau et al., 2023). Sin embargo, al comparar con otra especie como los ovinos, se observa que los corderos de 1 a 7 días de nacidos tienen niveles mucho más altos en comparación con los corderos y hembras adultos (El-Tawab et al., 2022). Esto confirma que la edad es un factor determinante en la variación de los niveles de hormonas tiroideas (Osorio & Vinasco, 2016).

En el Anexo 6, se presentan los resultados de la prueba de rango múltiple de Tukey, se observa que para ambos sexos se obtuvo la misma letra (A), señalando las medias de ambos no son estadísticamente diferentes, por lo que se evidencia que los valores de hormona tiroxina no presenta diferencias según el sexo de la alpaca de raza Huacaya. Por el contrario, en un estudio realizado en Tennessee con alpacas de la raza Suri y Huacaya, se observan diferencias significativas en cuanto al sexo, con los machos mostrando los valores más altos (Fecteau et al., 2023). Al comparar con otra especie, como los ovinos, también se observa que los valores máximos se presentan en los machos en comparación con las hembras (Osorio et al., 2016). Esto confirma que si existen diferencias entre el sexo y es un factor determinante en la variación de los niveles de hormonas tiroideas (Osorio & Vinasco, 2016), las diferencias en los resultados de otros estudios pueden atribuirse a factores como la altitud, la deficiencia de selenio en los forrajes, el estrés y la aplicación de medicamentos (Matamoros et al., 2003).

Tabla 11

Estadísticos descriptivos de T₄ expresados en nmol/L de alpacas Huacaya según clase.

Clase	n	Media	E.E.	C.V. (%)	Mínimo	Máximo
Cría	20	124.10 a	3.66	13.19	100.62	149.64
Tui	20	97.53 ^c	1.63	7.48	85.57	109.65
Adulto	20	110.88 ^b	3.27	13.19	90.30	130.54

Fuente: Datos de la investigación

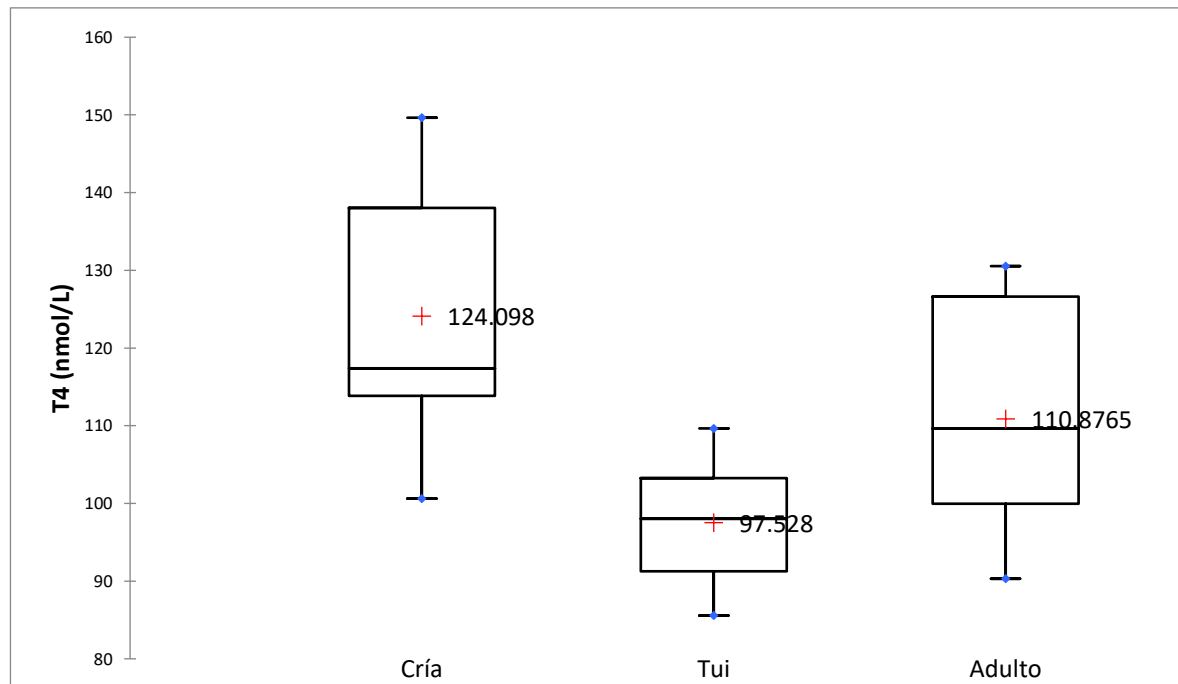
En la Tabla 11, se muestran los resultados descriptivos para los niveles de hormona T₄ en alpacas de raza Huacaya según edad, los estadísticos generados servirán de referencia, así se tiene que para crías este valor es de 124.10 ± 3.66 nmol/L, mientras para tui es de 97.53 ± 1.63 y para adulto es de 110.88 ± 3.27 nmol/L. Los resultados confirman que tanto la edad como el sexo son factores determinantes en la variación de los niveles de hormonas tiroideas (Osorio & Vinasco, 2016).

Valorando algunos estadísticos se observa que el valor mínimo es para la clase tui con 85.57 nmol/L, mientras el valor máximo se obtuvo para la clase cría con 149.64 nmol/L, la media más elevada fue para cría con 124.10 nmol/L y menor para tui con 97.53 nmol/L, el coeficiente de variación fue menor para tuis con 7.48% e igual en crías y adultos con 13.19%, el error estándar fue menor en tuis con 1.63 y mayor en crías con 3.66. En un estudio realizado en Tennessee con alpacas de la raza Suri y Huacaya, el valor mínimo se registró en las alpacas no preñadas con 50.2 nmol/L, y el valor máximo en los machos intactos con 166.1 nmol/L (Fecteau et al., 2023). Los valores obtenidos en el estudio de Tennessee son significativamente menores en comparación con otros estudios, lo cual puede atribuirse a factores determinantes en la variación de los niveles de hormonas tiroideas son la altitud

(Padrón et al., 2000), que difiere entre Tennessee y Puno, además de la posible deficiencia de selenio en el forraje y las condiciones de estrés (Matamoros et al., 2003).

Figura 6

Estadístico descriptivo de hormona tiroxina (T₄) (nmol/L) en alpacas Huacaya según edad.



Nota: Diagrama de cajas de T₄ expresados en nmol/L, en función a edades con los siguientes valores en cría 124.098 , tui 97.528 y adulto 110.8765

En la Figura 6, el diagrama de cajas permite apreciar de manera gráfica los resultados señalados previamente, se evidencia que el mayor valor de media es para la clase cría, seguido de adulto y por último los tuis, sin embargo, la mayor variación es observada para las clases cría y adulto y la menor variación en la clase tui, indicando que los valores de tetrayodotironina son más estables en la edad tui de las alpacas de raza Huacaya. En un estudio realizado en Tennessee con alpacas de la raza Suri y Huacaya, no se observó una variación significativa en función de la edad debido a la selección del grupo de estudio (Fecteau et al., 2023). Por lo contrario, al comparar con ovinos, se encontró que los corderos

de 1 a 7 días de nacidos tienen los valores más altos, mientras que las hembras adultas no preñadas muestran los valores más bajos (El-Tawab et al., 2022). Estos resultados atribuyen que la edad es un factor determinante en la variación de los niveles de las hormonas tiroideas (Osorio & Vinasco, 2016).

Tabla 12

Estadísticos descriptivos de T₄ expresados en nmol/L de alpacas Huacaya según sexo.

Sexo	n	Media	E.E.	C.V. (%)	Mínimo	Máximo
Hembra	30	109.90 ^a	3.21	16.01	87.44	148.35
Macho	30	111.77 ^a	3.07	15.05	85.57	149.64

Fuente: Datos de la investigación

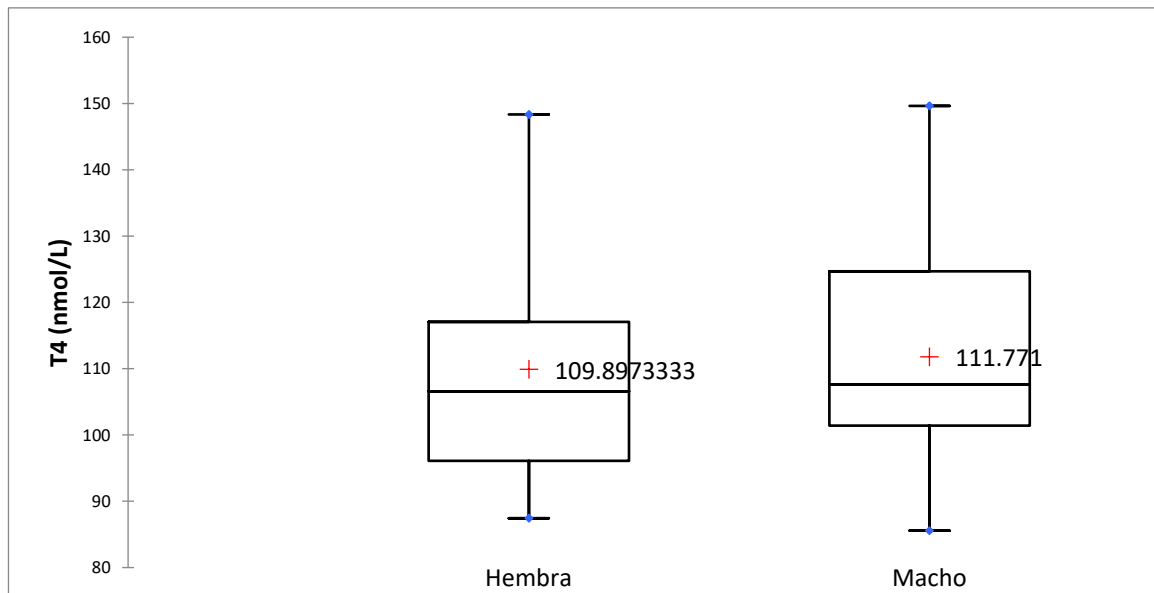
En la Tabla 12, se muestran los resultados descriptivos para los niveles de hormona tetrayodotironina (T₄) en alpacas de raza Huacaya según sexo, los estadísticos generados servirán de referencia, así se tiene que para hembras este valor es de 109.90 ± 3.21 nmol/L, mientras para machos el mismo es de 111.77 ± 3.07 nmol/L. De igual manera en machos castrados la concentración de T₄ fue de 95.25 nmol/L mientras que en hembras no gestantes fue 91.39 nmol/L en alpacas de la raza Suri y Huacaya de Tennessee (Fecteau et al., 2023). Comparando con otras especies, se observa que los niveles de T₄ en machos son considerablemente más altos que en hembras.

Valorando algunos estadísticos se observa que el valor mínimo es para hembras con 87.44 nmol/L, mientras el valor máximo se observó para machos con 149.64 nmol/L, la media fue mayor en machos con 111.77 nmol/L, el coeficiente de variación fue ligeramente mayor en hembras con 16.01% y el error estándar fue menor en machos con 3.07. Esta

diferencia confirma que el sexo es un factor determinante en la variabilidad de los niveles de hormonas tiroideas (Osorio & Vinasco, 2016).

Figura 7

Estadístico descriptivo de hormona tiroxina (T4) (nmol/L) en alpacas Huacaya según sexo.



Nota: Diagrama de cajas de T₄, en función a sexo (hembra y macho)

En la Figura 7, el diagrama de cajas permite apreciar de manera gráfica los resultados señalados previamente, se evidencia que el mayor valor de media es para los machos, sin embargo, muy cercano a las hembras, por lo que como se señaló no existen diferencias entre los mismos ($p < 0.05$). Al observar los valores máximos y mínimos se tiene que se observa un valor máximo para machos que ligeramente aporta a un mayor valor de la media. Esto coincide con otro estudio realizado en Tennessee de alpacas de la raza Suri y Huacaya (Fecteau et al., 2023) determinando así qué la edad es un factor determinante en la variación de los niveles de las HT (Osorio & Vinasco, 2016).



V. CONCLUSIONES

- Los niveles de triyodotironina (T_3) en alpacas Huacaya son influenciados por la edad o clase animal, siendo mayor en tuis (1.62 nmol/L), seguido por crías (1.23 nmol/L) y el más bajo valor en adultos (0.42 nmol/L) ($p \leq 0.01$). El sexo animal no influye en los niveles de T_3 ($p > 0.05$).
- Los niveles de tiroxina (T_4) en alpacas Huacaya son influenciados por la edad o clase animal, siendo mayor en crías (124.11 nmol/L), seguido por adultos (110.88 nmol/L) y el más bajo valor corresponde a tuis (97.53 nmol/L) ($p \leq 0.01$). El sexo animal tampoco influye en los niveles de T_4 ($p > 0.05$).



VI. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de las hormonas tiroideas considerando variables como el estado alimentario, la época del año, la condición corporal del animal y/o correlacionar con el peso vivo de los animales en las distintas clases.
- Realizar estudios para determinar los valores normales de las hormonas triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4) en alpacas de raza Suri y compararlos con los de raza Huacaya.
- Realizar estudios de los niveles plasmáticos de la tiroglobulina en alpacas Huacaya y Suri.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Behringer, V., Deimel, C., Hohmann, G., Negrey, J., Schaebs, F. S., & Deschner, T. (2018). Applications for non-invasive thyroid hormone measurements in mammalian ecology, growth, and maintenance. *Hormones and Behavior*, *105*, 66–85. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.07.011>
- Bustinza, A. V., Machaca, V., Cano, V., & Quispe, J. (2021). Evolution and development of the alpaca breeds: Suri and Huacaya. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, *32*(5). <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i5.19876>
- Calixto, L. M. (2019). *Efecto de la temperatura sobre la expresión diferencial de los genes involucrados en el eje hipotálamo- pituitario - tiroides en larvas de jurel Seriola rivoliana*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Chávez, D., Villacrés, J., & Ramírez, L. (2019). *Principios de Fisiología Animal con enfoques de producción* (Vol. 1). UPSE.
- Contreras, P., Matamorros, R., Monroy, R., Kruze, J., Leyán, V., & Andaur, M. (2002). Efecto de una dieta deficiente en selenio sobre los valores sanguíneos de T3 y T4 en vacas. *Patología Clínica Comparada*, *11*(2), 65–70.
- Contreras, S. (2019). *Potencial productivo y comercial de la alpaca*.
- Diessler, M. E., Woudwyk, M. A., & Gomez, G. (2022). Sistema endocrino. In *Introducción a la Histología Veterinaria* (pp. 435–479). EDULP .
- El-Tawab, A., Eissa, N., & Abdel- Elhamied, E. (2022). Relationship between Thyroid Hormones and Blood Contents of Zinc and Copper of Sheep at Different Physiological Status. *Journal of Veterinary Medical Research*, *30*(1), 31–35. <https://doi.org/10.21608/jvmr.2022.164180.1069>
- Esquivel, D., Montero, M., & Barros - Rodrigez, M. (2018). Los camélidos sudamericanos: Productos y subproductos usados en la región andina. In *Actas Iberoamericanas en Conservación Animal AICA* (Vol. 11).



- Fan, R., Gu, Z., Guang, X., Marín, J. C., Varas, V., González, B. A., Wheeler, J. C., Hu, Y., Li, E., Sun, X., Yang, X., Zhang, C., Gao, W., He, J., Munch, K., Corbett-Detig, R., Barbato, M., Pan, S., Zhan, X., ... Dong, C. (2020). Genomic analysis of the domestication and post-Spanish conquest evolution of the llama and alpaca. *Genome Biology*, 21(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02080-6>
- Fecteau, K., Giori, L., Eiler, H., Esteller-Vico, A., Lear, A., & Videla, R. (2023). Serum steroid and thyroid hormone concentrations in healthy domestic male and female alpacas. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1281053>
- Ferguson, D. C. (2007). Testing for Hypothyroidism in Dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 37(4), 647–669. <https://doi.org/10.1016/J.CVSM.2007.05.015>
- Flis, Z., & Molik, E. (2021). Changes in the concentrations of thyroid hormones in dairy sheep. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, 17(1), 7–12. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0014.7041>
- Guedes, R. A., Riet-Correa, F., Sousa, F. M., Dantas de Gois, D., Costa, R., Geovana da Silva, I., Maria da Silva, V., Melo, A., Dantas, S. V., & Barbosa, R. (2021). Diffuse alopecia and thyroid atrophy in sheep. *Animals*, 11(12), 1–9. <https://doi.org/10.3390/ani11123530>
- INEI. (2012). IV Censo agropecuario. In *IV Censo Nacional Agropecuario*.
- Jácome, A., Ardila, E., & Casas, L. A. (2022). *Fisiología endocrina* (Vol. 4). El Manual Moderno.
- Matamoros, R., Contreras, P. A., Wittwer, F., & Mayorga, M. (2003). Hipotiroidismo en rumiantes. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 35, 1–11.
- MINAGRI. (2019). *Potencial productivo y comercial de la alpaca*.



- Montalvo, A. A. (2020). *Estado actual de la investigación en Camélidos Sudamericanos y propuestas de futuros estudios en el Perú*. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica.
- Nuñez, V., Pamparato, A., & Scott, V. (2010). *Determinación de tirotropina (TSH), tiroxina (T4) y colesterol en caninos sanos y con diagnóstico presuntivo de hipotiroidismo*. Universidad de la República.
- Osorio, J. H., Correa Carvajal, D., & Pérez, J. E. (2016). Concentraciones de hormona estimulante de la tiroides y tiroxina libre en ovinos jóvenes. *Revista de Medicina Veterinaria*, 33, 77–81. <https://doi.org/10.19052/mv.4055>
- Osorio, J. H., & Correa, D. (2013). Alteraciones de los niveles de hormonas tiroideas y su influencia en la salud y producción de pequeños rumiantes. *Biosalud*, 12(1), 39–48.
- Osorio, J. H., Urquijo, L. M., & Salamanca, D. M. (2011). Factores que modifican los niveles de hormonas tiroideas en aves domésticas. *Luna Azul*, 32, 126–136.
- Osorio, J. H., & Vinasco, J. (2016). Comparación de los niveles séricos de TSH Y T4 libre en bovinos. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 63(2), 87. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v63n2.59356>
- Padrón, T., Corbera, J. A., Juste de Santa Ana, C., Morales, M. F., & Gutiérrez, C. J. (2000). Estudio de los niveles de yodo urinario en caprino en Gran Canaria. In *Patología Animal*. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3663092>
- Rabah, S. A., Gowan, I. L., Pagnin, M., Osman, N., & Richardson, S. J. (2019). Thyroid Hormone Distributor Proteins During Development in Vertebrates. *Frontiers in Endocrinology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00506>
- Rodriguez, C. E., Niño, L. E., & Pulido, N. J. (2020). Indicadores de bioquímica sanguínea y perfil hormonal en vacas suplementadas con Trébol rojo (*Trifolium pratense*). *Revista Lasallista de Investigación*, 17(2), 77–87. <https://doi.org/10.22507/rli.v17n2a6>



- Rutigliano, G., & Zucchi, R. (2017). Cardiac actions of thyroid hormone metabolites. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 458, 76–81.
<https://doi.org/10.1016/J.MCE.2017.01.003>
- Scott- Moncrieff, J. (2012). Thyroid disorders in the geriatric veterinary patient. *The Veterinary Clinics of North America*, 42(4), 25–707.
- SENAMHI. (2021). *Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú*.
- Tsibulnikov, S., Maslov, L., Voronkov, N., & Oeltgen, P. (2020). Thyroid hormones and the mechanisms of adaptation to cold. *Hormones*, 19, 329–339.
<https://doi.org/10.1007/s42000-020-00200-2>
- Zeder, M. A. (2006). Central questions in the domestication of plants and animals. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 15(3), 105–117.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/evan.20101>

ANEXOS

ANEXO 1: Análisis de la varianza para niveles de hormona triyodotironina (T_3) (nmol/L) en alpacas Huacaya de diferente sexo y edad.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	3	14.898	4.966	146.142	< 0.0001
CLASE	2	14.894	7.447	219.165	< 0.0001
SEXO	1	0.003	0.003	0.097	0.757
Error	56	1.903	0.034		
Total	59	16.800			

ANEXO 2: Prueba de rango múltiple de Tukey para niveles de hormona triyodotironina (T_3) (nmol/L) en alpacas Huacaya de diferente edad.

Categoría	Medias LS	Error estándar	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)	Grupos
Tui	1.618	0.041	1.535	1.700	A
Cría	1.228	0.041	1.146	1.311	B
Adulto	0.421	0.041	0.339	0.504	C

ANEXO 3: Prueba de rango múltiple de Tukey para niveles de hormona triyodotironina (T_3) (nmol/L) en alpacas Huacaya de diferente sexo.

Categoría	Medias LS	Error estándar	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)	Grupos
Hembra	1.097	0.034	1.029	1.164	A
Macho	1.082	0.034	1.014	1.149	A

ANEXO 4: Análisis de la varianza para niveles de hormona tetrayodotironina (T_4) (nmol/L) en alpacas Huacaya de diferente sexo y edad.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	Pr > F
Modelo	3	7112.362	2370.787	13.116	< 0.0001
CLASE	2	7059.703	3529.851	19.529	< 0.0001
SEXO	1	52.659	52.659	0.291	0.592
Error	56	10121.930	180.749		
Total	59	17234.293			

ANEXO 5: Prueba de rango múltiple de Tukey para niveles de hormona tetrayodotironina (T_4) (nmol/L) en alpacas Huacaya de diferente edad.

Categoría	Medias LS	Error estándar	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)	Grupos
Cría	124.098	3.006	118.076	130.120	A
Adulto	110.877	3.006	104.854	116.899	B
Tui	97.528	3.006	91.506	103.550	C

ANEXO 6: Prueba de rango múltiple de Tukey para niveles de hormona tetrayodotironina (T_4) (nmol/L) en alpacas Huacaya de diferente sexo.

Categoría	Medias LS	Error estándar	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)	Grupos
Macho	111.771	2.455	106.854	116.688	A
Hembra	109.897	2.455	104.980	114.814	A

ANEXO 7: Identificación de predio (alpacas hembra) y personal de apoyo para la recolección de muestras sanguíneas.



ANEXO 8: Colecta de muestra sanguínea método venopunción por la vena yugular en tuis hembras.



ANEXO 9: Colecta de muestra sanguínea método venopunción por la vena yugular en tuis machos



ANEXO 10: Colecta de muestra sanguínea método venopunción por la vena yugular en hembras adultas.



ANEXO 11: Colecta de muestra sanguínea método venopunción por la vena yugular de crías hembras y machos.



ANEXO 12: Colecta de muestra sanguínea método venopunción por la vena yugular de machos adultos.



ANEXO 13: Muestras sanguíneas en tubos vacutaener rotulados en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia



ANEXO 14: Centrifugación de muestras sanguíneas para posteriormente llevarlas a congelación.



ANEXO 15: Sistemas de prueba AccuBind ® USA de T₃ (código 125-300) y T₄ (código 225-300)



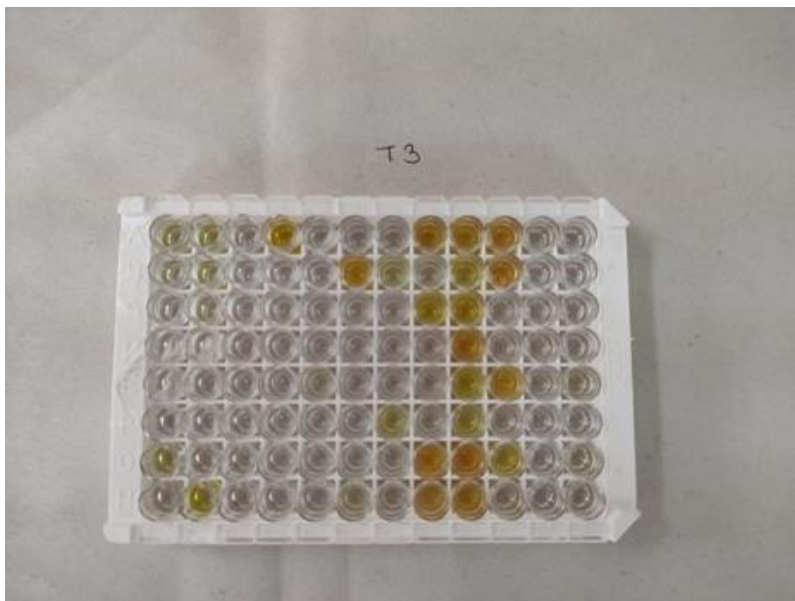
ANEXO 16: Procedimiento de prueba de T₃ en el laboratorio de Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, pipeteo de 0.005 ml de suero de referencia control dentro del pozo designado en la microplaca.



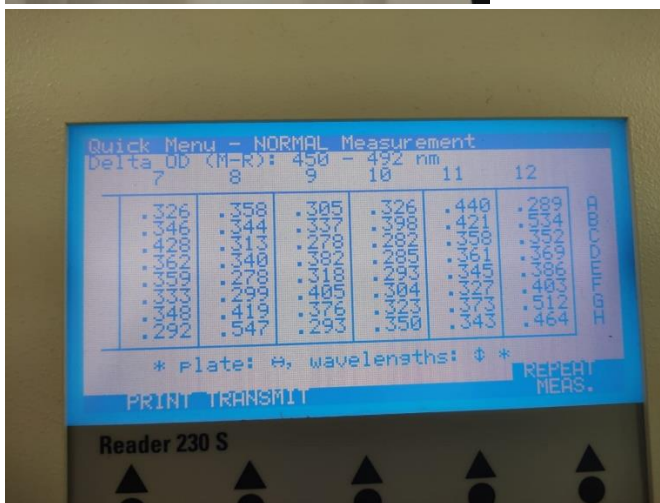
ANEXO 17: Procedimiento de prueba de T_3 , adición de sustrato de trabajo a todos los pozos de la microplaca.



ANEXO 18: Microplaca de T_3 , luego de adicionar la solución de parada en cada pozo lista para la lectura de absorbancia.



ANEXO 19: Lectura de las absorbancias de la microplaca de T₃ en ELISA



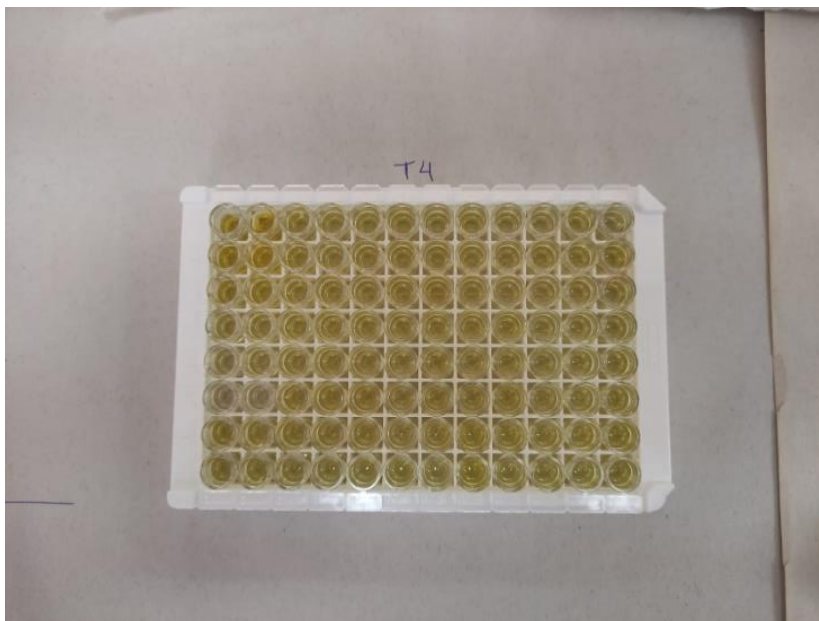
ANEXO 20: Procedimiento de prueba de T₄ en el laboratorio de Patología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, pipeteo de 0.005 ml de suero de referencia control dentro del pozo designado en la microplaca.



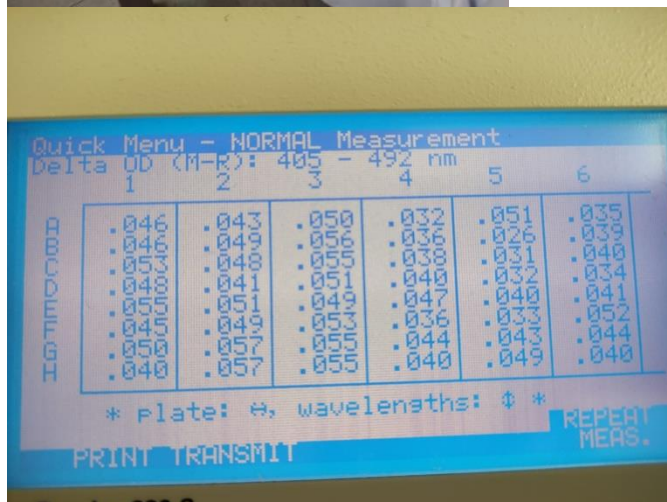
ANEXO 21: Procedimiento de prueba T₄, adición de sustrato de 350 μ l de buffer de lavado, se repitió dos veces adicionales, haciendo un total de tres lavados.



ANEXO 22: Microplaca de T₄, luego de adicionar la solución de parada en cada pozo lista para la lectura de absorbancia.



ANEXO 23: Lectura de las absorbancias de la microplaca de T₄ en ELISA



ANEXO 24: Determinación de los parámetros de T₃ expresados en nmol/L, tabla de análisis de varianza.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T ₃	60	0,89	0,88	16,87



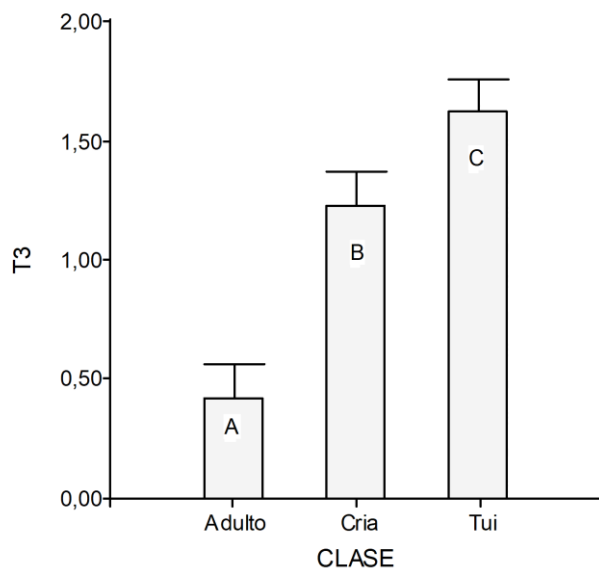
ANEXO 25: Tabla de Análisis de Varianza (SC tipo III) de T₃

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	14,93	3	4,98	147,40	<0,0001
CLASE	14,93	2	7,46	221,06	<0,0001
SEXO	2,9E-03	1	2,9E-03	0,09	0,7690
Error	1,89	56	0,03		
Total	16,82	59			

ANEXO 26: Test: Tukey determinación de T_3 en función a edad (Alfa=0,05, DMS=0,13990, error: 0,0338 y gl:56)

CLASE	Medias	n	E.E.	
Adulto	0,42	20	0,04	A
Cria	1,23	20	0,04	B
Tui	1,62	20	0,04	C

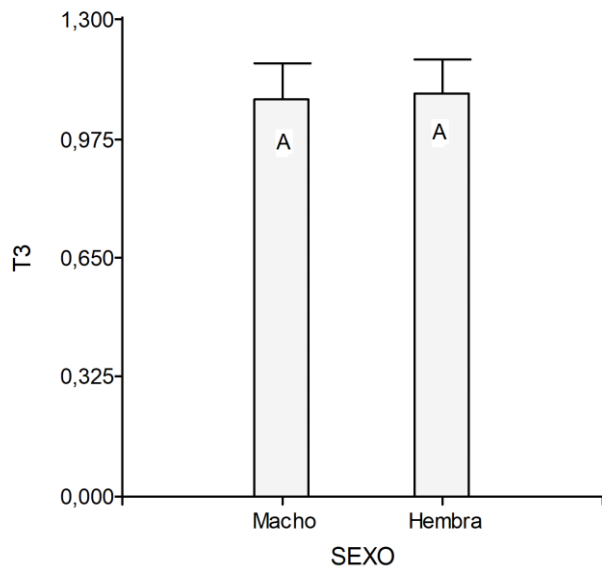
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



ANEXO 27: Test: Tukey determinación de T_3 en función a sexo (alfa=0,05, DMS: 0,09505, error: 0,0338 y gl:56)

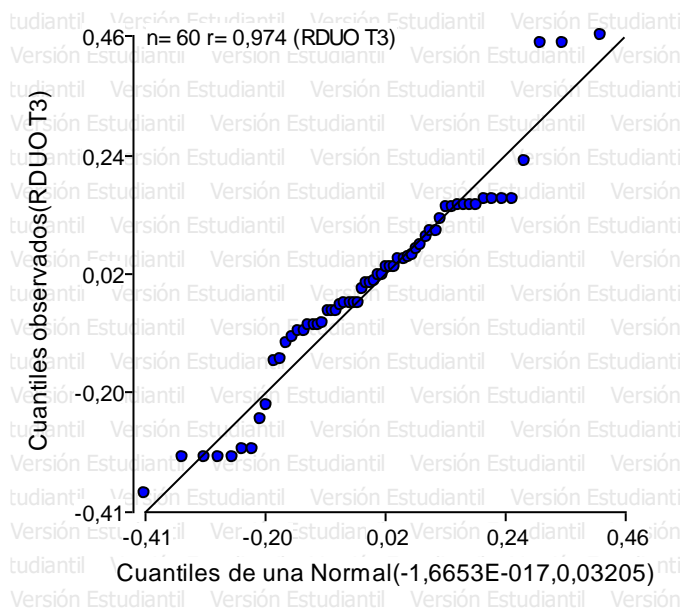
SEXO	Medias	n	E.E.	
Macho	1,08	30	0,03	A
Hembra	1,10	30	0,03	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



ANEXO 28: Supuestos de normalidad de T₃, Shapiro – Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO T ₃	60	0,00	0,18	0,94	0,0247

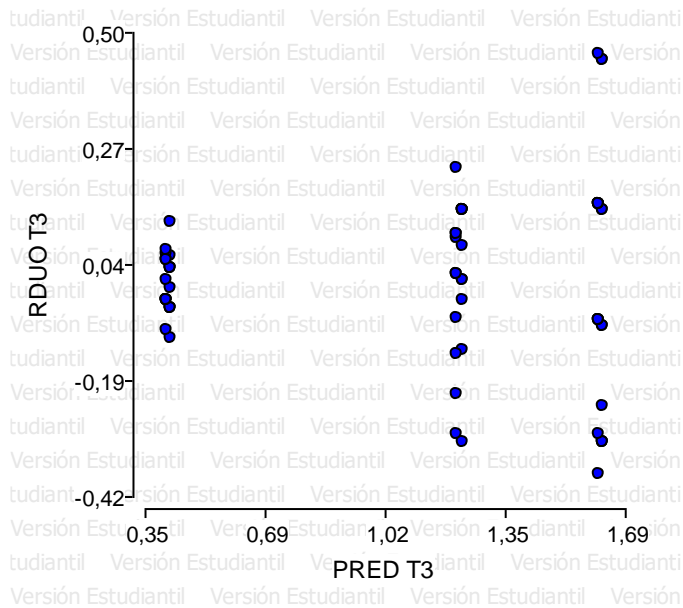


ANEXO 29: Análisis de varianza: homogeneidad de varianza (Prueba de Levene) para T₃

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS T ₃	60	0,90	0,85	34,83

ANEXO 30: Cuadro de Análisis de Varianza (SC tipo III) para T₃

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,76	21	0,04	16,92	<0,0001
T₃	0,76	21	0,04	16,92	<0,0001
Error	0,08	38	2,1E-03		
Total	0,84	59			



ANEXO 31: Estadísticos descriptivos de T₃, medidas resumen en función a la edad

CLASE	Variable	n	Media	E.E.	CV	Mín.	Máx.
Adulto	T ₃	20	0,42	0,01	13,98	0,32	0,55
Cría	T ₃	20	1,23	0,03	12,66	0,92	1,45
Tui	T ₃	20	1,62	0,06	16,58	1,23	2,07

ANEXO 32: Estadísticos descriptivos de T₃, medidas resumen en función al sexo

SEXO	Variable	n	Media	E.E.	CV	Mín.	Máx.
Hembra	T ₃	30	1,10	0,10	48,97	0,32	2,07
Macho	T ₃	30	1,08	0,10	49,91	0,32	2,07

ANEXO 33: Estadísticos descriptivos de T_3 , medidas resumen en función a la edad con los valores mínimos y máximos.

CLASE	SEXO	Variable	n	Media	E.E.	CV	Mín.	Máx.
Adulto	Hembra	T_3	10	0,43	0,02	15,40	0,32	0,55
Adulto	Macho	T_3	10	0,41	0,02	12,81	0,32	0,48
Cría	Hembra	T_3	10	1,25	0,05	12,05	0,92	1,38
Cría	Macho	T_3	10	1,20	0,05	13,63	0,92	1,45
Tui	Hembra	T_3	10	1,61	0,09	18,63	1,31	2,07
Tui	Macho	T_3	10	1,63	0,08	15,28	1,23	2,07

ANEXO 34: Determinación de los parámetros de T_4 expresados en nmol/l, análisis de varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T_4	60	0,41	0,38	12,13

ANEXO 35: Cuadro de Análisis de Varianza (SC tipo III) de T_4

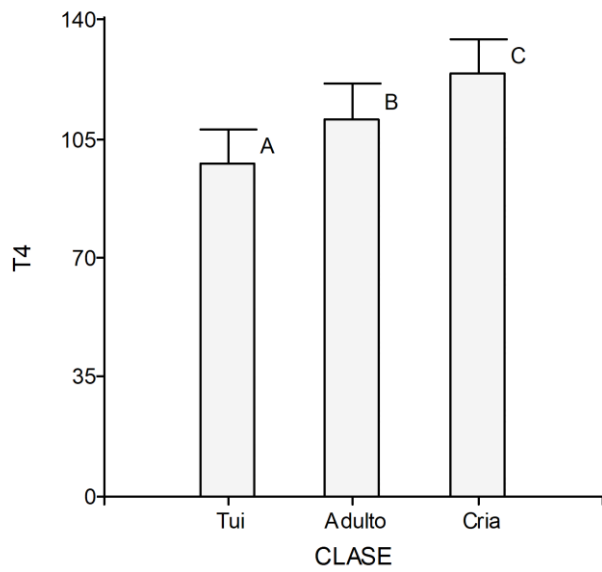
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7114,24	3	2371,41	13,12	<0,0001
CLASE	7062,35	2	3531,18	19,53	<0,0001
SEXO	51,89	1	51,89	0,29	0,5942
Error	10123,40	56	180,77		
Total	17237,64	59			

ANEXO 36: Test: Tukey determinación de T_4 en función a edad (alfa=0,05, DMS:

10,23639, error: 180,7749 y gl:56)

CLASE	Medias	n	E.E.	
Tui	97,53	20	3,01	A
Adulto	110,88	20	3,01	B
Cría	124,11	20	3,01	C

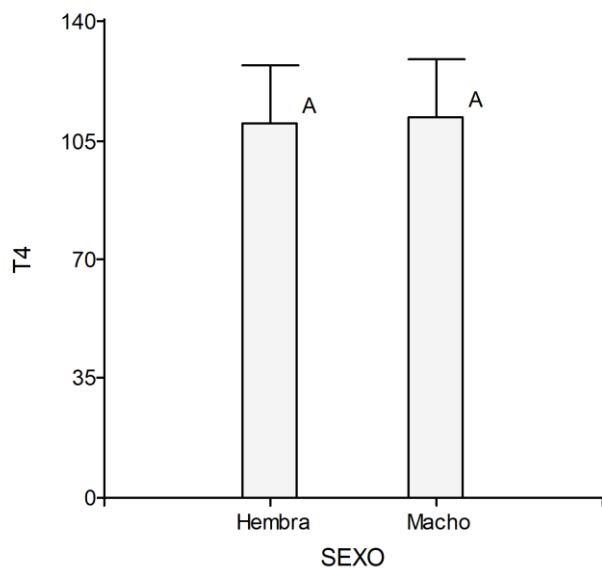
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



ANEXO 37: Test: Tukey determinación de T₄ en función a sexo (alfa=0,05, DMS: 6,95435, error: 180,7749 y gl:56)

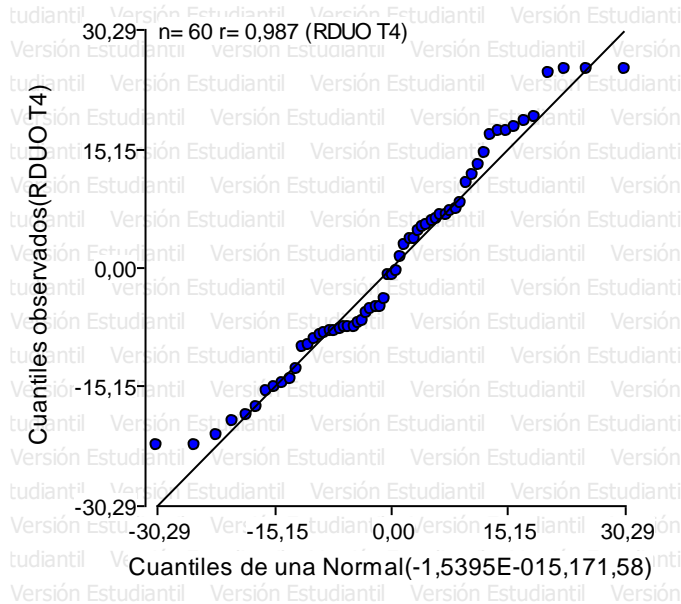
SEXO	Medias	n	E.E.	
Hembra	109,91	30	2,45	A
Macho	111,77	30	2,45	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)



ANEXO 38: Supuestos de normalidad de T₄, Shapiro – Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO T ₄	60	0,00	13,10	0,94	0,0199

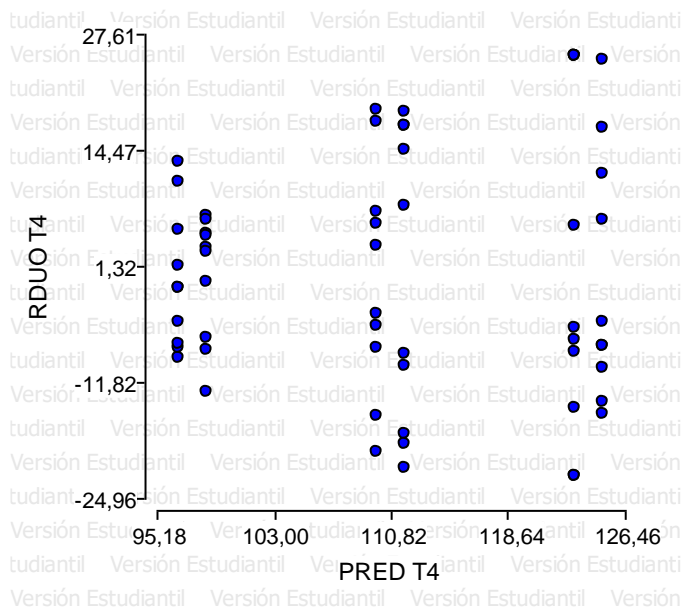


ANEXO 39: Análisis de varianza: homogeneidad de varianza (Prueba de Levene) para T₄

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS T ₄	60	0,91	0,75	31,49

ANEXO 40: Cuadro de Análisis de Varianza (SC tipo III) para T₄

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2563,58	38	67,46	5,59	<0,0001
T4	2563,58	38	67,46	5,59	<0,0001
Error	253,54	21	12,07		
Total	2817,12	59			



ANEXO 41: Estadísticos descriptivos de T₄, medidas resumen en función a la edad

Clase	Variable	n	Media	E.E.	CV	Mín.	Máx.
Adulto	T ₄	20	110,88	3,27	13,19	90,30	130,50
Cría	T ₄	20	124,11	3,66	13,20	100,60	149,60
Tui	T ₄	20	97,53	1,63	7,48	85,60	109,70

ANEXO 42: Estadísticos descriptivos de T₄, medidas resumen en función al sexo

Sexo	Variable	n	Media	E.E.	CV	Mín.	Máx.
Hembra	T ₄	30	109,91	3,21	16,02	87,40	148,40
Macho	T ₄	30	111,77	3,07	15,04	85,60	149,60

ANEXO 43: Estadísticos descriptivos de T₄, medidas resumen en función a la edad con los valores mínimos y máximos.

Clase	Sexo	Variable	n	Media	E.E.	CV	Mín.	Máx.
Adulto	Hembra	T ₄	10	110,04	4,12	11,85	90,30	129,00
Adulto	Macho	T ₄	10	111,71	5,29	14,98	90,30	130,50
Cría	Hembra	T ₄	10	123,21	6,09	15,62	100,60	148,40
Cría	Macho	T ₄	10	125,00	4,41	11,15	109,70	149,60
Tui	Hembra	T ₄	10	96,47	2,47	8,11	87,40	109,70
Tui	Macho	T ₄	10	98,59	2,21	7,09	85,60	105,50

ANEXO 44: Protocolo del sistema de prueba para T3



**Total Triiodothyronine (T3)
Test System
Product Code: 125-300**

1.0 INTRODUCTION

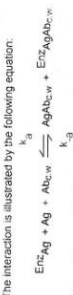
Intended Use: The Quantitative Determination of Total Triiodothyronine (T3) in Human Serum or Plasma by a Microplate Enzyme Immunoassay

2.0 SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Measurement of serum triiodothyronine concentration is generally regarded as a valuable tool in the diagnosis of thyroid dysfunction. This importance has provided the impetus for a significant improvement in assay methodology that has occurred in the last two decades. The advent of monospecific antihuman T3 antibody reagents, the development of sensitive and specific radioimmunoassays (1, 2), and the development of enzyme immunoassays (EIA) have enabled the development of procedures that are both accurate and sensitive. This microplate enzyme immunoassay methodology provides the technician with optimum sensitivity while requiring few technical skills. The assay is performed by the addition of a patient specimen or control is first added to a microplate well. Enzyme-T3 conjugate is added, and then the reactants are mixed. A competition reaction results between the enzyme conjugate and the patient specimen for a limited number of antibody combining sites. After the completion of the required incubation period, the antibody bound T3-enzyme conjugate is separated from the unbound T3-enzyme conjugate by aspiration or decantation. The remaining unbound T3-enzyme conjugate of the well is quantitated by reaction with a suitable substrate. The amount of triiodothyronine concentration permits construction of a graph of activity and concentration. From comparison to the dose response curve, the unknown specimen's activity can be correlated with T3 concentration.

3.0 PRINCIPLE

Competitive Enzyme Immunoassay (TYPE 5): The reagents required for a solid phase enzyme immunoassay include: (1) substrate antibody, enzyme-enzyme conjugate and native antigen. Upon mixing immobilized antibody, enzyme-enzyme conjugate and a serum containing the native antigen, a competition reaction occurs between the native antigen and the enzyme-enzyme conjugate for a limited number of immobilized binding sites. The interaction is illustrated by the following equation:



$AgAb_{w,v}$ = Antigen-Antibody Complex
 $EnzAgAb_{w,v}$ = Enzyme-antigen Conjugate-Antibody Complex
 K_a = Rate Constant of Association
 K_d = Rate Constant of Dissociation
 $K = k_{-1} / k_1$ = Equilibrium Constant

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by decantation or aspiration. The enzyme activity in the antibody-bound fraction is inversely proportional to the native antigen concentration. By utilizing a standard curve, a dose response curve can be generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

4.0 REAGENTS

Materials Provided:

- Human Serum References - 1ml/vial - Icons A-F concentrations of 0 (A), 0.5 (B), 1.0 (C), 2.5 (D), 5.0 (E) and 10.0 (F) ng/ml. Store at 2-8°C. A preservative has been added. For 60 units, ng/ml x 1.08 = ng/dL.
- T3 Enzyme Reagent - 1.0ml/vial - Icon (B) (HPP) conjugate in an albumin stabilizing matrix. A preservative has been added. Store at 2-8°C.
- T3/T4 Conjugate Buffer - 13ml - Icon (B) One (1) bottle, reagent containing buffer, red dye, preservative, and binding protein inhibitors. Store at 2-8°C.
- T3 Antibody Coated Plate - 96 wells - Icon (B) One 96-well microplate coated with Sheep anti-T3 serum stored in an aluminum bag with a drying agent. Store at 2-8°C.
- Wash Solution Concentrate - 20ml - Icon (B) One 20ml bottle containing wash solution and saline. A preservative has been added. Store at 2-8°C.
- Substrate A - 7 ml/vial - Icon (B) One (1) bottle containing tetramethylbenzidine (TMB) in buffer. Store at 2-8°C.
- Substrate B - 7 ml/vial - Icon (B) One (1) bottle containing hydrogen peroxide (H₂O₂) in buffer. Store at 2-8°C.
- Stop Solution - 6ml/vial - Icon (B) One (1) bottle of stop solution containing a strong acid (1N HCl). Store at 2-30°C.
- Product Instructions.

Note 1: Do not use reagents beyond the kit expiration date.
Note 2: Opened reagents are stable for sixty (60) days when stored at 2-8°C. Opened reagents are stable for sixty (60) days when stored at 2-8°C. Kit and component stability information is provided in the product insert.
Note 3: Above reagents are for a single 96-well microplate.

1. **Materials Required But Not Provided:**
 1. Pipettes capable of delivering 50µl volumes with a precision of ±0.1 µl.
 2. Dispensers (or repetitive deliveries of 0.100ml and 0.350ml volumes with a precision of better than 1.5%.
 3. Adjustable volume (20-200µl) and (200-1000µl) dispensers (A, M, or M2).
 4. Microplate reader with 450nm and 520nm wavelength absorbance capability.
 5. Microplate Reader with 450nm and 520nm wavelength absorbance capability.
 6. Test tubes for preparation of enzyme conjugate and substrate.
 7. Absorbent Paper for blotting the microplate wells.
 8. Plastic wrap or microplate cover for incubation steps.
 9. Vacuum aspirator (optional) for wash steps.
 10. Timer.
 11. Quality control materials.

5.0 PRECAUTIONS

For In Vitro Diagnostic Use
Not for Internal or External Use in Humans or Animals

All products that contain human serum have been found to be infectious. The following information is provided for your information. Antibodies by FDA required tests. Since no known test can offer serum assurance that infectious agents are absent, all human serum products should be handled as potentially hazardous and appropriate precautions should be taken. Good laboratory procedures for handling of transmitting diseases. Good laboratory procedures for handling of infectious agents. For more information, contact the Center for Disease Control / National Institute of Health, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2nd Edition, 1988, HHS Publication No. (CDC) 98-8395.

Safe disposal of kit components must be according to local regulatory and statutory requirement.

6.0 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

The specimens shall be blood serum or plasma in type and the usual precautions in the collection of venipuncture samples should be observed. For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained. The blood should be collected in a plain red-top tube. The serum should be separated by centrifugation (1000 rpm) and the blood to clot for serum samples. Centrifuge the specimen to separate the serum or plasma from the cells.

Samples may be refrigerated at 2-8°C for a maximum period of five (5) days. If the specimens cannot be assayed within this time, the sample(s) may be stored at temperatures of -20°C for up to 30 days. Avoid use of contaminated devices. Avoid repeated freezing and thawing. When assayed in duplicate, 0.100ml of the specimen is required.

7.0 QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay external controls at levels in the range of the unknowns. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the trends of the supplied reagents. Permanent statistical records should be maintained for each assay. The laboratory should set acceptable assay performance limits in addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance limits should be investigated. Possible causes include degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8.0 REAGENT PREPARATION

1. **Working Reagent A - T3-enzyme Conjugate Solution**
 Dilute the T3-enzyme conjugate 1:11 in T3/T4 conjugate buffer in a suitable container. For example, dilute 100µl of conjugate with 1.0ml of buffer for 16 wells (A eight excess of solution is made). This reagent should be used within twenty-four hours for maximum performance of the assay. Store at 2-8°C.
General Formula:
 Amount of Buffer required = Number of wells × 0.1
 Quantity of T3-enzyme conjugate necessary = # of wells × 0.01
 ie = 16 × 0.1 = 1.6ml for Total T3/T4 Conjugate
 Buffer: 16 × 0.01 = 0.16ml (160µl) for T3 enzyme conjugate
2. **Wash Buffers**
 Dilute contents of wash concentrate to 1000ml with distilled or deionized water in a suitable storage container. Store diluted wash buffer at 2-30°C for up to 60 days.
3. **Microplate Reader**
 Pour the contents of the amber, well labeled Solution A into the clear well labeled Solution B. Place the yellow cap on the clear well for easy identification. Mix and label accordingly. Store at 2 - 8°C.

Note 1: Do not use the working substrate if it looks blue.
Note 2: Do not use reagents that are contaminated or have bacterial growth.

9.0 TEST PROCEDURE

Before proceeding with the assay, bring all reagents, serum references and controls to room temperature (20 - 27°C).
****Test Procedure should be performed by a skilled individual or trained professional****

1. Format the microplates' wells for each serum reference, control and patient specimen to be assayed in duplicate. Replace any unused microwell strips back into the original bag and store at 2-8°C.
2. Prepare 0.050ml (50 µl) of serum reference, control or specimen into the assigned well.
3. Add 0.100 ml (100µl) of Working Reagent A, T3 Enzyme conjugate to all wells (see Reagent Preparation Section).
4. Cover the microplate gently for 20-30 seconds to mix and incubate 60 minutes at room temperature.
5. Discard the contents of the microplate by decantation or aspiration. If decanting, blot the plate dry with absorbent paper.
6. Add 350µl of wash buffer (see Reagent Preparation Section) decant (top and blot) or aspirate. Repeat two (2) additional times for a total of three (3) washes. An automatic or manual plate washer can be used. Follow the manufacturer's instructions.
7. Add 50µl of substrate A to each well. A squeeze bottle is employed, fill each well by depressing the container (avoiding air bubbles) to dispense the wash. Decant the wash and repeat two (2) additional times.
8. Add 0.100 ml (100µl) of working substrate solution to all wells (see Reagent Preparation Section). The reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells.
9. Do NOT SHAKE THE PLATE AFTER SUBSTRATE ADDITION.
10. Incubate at room temperature for fifteen (15) minutes.
11. Add 0.050ml (50µl) of stop solution to each well and gently mix for 15-20 seconds. Always add reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells.
12. Read the absorbance in each well at 450nm (using a reference wavelength of 620-630nm) to minimize well imperfections) in a microplate reader. The results should be read within thirty (30) minutes of adding the stop solution.

Note: For re-assaying specimens with concentrations greater than 7.5ng/ml, pipette 25µl of the specimen and 25µl of the 0 serum reference into the sample well (this maintains a 1:1 dilution). The reagent should be readout value by 2 to obtain the triiodothyronine concentration.

10.0 CALCULATION OF RESULTS

1. **A dose response curve is used to ascertain the concentration of triiodothyronine in unknown.**
2. Record the absorbance obtained from the printout of the microplate reader as outlined in Example 1.
3. Plot the absorbance for each duplicate serum reference against the corresponding concentration in ng/ml on linear graph paper (do not average the duplicates of the serum references before plotting).
4. To determine the concentration of T3 for an unknown, draw the best-fit curve through the plotted points. The concentration of T3 for an unknown, unknown on the vertical axis (Y-axis) of the graph, find the intersecting point on the curve, and read the concentration (in ng/ml) from the horizontal axis (X-axis) of the graph (the duplicate of the unknown may be averaged as indicated). The concentration of T3 for an unknown, unknown intersects the dose response curve at 1.95ng/ml T3 concentration (See Figure 1).

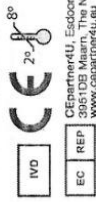
Note: Computer data reduction software designed for ELISA software is utilized. The validation of the software should be ascertained.

- Young D.S., Pestiner L.C. and Gilberman U., "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", *Clinical Chemistry* 21, 3660 (1975).
- Stirling L., "Diagnosis and Treatment of Thyroid Disease", *Endocrinology* 10, 119 (1950).
- Bowman J.E., "The use of radioimmunoassay in patients with thyrotoxicosis", *Clin Chem* 42, 176-179 (1996).
- Brayman L.E., Ugeux R.D., Eds. *Worror and Ingbar's "The Thyroid - A Fundamental and Clinical Text"*, 7th Ed. Philadelphia, Lippincott-Raven (1998).
- Comaru L., Papan U., Lucu-Mensia, C. et al., "An automated radioimmunoassay for thyroxine in serum", *Clin Chem* 37, 461 (1991).
- Chopra I.J., "Radioimmunoassay of thyroxines-Handbook of Radioimmunoassay", G.E. Abraham Ed New York, Marcel Dekker, Inc. (1977).
- Kowach D., Davis G., Sockel C., "Development of total triiodothyronine enzyme immunoassay in microtiter plate format", *Clin Chem* 37, 1029 (1991).
- Papavasiliou-Dimitradou A., Kibazian M., "Total T3 (triiodothyronine) measurement in serum by time resolved fluorescence immunoassay", *Clin Chem* 37, 1029 (1991).

Revision: 3 Date: 05/11/2 DCO: 0640
Cat #: 125-300

Reagent (ml)	1 (ml)	2 (ml)	3 (ml)	4 (ml)	5 (ml)	6 (ml)	7 (ml)	8 (ml)	9 (ml)	10 (ml)
A)	1 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)
B)	1 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)
C)	1 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)
D)	1 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)
E)	1 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)
F)	1 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)
G)	1 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)
H)	1 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)	2 (1.5ml)

For Orders and Inquiries, please contact
Monobind Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630 USA
Tel: 1-949-951-2865 Email: info@monobind.com
Fax: 1-949-951-5839 Web: www.monobind.com
Please visit our website to learn more about our other interesting products and services.



14.0 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

14.1 Precision

The within and between assay precisions of the T3 AccuBind™ ELISA test system were determined by analyzing on three different levels of total triiodothyronine (T3) in human serum. The coefficient of variation (CV) for each of these control sera are presented in Table 2 and Table 3.

TABLE 2
Within Assay Precision (Values in ng/ml)

Sample	N	X	σ	C.V.
Low	16	0.78	0.06	7.9%
Normal	16	1.92	0.10	5.4%
High	16	3.35	0.14	3.9%

TABLE 3
Between Assay Precision (Values in ng/ml)

Sample	N	X	σ	C.V.
Low	10	0.76	0.07	8.9%
Normal	10	1.85	0.13	6.7%
High	10	3.43	0.16	4.5%

*As measured in ten experiments in duplicate over a ten day period.

14.2 Sensitivity

The T3 AccuBind™ ELISA test system has a sensitivity of 0.04 ng/ml. The sensitivity was ascertained by determining the variability of the 0 ng/ml serum calibrator and using the 2σ (95% certainty) statistic to calculate the minimum dose.

14.3 Accuracy

The T3 AccuBind™ ELISA method was compared with a reference radioimmunoassay method. Biological Specimens were from hypothyroid, euthyroid and hyperthyroid populations were used. The values ranged from 0.15 ng/ml – 8.0 ng/ml. The total number of such specimens was 120. The least square regression equation (y = mx+b) and the correlation coefficient were computed for the T3 AccuBind™ ELISA method in comparison with the reference method. The data obtained is displayed in Table 4.

TABLE 4
Least Square Regression

Method	Mean	Least Square Regression	Correlation Coefficient
This	1.62	y = 3.8 + 0.947(x)	0.997
Reference	1.68		

Only slight amounts of bias between this method and the reference method are indicated by the closeness of the mean values. The least square regression equation and correlation coefficient indicates excellent method agreement.

14.4 Specificity

The specificity of the triiodothyronine antibody to selected substances was evaluated by adding the interfering substance to a serum matrix at various concentrations. The cross-reactivity was calculated by deriving a ratio between dose of interfering substance to dose of triiodothyronine needed to displace the same amount of conjugate.

TABLE 5
Cross Reactivity

Substance	Cross Reactivity	Concentration
L-Triiodothyronine	1.0000	n
L-Thyroxine	< 0.0002	10µg/ml
Iodothyrosine	< 0.0001	10µg/ml
Diiodothyrosine	< 0.0001	10µg/ml
Phenylbutazone	< 0.0001	10µg/ml
Sodium Salicylate	< 0.0001	10µg/ml

15.0 REFERENCES

- Ghate H., Ryan R.J., Mayberry W.E. & Hockett T., "Radioimmunoassay for Triiodothyronine (T3): Affinity and Specificity of Antibody for T3", *J. Clinical Endocrinol.* 33, 509 (1971).
- L.J. Ho, R.S. & Lam R., "An improved radioimmunoassay of triiodothyronine in human serum", *J. Lab. Clinical Med* 80, 729 (1971).

7. Failure to remove adhering solution adequately in the aspiration or decantation wash steps may result in poor replication and spurious results.

Use components from the same lot. No intermixing of components from different lots.

Use the same lot of reagents and calibrators.

Use the same lot of substrates and stop solutions.

Use the same lot of microtiter plates.

Use the same lot of pipette tips.

Use the same lot of wash buffer.

Use the same lot of calibrators.

Use the same lot of standards.

Use the same lot of reagents.

Use the same lot of substrates.

Use the same lot of stop solutions.

Use the same lot of microtiter plates.

Use the same lot of pipette tips.

Use the same lot of wash buffer.

Use the same lot of calibrators.

Use the same lot of standards.

Use the same lot of reagents.

Use the same lot of substrates.

Use the same lot of stop solutions.

Use the same lot of microtiter plates.

Use the same lot of pipette tips.

Use the same lot of wash buffer.

Use the same lot of calibrators.

Use the same lot of standards.

Use the same lot of reagents.

Use the same lot of substrates.

Use the same lot of stop solutions.

Use the same lot of microtiter plates.

Use the same lot of pipette tips.

Use the same lot of wash buffer.

Use the same lot of calibrators.

Use the same lot of standards.

Use the same lot of reagents.

Use the same lot of substrates.

Use the same lot of stop solutions.

Use the same lot of microtiter plates.

Use the same lot of pipette tips.

Use the same lot of wash buffer.

Use the same lot of calibrators.

Use the same lot of standards.

Use the same lot of reagents.

Use the same lot of substrates.

Use the same lot of stop solutions.

Use the same lot of microtiter plates.

Use the same lot of pipette tips.

Use the same lot of wash buffer.

Use the same lot of calibrators.

Use the same lot of standards.

Use the same lot of reagents.

Use the same lot of substrates.

Use the same lot of stop solutions.

Use the same lot of microtiter plates.

Use the same lot of pipette tips.

Use the same lot of wash buffer.

Use the same lot of calibrators.

Use the same lot of standards.

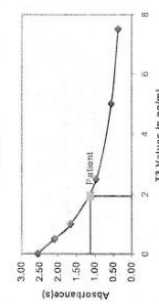
Use the same lot of reagents.

EXAMPLE 1

Sample I.D.	Well Number	Abs (A)	Mean Abs (B)	Value (ng/ml)
Cal A	A1	2.004	2.556	0
Cal B	B1	2.007	2.101	0.5
Cal C	C1	2.128	1.652	1.0
Cal D	E1	1.678	0.966	2.5
Cal E	G1	0.954	0.551	5.0
Cal F	A2	0.550	0.370	7.5
Cal G	C2	0.369	0.201	1.0
Cal H	E2	1.701	1.226	0.92
Cal I	G2	0.755	0.734	3.58
Cal J	H2	0.791	1.130	1.95
Cal K	A3	1.145	1.130	1.95
Cal L	B3	1.115	1.130	1.95

The data presented in Example 1 and Figure 1 are for illustration only and should not be used in lieu of a dose response curve prepared with each assay.

Figure 1



11.0 Q.C. PARAMETERS

In order for the assay results to be considered valid the following criteria should be met:

- The absorbance (OD) of calibrator 0 ng/ml should be > 1.3.
- Four out of six quality control pools should be within the established ranges.

12.0 RISK ANALYSIS

The MSDS and Risk Analysis Form for this product is available on request from Monobind Inc.

12.1 Assay Performance

- It is important that the time of reaction in each well is held constant to achieve reproducible results.
- Plates should not be opened beyond ten (10) minutes to avoid assay drift.
- Highly lipemic, hemolyzed or grossly contaminated specimens should not be used.
- If more than one (1) plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve on each plate as a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the stop solution. Therefore, the substrate and stop solution should be added in the same sequence to eliminate any time-deviation during reaction.
- Pipette reagents measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

ANEXO 45: Protocolo del sistema de prueba para T4



Monobind Inc.
Lake Forest, CA 92830, USA

AccuBind
ELISA Microwells

Total Thyroxine (T4) Test System

Product Code: 225-300

1.0 INTRODUCTION

Intended Use: The Quantitative Determination of Total Thyroxine Concentration in Human Serum or Plasma by a Microplate Enzyme Immunoassay

2.0 SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Measurement of serum thyroxine concentration is generally required for the diagnosis and management of thyroid disease. The thyroid gland secretes thyroxine, the most abundant thyroid hormone, which has a significant effect on the rate of metabolism. The concentration of thyroxine in the blood is maintained by a negative feedback mechanism. The thyroid gland secretes thyroxine, the most abundant thyroid hormone, which has a significant effect on the rate of metabolism. The concentration of thyroxine in the blood is maintained by a negative feedback mechanism.

This microplate enzyme immunoassay methodology provides the technician with optimum sensitivity while requiring few technical manipulations. In this method, serum reference, patient specimen, or control is first added to a microplate well. Enzyme-labeled thyroxine is then added to the well. A competition reaction results between the enzyme conjugate and the native thyroxine for a limited number of antibody combining sites immobilized on the well.

After the completion of the required incubation period, the unbound enzyme-thyroxine conjugate is separated by aspiration or decantation. The activity of the enzyme present on the surface of the well is quantitated by reaction with a suitable substrate to produce color.

The employment of several serum references of known thyroxine concentration permits construction of a graph of activity and concentration. From comparison to the dose response curve, an unknown specimen's activity can be correlated with thyroxine concentration.

3.0 PRINCIPLE

Competitive Immunoassay (TYPE 5)

The essential reagents required for a solid phase enzyme immunoassay are: enzyme-labeled antigen, antibody, enzyme-antigen conjugate and native antigen.

Upon mixing immobilized antibody, enzyme-antigen conjugate and a serum containing the native antigen, a competition reaction occurs between the enzyme-antigen conjugate and the native antigen for a limited number of antibody combining sites. The interaction is illustrated by the equation in the following below.

$$\text{Enz-Ag} + \text{Ag} + \text{Ab}_{\text{w}} \rightleftharpoons \text{AgAb}_{\text{w}} + \text{Enz-AgAb}_{\text{w}}$$

Note 2: Do not use reagents that are contaminated or have bacteria growth.

9.0 TEST PROCEDURE

Before proceeding with the assay, bring all reagents, serum and control to room temperature. Store at 2-8°C until ready to use. *Test Procedure should be performed by a skilled individual or trained professional*

- Form the microplate wells for each serum reference, control and specimen into the assigned well.
- Pipette 0.025 ml (25µl) of the appropriate serum reference, control or specimen into the assigned well.
- Wash the plate with 250µl of Wash Buffer. Repeat 3 times. Repeat to all wells (including Reference F, 20-30 seconds to mix and cover.
- Incubate 60 minutes at room temperature.
- Discard the contents of the microplate by decantation or aspiration. If decanting, blot the plate dry with absorbent paper.
- Add 350µl of wash buffer (see Reagent Preparation Section), decant (tap and blot) or aspirate. Repeat two (2) additional times for a total of three (3) washes. An automatic or manual aspirator may be used for this step. Refer to the manufacturer's instruction for proper usage of an aspirator.
- Employed, fill each well by depressing the container (avoiding air bubbles) to dispense the wash. Decant the wash and repeat two (2) additional times.
- Add 0.100 ml (100µl) of working substrate solution to all wells in the assay. Incubate 15 minutes at room temperature in the same order to minimize reaction time differences between wells.
- DO NOT SHAKE THE PLATE AFTER SUBSTRATE ADDITION. Incubate at room temperature for fifteen (15) minutes.
- Add 0.050ml (50µl) of stop solution to each well and gently mix for 15-20 seconds. Always add reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells.
- Read to minimize reaction time differences between wells. Refer to the manufacturer's instruction for proper usage of the microplate reader. The results should be read within thirty (30) minutes of adding the stop solution.

Note: For re-assaying specimens with concentrations greater than 25 µg/dl, pipet 1.5µl of the specimen and 12.5µl of the 0 protein concentration. Multiply the resultant value by 2 to obtain the thyroxine concentration.

10.0 CALCULATION OF RESULTS

A dose response curve is used to ascertain the concentration of thyroxine in unknown specimens.

- Record the absorbance obtained from the printout of the microplate reader as outlined in Example 1.
- Plot the absorbance (from the printout of the assay) versus the corresponding T4 concentration in µg/dl on linear graph paper (do not average the duplicates of the assay references before plotting).
- Connect the points with a best-fit curve.
- To determine the concentration of T4 for an unknown, locate the average absorbance of the duplicates for each unknown specimen on the curve and read the concentration (in µg/dl) from the horizontal axis of the graph (the duplicates of the unknown will be averaged as indicated). In the following example, the average absorbance (1.022) intersects the standard curve at (6 µg/dl) T4 concentration (See Figure 1).

Note: Computer data reduction software designed for ELISA assays may also be used for the data reduction. If such software is utilized, the validation of the software should be ascertained.

5.0 PRECAUTIONS

For In Vitro Diagnostic Use
Not for Internal or External Use in Humans or Animals

All products that contain human serum have been found to be capable of transmitting hepatitis B, hepatitis C, HIV, HTLV and other infectious agents. Serum and plasma are not to be used as reagents in assays. Antisera by EIA tested for antibodies to HIV, HTLV, hepatitis B, hepatitis C, and other infectious agents are absent. All human serum products should be handled as potentially hazardous and capable of transmitting disease. Good laboratory procedures for handling blood products can be found in the Centers for Disease Control and Prevention's "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 2nd Edition, 1988, HHS Publication No. (CDC) 88-3395.

Safe disposal of kit components must be according to local regulatory and statutory requirements.

6.0 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

The specimens shall be blood, serum or plasma in type and the usual precautions in the collection of venipuncture samples apply. The specimens shall be collected in a plain red-top or normal vacutainer. A fasting morning serum sample should be obtained. The blood should be collected in a plain red-top vacutainer tube without additives or anti-coagulants (for serum) or evacuated tubes containing EDTA or heparin. Allow the blood to clot for serum samples. Centrifuge the specimen to separate the serum or plasma from the cells.

Sample may be refrigerated at 2-8°C for a maximum period of five (5) days. If the specimen(s) cannot be assayed within this time, the sample(s) may be stored at temperatures of -20°C for up to 30 days. The sample(s) should be thawed at room temperature and re-assayed. When assayed in duplicate, 0.050ml of the specimen is required.

7.0 QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at levels in the hypothyroid, euthyroid and hyperthyroid range for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow trends and to detect changes in assay performance. The individual methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8.0 REAGENT PREPARATION

- Working Reagent A - T4 Enzyme Conjugate Solution**
Dilute the T4 enzyme conjugate 1:11 with Total T3/T4 conjugate buffer in a suitable container. For example, dilute 100µl of conjugate with 1.0ml of buffer for 16 wells (A slight excess of conjugate is made). This reagent should be used within twenty-four (24) hours for maximum performance of the assay. Store at 2-8°C.
- Wash Buffer**
Amount of Buffer required = Number of wells x 0.1
Quantity of T4 Enzyme necessary = # of wells x 0.01
i.e. = 16 x 0.1 = 1.6ml for Total T3/T4 conjugate buffer
Quantity of Buffer required = 16 wells x 0.1 = 1.6ml for T4 enzyme conjugate
Dilute contents of wash concentrate to 1000ml with distilled or deionized water in a suitable storage container. Store diluted buffer at 2-20°C for up to 60 days.
- Working Substrate Solution**
Dilute the substrate solution (A) into the clear vial labeled Substrate B. Place the yellow cap on the clear vial for easy identification. Mix and label accordingly. Store at 2 - 8°C.

Note 1: Do not use the working substrate # if it looks blue.

- Product Insert.**

Note 1: Do not use reagents beyond the kit expiration date. Reagents are stable for sixty (60) days when stored at 2-8°C. Kit and component stability are identified on the label.

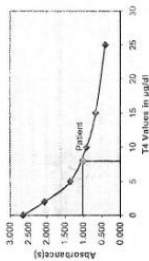
Note 3: Above reagents are for a 96-well microplate. For other kit configurations, see table at the end of this IU.

- Prepare a solution of 25µl & 90µl volumes with a precision of better than 1.5%.
- Dispenser(s) for repetitive deliveries of 0.100ml and 0.300ml volumes with a precision of better than 1.5%.
- Two pipette volumes (75-200µl) and (200-1000µl) dispenser(s).
- Microplate washer or a squeeze bottle (optional).
- Microplate Reader with 450nm and 630nm wavelength absorbance capability.
- Test tubes for preparation of enzyme conjugate.
- Plastic wrap or microplate cover for incubation steps.
- Vacuum aspirator (optional) for wash steps.
- Timer.
- Quality control materials.

Sample I.D.	Well Number	Abs (A)	Abs (B)	Mean Abs (B)	Value (µg/dl)
Cal A	A1	2.648	2.650	0	0
Cal B	B1	2.090	2.000	2	2
Cal C	C1	1.344	1.355	5	5
Cal D	D1	0.887	0.918	10	10
Cal E	E1	0.676	0.668	15	15
Cal F	F1	0.408	0.406	25	25
Ctrl 1	G1	1.425	1.435	4.6	4.6
Ctrl 2	H1	0.611	0.613	16.3	16.3
Patient	I1	0.964	1.022	8.0	8.0

EXAMPLE 1

Figure 1



The data presented in Example 1 and Figure 1 are for illustration only and should not be used in lieu of a standard curve prepared with each assay.

11.0 Q.C. PARAMETERS

In order for the assay results to be considered valid the following criteria should be met:

- The ratio of the absorbance of the sample to the absorbance of the calibrator should be ≥ 1.3 .
- The ratio of the absorbance of the sample to the absorbance of the quality control pools should be within the established ranges.

12.0 RISK ANALYSIS

The MSDS and Risk Analysis Form for this product is available on request from Monobind Inc.

12.1 Assay Performance

- It is important that the time of reaction in each well is held constant to achieve reproducible results.
- Reaction time should not extend beyond ten (10) minutes to avoid assay drift.
- Highly lipemic, hemolyzed or grossly contaminated specimen(s) should not be used.
- If more than one (1) plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve.
- The addition of substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the stop solution. Therefore, the substrate and stop solution should be added

- in the same sequence to eliminate any time-deviation during reaction.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- Failure to remove adhering solution adequately in the sample wells after each reading may result in poor replicability and spurious results.
- Use components from the same lot. No intermixing of reagents from different batches.
- Patient specimens with T4 concentrations greater than 35 µg/dl may be diluted 1/2 with the 0 serum reference into the 0 serum well. Refer to 12.5µl of the specimen and 12.5µl of the 0 serum reference in the sample well to maintain a uniform protein concentration. The samples concentration is diluted 1/2.
- Accurate and precise pipetting, as well as following the assay time and temperature requirements prescribed are essential. Any deviation from Monobind's IFU may yield inaccurate results.
- All applicable national standards, regulations and laws, including but not limited to good laboratory procedures, must be strictly followed to ensure compliance and proper device usage.
- Readers should be calibrated all the equipment (e.g. Pipettes, Reagents, Washers and/or the automated instruments used with this device, and to perform routine preventative maintenance.
- Risk Analysis-as required by CE Mark IVD Directive 98/79/EC - for this and other devices, made by Monobind, can be requested via email from Monobind@monobind.com.

12.2 Interpretation

- Measurements and interpretation of results must be performed by a certified laboratory.
- Laboratory results alone are not the sole basis for determining patient care and should not be used for determining therapy.
- For valid test results, adequate controls and other parameters must be within the listed ranges and assay requirements.
- If test kits are altered, such as by mixing parts of different kits, which could produce false results, or results are not reproducible, the test should be discarded.
- If computer controlled data reduction is used to interpret the results of the test, it is imperative that the predicted values for the calibrators fall within 10% of the assigned concentrations.
- Total serum thyroxine concentration is dependent upon a multiplicity of factors: thyroid gland function and its regulation, thyroxine binding globulin (TBG) concentration, and the binding of thyroxine to TBG (3, 4). Thus, total thyroxine concentration alone is not sufficient to assess clinical status. Total serum thyroxine values may be elevated under conditions such as pregnancy or administration of oral contraceptives. A T3 uptake test may be performed to estimate the relative TBG concentration in order to determine if the elevated T4 is caused by TBG variation.
- A decrease in total thyroxine values is found with protein-wasting diseases, certain liver diseases and nephrotic syndrome. Hypothyroidism or hyperthyroidism may affect total thyroxine values. Has been certified by the Journal of the American Association of Clinical Chemists. "NOT INTENDED FOR NEWBORN SCREENING."

13.0 EXPECTED RANGES OF VALUES

A study of euthyroid adult population was undertaken to determine expected values for the T4 Accubind™ ELISA Test System. The mean (X) values, standard deviations (σ) and expected ranges (±2 σ) are presented in Table 1.

TABLE 1
Expected Values for the T4 ELISA Test System (in µg/dl)

	Male	Female
Number of Specimens	42	50
Mean (X)	7.6	8.2
Std Dev (σ)	1.6	1.7
Expected Ranges (±2 σ)	4.4 – 10.8	4.9 – 11.6

*Normal patients with high TBG levels were not excluded except if pregnant.

It is important to keep in mind that establishment of a range of values which can be expected to be found by a given method for a particular analyte is dependent upon the nature of the analyte and factors: the specificity of the method, the population used and the precision of the method in the hands of the analyst. For these reasons each laboratory should depend upon the range of expected values established by the Manufacturer only until an in-house range can be determined by the analysts using the method with a population indigenous to the area in which the laboratory is located.

14.0 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

14.1 Precision
The within-assay precision of the T4 Accubind™ ELISA test system was determined by analysis on three different levels of pool control sera. The number (N), mean values (X), standard deviation (σ) and coefficient of variation (C.V.) for each of these control sera are presented in Table 2 and Table 3.

TABLE 2

Sample	Within Assay Precision (Values in µg/dl)			C.V. %
	N	X	σ	
Low	20	6.87	0.16	2.3
Normal	20	9.95	0.16	1.6
High	20	13.13	0.17	1.3

TABLE 3

Sample	Between Assay Precision (Values in µg/dl)			C.V. %
	N	X	σ	
Low	20	5.76	0.37	6.3
Normal	20	9.41	0.57	6.1
High	20	15.18	1.21	7.5

*As measured in ten experiments in duplicate over a ten day period.

14.2 Sensitivity

The T4 Accubind™ ELISA test system has a consistency of 3.2µg/dl. This is equivalent to a sample containing a concentration of 0.128 µg/dl. The sensitivity was ascertained by determining the variability of the 0 µg/dl serum calibrator and using the 2σ (95% certainty) statistic to calculate the minimum dose.

14.3 Accuracy

The T4 Accubind™ ELISA method was compared with a coated tube radioimmunoassay method. Biological specimens from hypothyroid, euthyroid and hyperthyroid populations were used (The values ranged from 0.8µg/dl – 25µg/dl). The total number of such specimens was 131. The least square regression equation and the correlation coefficient were computed for the T4 Accubind™ ELISA method in comparison with the reference method. The data obtained is displayed in Table 4.

TABLE 4

Method	Mean	Least Square Regression Analysis	Correlation Coefficient
This Method	8.07	$y = 0.99 + 0.95(x)$	0.934
Reference	8.06		

Only slight amounts of bias between this method and the reference method are indicated by the closeness of the mean values. The least square regression equation and correlation coefficient indicates excellent method agreement.

14.4 Specificity

The cross-reactivity of the thyroxine antibody to selected substances was determined by using a series of 10 µg/dl of a serum near to average concentrations. The cross-reactivity was calculated by deriving a ratio between dose of interfering substance to dose of thyroxine needed to displace the same amount of conjugate.

Substance	Cross Reactivity	Concentration
l-Thyroxine	1.0000	10,000
d-Thyroxine	0.9800	10,000

e-Triiodothyronine	0.0150	100µg/dl
l-Trilodothyronine	0.0300	100µg/dl
l-Thyroxine	0.0001	100µg/dl
Dioiodothyronine	0.0001	100µg/dl
Diiodothyronine	0.0001	100µg/dl

15.0 REFERENCES

- Banker SB, "Determination of Protein Bound Iodine", *Journal of Clinical Chemistry*, 173, 176 (1946).
- Chuska JJ, Soliman D.H, Ho R.S., "A Radioimmunoassay of Thyroxine", *J. Clinical Endocrinol.*, 33, 865 (1971).
- Young D.S., Postaner L.C., and Gilberman U., "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", *Clinical Chemistry*, 21, 3860 (1975).
- Stirling L., "Diagnosis and Treatment of Thyroid Disease", *Cleveland CRC Press* 19-51 (1975).
- Rice P, Farrar J, Bickett G, Toft A., "Assessment of thyroid status in elderly people", *British Med. Jour.* 307:1177-1178 (1988).
- Chuska JJ, "The many causes of subclinical hypothyroidism", *Thyroid* 6, 391-396 (1996).
- Chou FF, Wang PW, Huang SC, "Results of Subtotal Thyroidectomy for Graves disease", *Thyroid* 9, 255-256 (1999).
- Muzzaffari EL, Gharib H, "Thyroxine suppressive therapy in patients with nodular thyroid disease", *Ann Intern Med* 128, 386-394 (1998).
- Atwood EC, Seddon RM, Probert DE, "The T4/TBG ratio and the investigation of thyroid function", *Clin Biochem.* 11, 218 (1976).
- Isaac RM, Gottschalk ME et al., "Transient central hypothyroidism as a cause of failure to thrive in newborns and infants", *J. Endocrinology Invest.* 17, 631-637 (1994).

Revision: 4 Date: 2022-May-01 DCO: 1557
Cat #: 225-500

Reagent (ml)	1st set	2nd set	2nd set
A)	1ml set	1ml set	2ml set
B)	1 (1.5ml)	2 (1.6ml)	2 (6ml)
C)	1 (13ml)	2 (12ml)	1 (6ml)
D)	1 plate	5 plates	10 plates
E)	1 (20ml)	1 (20ml)	1 (60ml)
F)	1 (7ml)	2 (7ml)	1 (30ml)
G)	1 (7ml)	2 (7ml)	1 (30ml)
H)	1 (6ml)	2 (6ml)	2 (30ml)

For Orders and Inquiries, please contact

Monobind Inc.

100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92650 USA

Tel: +1 949.951.2665 Email: info@monobind.com
Fax: +1 949.951.3539 Web: www.monobind.com

Please visit our website to learn more about our other interesting products and services.



CEPARTNER4U, Esopcomlab 13,
3051DB Maastr, The Netherlands
www.cepartner4u.eu



ANEXO 46: Declaración jurada de autenticidad de tesis



Universidad Nacional
del Altiplano Puno



Vicerrectorado
de Investigación



Repositorio
Institucional

DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo ADELIS PUCHURTINTA IRCO,
identificado con DNI 77013732 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:

"VALORES DE REFERENCIA DE LAS CONCENTRACIONES MORTALES DE LAS
HORMONAS TIROIDEAS: TRIYODOTIROVINA (T3) Y TIROXINA (T4), EN ALACAS
(Vizcacha Pinos) DEL CENTRO EXPERIMENTAL "LA ROYA" DE LA UNA - PUNO "

Es un tema original.

Declaro que el presente trabajo de tesis es elaborado por mi persona y **no existe plagio/copia** de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por persona natural o jurídica alguna ante instituciones académicas, profesionales, de investigación o similares, en el país o en el extranjero.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no asumiré como tuyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o Internet.

Asimismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, así como de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a las disposiciones legales vigentes y a las sanciones correspondientes de igual forma me someto a las sanciones establecidas en las Directivas y otras normas internas, así como las que me alcancen del Código Civil y Normas Legales conexas por el incumplimiento del presente compromiso

Puno 25 de JUNIO del 2024


FIRMA (obligatoria)



Huella



ANEXO 47: Autorización para el depósito de tesis en Repositorio Institucional



Universidad Nacional
del Altiplano Puno



Vicerrectorado
de Investigación



Repositorio
Institucional

AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Por el presente documento, Yo ADELIS PUCHURTINTA IRCO,
identificado con DNI 77013732 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional, Programa de Segunda Especialidad, Programa de Maestría o Doctorado

MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

informo que he elaborado el/la Tesis o Trabajo de Investigación denominada:

"VALORES DE REFERENCIA DE LAS CONCENTRACIONES MORTALES DE LAS HORMONAS TIROIDEAS: TRIYODOTIRONINA (T3) Y TIROXINA (T4), EN ALPACAS (Vicuñas puros) DEL CENTRO EXPERIMENTAL "LA RAYA" DE LA UNA - PUNO "

para la obtención de Grado, Título Profesional o Segunda Especialidad.

Por medio del presente documento, afirmo y garantizo ser el legítimo, único y exclusivo titular de todos los derechos de propiedad intelectual sobre los documentos arriba mencionados, las obras, los contenidos, los productos y/o las creaciones en general (en adelante, los "Contenidos") que serán incluidos en el repositorio institucional de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

También, doy seguridad de que los contenidos entregados se encuentran libres de toda contraseña, restricción o medida tecnológica de protección, con la finalidad de permitir que se puedan leer, descargar, reproducir, distribuir, imprimir, buscar y enlazar los textos completos, sin limitación alguna.

Autorizo a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno a publicar los Contenidos en el Repositorio Institucional y, en consecuencia, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto, sobre la base de lo establecido en la Ley N° 30035, sus normas reglamentarias, modificatorias, sustitutorias y conexas, y de acuerdo con las políticas de acceso abierto que la Universidad aplique en relación con sus Repositorios Institucionales. Autorizo expresamente toda consulta y uso de los Contenidos, por parte de cualquier persona, por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales de autor y derechos conexos, a título gratuito y a nivel mundial.

En consecuencia, la Universidad tendrá la posibilidad de divulgar y difundir los Contenidos, de manera total o parcial, sin limitación alguna y sin derecho a pago de contraprestación, remuneración ni regalía alguna a favor mío, en los medios, canales y plataformas que la Universidad y/o el Estado de la República del Perú determinen, a nivel mundial, sin restricción geográfica alguna y de manera indefinida, pudiendo crear y/o extraer los metadatos sobre los Contenidos, e incluir los Contenidos en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

Autorizo que los Contenidos sean puestos a disposición del público a través de la siguiente licencia:

Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visita: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno 25 de JUNIO del 2024

FIRMA (obligatoria)



Huella