



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



**EFECTO DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES SOBRE LOS**  
**NIVELES DE CORTISOL EN ALPACAS SURI DEL CENTRO**  
**EXPERIMENTAL CHUQUIBAMBILLA**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**WILBERTH MARCELINO AJAHUANA FLORES**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**PUNO – PERÚ**

**2024**



## Wilberth Marcelino Ajahuana Flores

### EFECTO DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES SOBRE LOS NIVELES DE CORTISOL EN ALPACAS SURI DEL CENTRO EXP

 Universidad Nacional del Altiplano

#### Detalles del documento

Identificador de la entrega  
trn.cid::8254.414614520

82 Páginas

Fecha de entrega  
10 dic 2024, 9:16 a.m. GMT-5

15,053 Palabras

Fecha de descarga  
10 dic 2024, 9:20 a.m. GMT-5

84,601 Caracteres

Nombre de archivo  
TESIS FINAL WILBERTH MARCELINO.pdf

Tamaño de archivo  
2.0 MB





## 10% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

### Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 20 palabras)

### Fuentes principales

- 10% Fuentes de Internet
- 1% Publicaciones
- 4% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

### Marcas de integridad

#### N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

M<sup>o</sup>.<sup>a</sup>. MARÍA LINA CATALINA FLORES  
C.M.V.P. 6932  
UNA - PUNO

Domingo Ruelas Calloap  
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA  
C.M.V.P. 2021  
MAGISTER EN SALUD ANIMAL  
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD





## DEDICATORIA

*Dedico este trabajo de investigación a mis amados padres, Marcelino Ajahuana Porto y Francisca Flores Suxo, quienes con su amor, dedicación y sacrificio a lo largo de los años han sido la fuerza que me ha permitido llegar hasta aquí y cumplir un sueño tan deseado. Es un honor y un privilegio ser su hijo; no podría tener mejores padres.*

*A mis hermanas Edith y Catalina por siempre estar ahí en mis momentos felices y también de tristeza y en mi momento de logro y en mis momentos de fracaso y siempre alentándome seguir adelante.*

*Por último, quiero dedicar este trabajo a una persona muy especial, Haydee, quien ha estado a mi lado, ayudándome a crecer como persona, brindándome apoyo y siendo un constante respaldo durante esta etapa de mi vida, su apoyo incondicional ha sido mi guía en los momentos más difíciles.*

**Wilberth Marcelino Ajahuana Flores**



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar Al padre altísimo por permitirme estar aquí con vida, y a ver me permitido culminar este proyecto.

Agradezco a mi padre Marcelino y a mi madre Francisca a mis hermanas, lo que empiezas nunca lo dejes a la mitad sigue hasta terminar.

Agradezco a la Universidad Nacional del Altiplano a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia donde pase momentos gratos con mis compañeras y compañeros.

Agradezco a mi asesor de tesis Dra. Nubia Lilia Catacora Flores, por haberme ayudado en mi proyecto ya que sin su apoyo no hubiera sido posible concluir este trabajo de investigación.

Agradezco a mis jurados Ph. D. Bernardo Roque Huanca; Dr. Jesus Martin Urviola Sanchez; Dr. Edwin Julio Condori Carbajal, por su tiempo y sus sugerencias para concluir mi trabajo de investigación.

Un agradecimiento especial al Dr. Ruben Herberht Mamani Cato, por su colaboración constante durante la ejecución de mi trabajo de investigación.

**Wilberth Marcelino Ajahuana Flores**



# ÍNDICE DE GENERAL

	<b>Pág.</b>
<b>DEDICATORIA</b>	
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	
<b>ÍNDICE DE GENERAL</b>	
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b>	
<b>ACRÓNIMOS</b>	
<b>RESUMEN .....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1. OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>16</b>
1.1.1. Objetivo general.....	16
1.1.2. Objetivos específicos.....	16
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	
<b>2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>17</b>
2.1.1. A nivel internacional .....	17
2.1.2. A nivel nacional .....	23
<b>2.2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>24</b>
2.2.1. Aspectos generales e importancia de alpacas en el Perú.....	24
2.2.2. Biotecnología reproductiva en alpacas.....	25
2.2.4. Cortisol.....	27



2.2.5. Técnicas para determinar el cortisol.....	34
--	----

### **CAPÍTULO III**

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

<b>3.1. LUGAR DE ESTUDIO.....</b>	<b>41</b>
<b>3.2. MATERIAL DE ESTUDIO.....</b>	<b>41</b>
<b>3.3. MATERIALES Y EQUIPOS.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>43</b>
3.4.1. Niveles de cortisol sérico en alpacas Suri post transferencia de embriones.....	43
3.4.2. Niveles de cortisol sérico en alpacas Suri post monta natural .....	44

### **CAPITULO IV**

#### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

<b>4.1. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTISOL SÉRICO EN ALPACAS SURI POST TRANSFERENCIA DE EMBRIONES Y POST MONTA NATURAL.....</b>	<b>49</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>69</b>

**ÁREA:** Reproducción Animal.

**TEMA:** Efecto de la transferencia de embriones sobre los niveles de cortisol en alpacas suri.

**FECHA DE SUSTENTACIÓN:** 19 de diciembre de 2024



## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1</b> Distribución de animales en grupos experimentales.....	42
<b>Tabla 2</b> Placa de micro titulación analizadas en el lector automático de Microplacas ELISA: absorbancia a 450nm .....	50
<b>Tabla 3</b> Niveles de cortisol sérico ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) de alpacas Suri post transferencia de embriones y post monta natural .....	51
<b>Tabla 4</b> Concentración de cortisol en $\mu\text{g}/\text{dl}$ en alpacas post transferencia de embriones y post monta natural .....	51
<b>Tabla 5</b> Resultado de la prueba de Shapiro-Wilk.....	79
<b>Tabla 6</b> Resultados de la prueba estadística de U de Mann-Whitney .....	79
<b>Tabla 7</b> Grupo de alpacas Suri post monta natural .....	79
<b>Tabla 8</b> Grupo de alpacas Suri post transferencia de embriones .....	80



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b> Fisiología del estrés .....	32
<b>Figura 2</b> Curva estándar de los datos de absorbancia y valores de cortisol en $\mu\text{g/dl}$ esta investigación en alpacas Suri post transferencia de embriones y post monta natural .....	49
<b>Figura 3</b> Dispersión de líneas rectas y marcadores .....	50
<b>Figura 4</b> Selección de alpacas .....	69
<b>Figura 5</b> Aplicación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH).....	69
<b>Figura 6</b> Aplicación de la hormona prostaglandina F2a .....	70
<b>Figura 7</b> Aplicación de la hormona GnRH .....	70
<b>Figura 8</b> Empadre del grupo de alpacas Suri post monta natural .....	70
<b>Figura 9</b> Obtención de muestras de sangre .....	71
<b>Figura 10</b> Toma de muestra de sangre del grupo de alpacas suri post monta natural.	71
<b>Figura 11</b> Materiales para lavado de embriones .....	71
<b>Figura 12</b> Sujeción del animal .....	72
<b>Figura 13</b> Introducción de catéter folley e insuflado con una jeringa.....	72
<b>Figura 14</b> Introducción de la solución para el lavado .....	72
<b>Figura 15</b> Lavado hacia el filtro Emcon .....	73
<b>Figura 16</b> En la Observación al microscopio se ve al Embrión de calidad media, contorno irregular .....	73
<b>Figura 17</b> Preparación de la pistola de inseminación.....	73
<b>Figura 18</b> Colocación de la funda .....	74
<b>Figura 19</b> Introducción de la pistola de inseminación .....	74



<b>Figura 20</b>	Desinfección del surco yugular y extracción de la sangre en un tubo Vacutainer.....	74
<b>Figura 21</b>	Muestra de suero sanguíneo .....	75
<b>Figura 22</b>	Kit ELISA.....	75
<b>Figura 23</b>	Pipeteo de suero sanguíneo .....	75
<b>Figura 24</b>	Reactivo enzimático cortisol y la agitación en microplaca .....	76
<b>Figura 25</b>	Adición de reactivo de biotina cortisol.....	76
<b>Figura 26</b>	Adición de tampón de lavado .....	77
<b>Figura 27</b>	Adición de solución de sustrato de trabajo.....	77
<b>Figura 28</b>	Añadir solución Stop .....	78
<b>Figura 29</b>	Lectura de absorbancia a 450 nm .....	78



## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>ANEXO 1</b> Panel fotográfico.....	69
<b>ANEXO 2</b> Datos estadísticos .....	79
<b>ANEXO 3</b> Declaración jurada de autenticidad de tesis.....	81
<b>ANEXO 4</b> Autorización para el depósito de tesis o trabajo de investigación en el Repositorio Institucional.....	82



## ACRÓNIMOS

<b>Ags</b>	: Antígeno
<b>Abs</b>	: Anticuerpo
<b>CSA</b>	: Camélidos sudamericanos
<b>TE</b>	: Transferencia de embriones
<b>Ng</b>	: Nanogramos
<b>Mg</b>	: Microgramos
<b>DI</b>	: Decilitro
<b>GnRH</b>	: Hormona Liberadora de Gonadotropina
<b>LH</b>	: Hormona Luteinizante
<b>CRF</b>	: Factor Liberador de Corticotropina
<b>SNC</b>	: Sistema Nervioso Central
<b>HPA</b>	: Hipotálamo Pituitario Adrenocortical
<b>AVP</b>	: Arginina Vasopresina
<b>ACTH</b>	: Hormona Adrenocorticotrópica
<b>PTE</b>	: Post transferencia de embriones
<b>PMN</b>	: Post monta natural



## RESUMEN

El estrés es un factor determinante que afecta la fisiología reproductiva de los animales, influyendo en los niveles hormonales, especialmente el cortisol, biomarcador clave del estrés. En alpacas Suri, procesos reproductivos como la transferencia de embriones o la monta natural pueden incrementar significativamente el cortisol, impactando su bienestar y rendimiento reproductivo. El objetivo fue determinar el efecto de la transferencia de embriones sobre los niveles de cortisol en alpacas Suri. Para este estudio, se tomaron muestras de sangre de alpacas Suri en dos grupos: el grupo uno post transferencia de embriones y otro post monta natural. El análisis hormonal se determinó mediante la técnica de ELISA. Los datos se procesaron mediante la prueba de U de Mann-Whitney. Los resultados estadísticos para el grupo uno fueron la media de 6.48  $\mu\text{g/dl}$ , con una desviación estándar de 2.97  $\mu\text{g/dl}$ ; para el grupo dos la media fue 3.29  $\mu\text{g/dl}$ , con una desviación estándar de 1.94  $\mu\text{g/dl}$ , al comparar ambos resultados el grupo de post transferencia de embriones y post monta natural la diferencia estadística fue altamente significativa  $p\text{-valor} = 0.001 < 0.05$ . En conclusión, esto indica que el procedimiento de transferencia de embriones induce un aumento en los niveles de cortisol.

**Palabras clave:** Alpaca Suri, Cortisol, Sangre, Transferencia de embriones.



## ABSTRACT

Stress is a determining factor that affects the reproductive physiology of animals, influencing hormonal levels, especially cortisol, a key biomarker of stress. In Suri alpacas, reproductive processes such as embryo transfer or natural mating can significantly increase cortisol, impacting their well-being and reproductive performance. The objective was to determine the effect of embryo transfer on cortisol levels in Suri alpacas. For this study, blood samples were taken from Suri alpacas in two groups: group one after embryo transfer and group one after natural mating. Hormonal analysis was determined using the ELISA technique. Data were processed using the Mann-Whitney U test. The statistical results for group one where the mean of 6.48  $\mu\text{g/dl}$ , with a standard deviation of 2.97  $\mu\text{g/dl}$ ; for group two the mean was 3.29  $\mu\text{g/dl}$ , with a standard deviation of 1.94  $\mu\text{g/dl}$ , when comparing both results for the post embryo transfer group and the post natural mating group the statistical difference was highly significant  $p\text{-value} = 0.001 < 0.05$ . In conclusion, this indicates that the embryo transfer procedure induces an increase in cortisol levels.

**Keywords:** Alpaca Suri, Cortisol, Blood, Embryo transfer.



# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos (CSA) son una riqueza pecuaria y genética de las poblaciones andinas, siendo la alpaca (*Vicugna pacos*) la especie de mayor número poblacional en el Perú (Arias C. & Velapatiño, 2015). Los ganaderos brindan una alimentación adecuada para un mejor rendimiento productivo y reproductivo (von Keyserlingk et al., 2009). Una de las limitantes que existe durante las explotaciones alpaqueras en el Perú es el estrés que se encuentra directamente incluida en los incrementos de la concentración de cortisol en sangre de tal forma que minimiza la función reproductiva, inmune y digestiva (Dallman, 2003).

Las biotecnologías reproductivas son herramientas que nos ayudan al progreso genético de las especies domésticas y aportan nuevas soluciones para facilitar el manejo genético de poblaciones de los camélidos sudamericanos (Gomendio et al., 2006). En los camélidos sudamericanos (CSA) la transferencia de embriones (TE) nos brinda un amplio potencial respecto a la capacidad reproductiva de los donantes de alto mérito genético en los rebaños domésticos y de facilitar la conservación y repoblación de especies de camélidos silvestres (Sumar, 2013).

El avance de las técnicas de reproducción asistida en camélidos sudamericanos todavía es bastante limitado en comparación con otros animales y representa el trabajo de pequeños grupos de investigación a nivel global (Ratto et al., 2013). La transferencia de embriones en alpacas es un procedimiento comúnmente utilizado en programas de mejoramiento genético y conservación. Sin embargo, este proceso puede inducir estrés en los animales, debido a varios factores asociados con la manipulación y el cambio de entorno (Orellana & Peralta, 2007). Además, estudios han demostrado que el estrés puede



influir negativamente en la tasa de éxito de la transferencia de embriones, ya que puede interferir con la receptividad uterina y la calidad de los embriones implantados (Lozano et al., 2010).

La activación del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) está vinculada a la estimulación del eje Hipotalámico-Hipofisiario-Adrenal (HHA), el cual involucra a las neuronas productoras de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y de arginina vasopresina (AVP) en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo. La liberación de estas hormonas provoca la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) desde la hipófisis, la cual, al circular por el sistema sanguíneo, llega a la corteza adrenal y desencadena la síntesis y liberación de glucocorticoides, como el cortisol, que es el principal marcador de estrés, y la corticosterona (Koscinczuk, 2014). Las consecuencias del estrés se manifiestan en diversas actividades relacionadas con el manejo, transporte, estado nutricional, hormonal y ambiental de las alpacas. Con el presente estudio se pretende investigar acerca del efecto de la transferencia de embriones sobre los niveles de cortisol en alpacas Suri del Centro Experimental Chuquibambilla.

## **1.1. OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **1.1.1. Objetivo general**

- Determinar el efecto de la transferencia de embriones sobre los niveles de cortisol en alpacas Suri.

### **1.1.2. Objetivos específicos**

- Comparar los niveles de cortisol sérico en alpacas Suri post transferencia de embriones y post monta natural.



## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

##### 2.1.1. A nivel internacional

En estudios de programas de transferencia de embriones (TE) el estrés es un factor de impacto importante en los resultados de la TE. Las donantes transportadas durante 15 a 60 minutos a veces todos los días, durante 4 días, tienen una tasa de ovulación más baja en respuesta a la superovulación  $15.4 \pm 1.7$  frente a  $20.4 \pm 2.1$ ; (Edwards et al., 1987). En relación con los receptores, se observó que los animales inducidos a caminar 7 km en terreno accidentado en los días posteriores al estro mostraron tasas de preñez más bajas en comparación con el grupo control (Lowman et al., 1994).

Viana et al., (2022) indica la valoración entre el índice de temperatura-humedad ambiental (THI), la temperatura rectal (RT), la concentración de cortisol en plasma y la tasa de preñez en vacas receptoras de embriones en el bioma amazónico. La población de receptores de embriones ( $n = 235$ ) se sometieron a sincronización de estro mediante la simplificación del Protocolo P36 para la transferencia de embriones de tiempo fijo (TETF). En los días cero (D0), ocho (D8) y el día 16 (D16) se midió la temperatura rectal de las vacas receptoras, así como la temperatura ambiente y la humedad relativa. En el día 16 (D16), cada receptor recibió un embrión transferido. En donde se obtuvieron resultados de los niveles de cortisol del grupo de no preñadas (GNP) de  $17.78 \pm 5.54$  ng/ml y grupo de preñadas (GP) de  $13.78 \pm 4.74$  ng/dl, en este contexto, como es considerada la



hormona del estrés, su evaluación, en la actualidad ha adquirido gran importancia (Benatti, 2010).

El estudio se llevó a cabo en Hungría se investigó los niveles de estrés en alpacas durante la esquila, utilizando los niveles de cortisol en saliva como indicador de estrés. Realizado en 2014 y 2015, se tomaron muestras de saliva de 10 y 12 alpacas, respectivamente, en diferentes momentos: antes, durante, inmediatamente después y 30 minutos después de la esquila. Los resultados indican que los machos mostraron más nerviosismo antes de la esquila en comparación con las hembras, los niveles de cortisol generalmente aumentaron durante el proceso de la esquila, la mayoría de las hembras presentaron niveles elevados de cortisol debido al estrés de la esquila, y finalmente el estudio concluye que la esquila causa un ligero estrés en las alpacas, pero con un manejo adecuado, se puede minimizar el estrés significativo. Además, se sugiere que técnicas de manejo adecuadas, como minimizar movimientos innecesarios y combinar procedimientos, pueden ayudar a reducir el estrés en las alpacas (Prágai & Kovács, 2020) .

El presente estudio se llevó a cabo en una granja de alpacas en la provincia de Lubelskie, de Polonia que investiga las respuestas conductuales y neuroendocrinas de las alpacas (Vicugna pacos) durante y después del procedimiento de esquila, centrándose en indicadores de estrés como el cortisol, dopamina, noradrenalina, serotonina y tiroxina. Se llevó a cabo con 20 alpacas, evaluando su comportamiento y niveles hormonales en tres intervalos: tres días antes de la esquila, el día de la esquila y cinco y diez días después. En donde los resultados fueron que los niveles de cortisol en machos el día de esquila fueron de 6.50 ng/ml, mientras que en hembras fueron de 4.27 ng/ml. Después de la esquila,



los niveles de cortisol en hembras fueron de 6.65 ng/ml y en machos de 5.29 ng/ml. Los hallazgos indican que la esquila provoca una respuesta aguda de estrés el día del procedimiento, con cambios conductuales observados, pero no sostenidos en los días siguientes. Además, se observaron correlaciones entre ciertas respuestas conductuales y cambios neuroendocrinos, lo que contribuye a la comprensión de los mecanismos de estrés en las alpacas durante prácticas de manejo rutinarias. Las respuestas conductuales al estrés fueron agudas durante la esquila, sin cambios significativos observados posteriormente (Budzyńska et al., 2024).

Según Raggi et al., (1994) refiere que lograron caracterizar fisiológicamente a la alpaca en el ambiente del altiplano chileno, a una altitud de 4200 m.s.n.m., utilizaron 30 animales entre machos y hembras adultos; que fueron confinados en corrales de estabulación durante la noche y se mantuvieron durante el día en pastoreo libre, además los animales fueron muestreados 2 veces al día (mañana y tarde) durante 15 días continuos, en la cual una de las variables analizadas fue los niveles de cortisol plasmático, los resultados fueron: en la mañana  $1.0378 \pm 0.7446$  y en la tarde  $0.501 \pm 0.3346$   $\mu\text{g/dl}$ , este estudio concluye que de acuerdo a los resultados existe una posible participación del ritmo circadiano para el cortisol plasmático en las alpacas.

Según Larry, (2012) menciona que las concentraciones plasmáticas de cortisol en mamíferos están dentro del rango normal de 4 a 16  $\mu\text{g/dl}$  y muestran un ritmo circadiano, con concentraciones normales que aumentan durante el sueño. Debido a este ritmo circadiano, se debe tener en cuenta el momento de la toma de muestra de sangre al interpretar las concentraciones clínicas de cortisol en plasma.



La Universidad Autónoma Metropolitana de México llevó a cabo un estudio para analizar cómo el hacinamiento y la falta de agua afectan el comportamiento reproductivo y los niveles hormonales en cabras criollas de la Mixteca Oaxaqueña. La muestra incluyó 10 hembras, 7 machos y 1 semental en el grupo de control, donde cada cabra tenía un espacio de 2 m<sup>2</sup>. En el grupo sometido a estrés, se incluyeron 10 hembras, 9 machos y 1 semental, con un espacio disponible de solo 40 cm<sup>2</sup> por cabra y sin acceso a agua en el corral, que solo se proporcionaba durante el pastoreo. Las cabras fueron alimentadas mediante pastoreo en campo abierto durante 6 horas al día durante 4 meses. Los resultados mostraron diferencias significativas en las concentraciones séricas de cortisol entre los dos grupos; aunque la variación diaria de esta hormona fue similar en ambos, los niveles eran distintos. En el grupo control, el cortisol alcanzó un máximo de 1.9600 µg/dl y un mínimo de 0.6950 µg/dl, mientras que, en el grupo de estrés, los valores oscilaron entre 4.3950 µg/dl y 2.483 µg/dl (Díaz, 2016).

Un estudio realizado por Rosiára et al., (2016) en el país de Brasil en la Unesp Campus de Botucatu, evaluó los niveles séricos de cortisol y progesterona en hembras bovinas sometidas a manejo diario y semanal. Estos divididos en dos grupos en la cual se utilizaron siete vacas Nelore (*Bos taurus indicus*), primíparas y multíparas. El primer grupo, los animales fueron manipulados diariamente y monitoreados durante 21 días consecutivos, tiempo equivalente a un ciclo estral. El grupo 2, los animales fueron seguidos durante 9 semanas consecutivas. Todos los animales fueron llevados al baúl de contención, sometidos a palpación transrectal y ecografía, así como venopunción yugular. Enseguida las muestras de plasma se procedieron a congelar y luego se medir las concentraciones



plasmáticas de cortisol y progesterona mediante técnicas de radioinmunoensayo. Los animales del grupo 1 tenían concentraciones plasmáticas de progesterona que oscilaban entre 0.13 y 4.42 ng/ml ( $p < 0.05$ ), mientras que los animales del grupo 2 no cambiaron las concentraciones plasmáticas de progesterona durante varias semanas (0.17 a 1,2 ng/ml ml;  $p > 0.05$ ). Las dosis de cortisol oscilaron entre 1  $\mu\text{g/dl}$  y 5  $\mu\text{g/dl}$  en los animales del grupo 1 y entre 0.83  $\mu\text{g/dl}$  y 6.2  $\mu\text{g/dl}$  en los animales del grupo 2. Los procedimientos de manipulación utilizados en los grupos 1 y 2 fueron capaces de inducir estrés en los animales.

En la ciudad de Cuenca, Ecuador, en la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca, López, (2021), realizó una investigación que tuvo como objetivo evaluar la valoración de los niveles de cortisol en bovinos aparentemente sanos mediante la técnica de ELISA cuantitativo en condiciones de altitud. Los resultados fueron que la concentración de cortisol tuvo un promedio en machos de 10.238  $\mu\text{g/dl}$  y en hembras de 8.585  $\mu\text{g/dl}$ .

En un trabajo realizado en el laboratorio de la Clínica Veterinaria Polivet de la Universidad Nacional Politécnica Salesiana, Sede Cuenca, el objetivo fue de medir determinar los niveles de cortisol de equinos (*Equus caballus*) aparentemente sanos mediante la técnica de ELISA cuantitativo en condiciones de altitud, el tamaño de muestra fue 200 equinos, divididos en dos grupos, hembras (100) y machos (100), de los cuales se tomaron muestras sanguíneas. En el análisis del cortisol en plasma de equinos machos obtuvieron la media de los niveles de cortisol 6.731( $\mu\text{g/dl}$ ) y la desviación estándar 3.62 y para los equinos hembra obtuvieron la media de los niveles de cortisol 7.117 ( $\mu\text{g/dl}$ ) y una desviación estándar de 2.14 referente de los datos obtenidos del plasma. Concluyendo que las mediciones de cortisol a nivel de altura en equinos sirven



como información científica para referencias de laboratorios clínicos veterinarios (González, 2023).

Un estudio realizado en la Universidad de Azores, de Portugal se tuvo como objetivo evaluar el efecto del estrés en el desempeño reproductivo del ganado. Para ello, se dividieron en dos grupos un total de 137 vacas: 65 pertenecientes a la raza Azores Lydia y 72 del cruce Aberdeen-Angus con Limousine, libres de enfermedades. Ocho días antes de iniciar los procedimientos experimentales, los animales pasaron a través de la manga de contención cada dos días por rutina y presencia humana. El protocolo de sincronización, se inició colocando intravaginalmente un inserto de liberación interna controlada de fármaco (CIDR®) impregnado de progesterona y se administró una inyección de GnRH. Después de 7 días, se administró PGF2 $\alpha$  y se retiró el CIDR®. Al día 10, las vacas fueron inseminadas una vez después de otra inyección de GnRH para inducir la ovulación, y el diagnóstico de preñez se realizó mediante ecografía 30 días después de la inseminación artificial. La muestra de sangre fue recolectada en tubos de 5 ml con un activador de coágulo sérico Z y se midió el cortisol utilizando el sistema de inmunoensayo IMMULITE 2000 ®. Los resultados indicaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en los niveles de cortisol entre ambos grupos (vacas mestizas de carne vs Azores Lydia) de  $4.3 \pm 0.3$  ng/dl y  $5.8 \pm 0.4$  ng/dl, respectivamente. Los resultados de preñez también fueron significativamente diferentes: 63.7% frente a 45.6%, respectivamente, para las vacas mestizas de carne y "Azores Lydia". El presente estudio demostró claramente una correlación negativa entre los niveles de cortisol y las tasas de embarazo después de la inseminación artificial a tiempo fijo. Los bajos niveles de cortisol observados en los animales y particularmente en la raza Azores Lydia, en



comparación con otros estudios realizados en estos animales, deben deberse al paso de los animales en la manga, lo que les permite habituarse a una rutina, como así como a la presencia humana (Faria et al., 2023).

### **2.1.2. A nivel nacional**

En Cajamarca, Perú, en la Universidad Nacional de Cajamarca, Gálvez, (2019), realizó una investigación cuyo objetivo fue evaluar las concentraciones séricas de cortisol, para determinar la presentación de estrés al que son sometidas las vacas en el manejo ante mortem en el Matadero Municipal de la Provincia de Cajabamba, del cual concluyó que las concentraciones de cortisol(nmol/L) en las vacas que fueron sometidas al manejo ante mortem al momento del encierro, a las 7 horas posteriores de descanso en los corrales de encierro y al momento del degüello, fueron estadísticamente diferentes ( $p < 0.01$ ). Siendo a las 7 horas, cuando las vacas estaban en los corrales de encierro las que registraron los menores valores (1.6490  $\mu\text{g/dl}$ ) y diferente a los valores registrados al momento del encierro en los corrales (3.4865  $\mu\text{g/dl}$ ) y en el degüello (3.2821  $\mu\text{g/dl}$ ), hallando estos dos últimos valores similares ( $p > 0.05$ ).

En el Perú, las alpacas crías son destetadas al principio de la primavera (setiembre a octubre), cuando tienen entre 7 y 8 meses de edad. En este contexto, Bravo et al., (2001) hizo una investigación en el período de destete, en la cual se recogieron muestras de sangre 2 días antes, el día del destete (0) y los días 3 y 5 después del destete, el cortisol fue de 3.25  $\mu\text{g/dl}$  2 días antes del destete y luego aumentó el día 3 a 6.47  $\mu\text{g/dl}$ , pero luego disminuyó a 2.94  $\mu\text{g/dl}$  el día 5 después del destete.

## 2.2. MARCO TEÓRICO

### 2.2.1. Aspectos generales e importancia de alpacas en el Perú

La crianza de camélidos sudamericanos se ha expandido en varios países, pero el Perú continúa siendo el principal país poseedor de estos animales, con más del 50% de la población mundial. Además, Perú es el único país que alberga las cuatro especies de la familia de camélidos sudamericanos: la alpaca y la llama, que son criadas de manera doméstica para fines productivos, y la vicuña y el guanaco, que son especies silvestres. En años recientes, se ha observado un leve aumento en la población de alpacas en Perú; sin embargo, los estudios actuales indican que su desempeño reproductivo no es óptimo, como lo evidencian las bajas tasas de fertilidad (Norambuena et al., 2018; Ratto et al., 2006; Sapana et al., 2009), que podrían estar relacionados a problemas de bienestar animal, producción y reproducción.

Los criadores de alpacas (*Vicugna pacos*) y llamas (*Lama glama*) están muy comprometidos en brindar a sus animales una nutrición y salud adecuada para lograr los mayores resultados productivos, además en cuanto al manejo animal, tienen un ambiente confortable, higiene y sin estrés ni dolor, lo que les permite mostrar el comportamiento social esperado y maximizar su desempeño productivo y reproductivo. (von Keyserlingk et al., 2009). Las principales limitantes en las explotaciones alpaqueras en el Perú es la baja eficiencia reproductiva: baja tasa de natalidad, inicio de actividad reproductiva tardía (Fernández-Baca, 1991; Novoa, 1970).

A pesar de las bondades presentadas en esta especie, existen multifactores que la predisponen a diversas enfermedades infecciosas respiratorias, tales como



los cambios bruscos de microclimas extremos (Rosadio et al., 2011), el transporte, largos recorridos de pastoreo, hacinamiento, manejos inadecuados en las actividades productivas (sanitario, reproductivos, esquila), estrés y deficiencias inmunológicas (Carbonero et al., 2011; Svensson et al., 2003).

Los camélidos sudamericanos tienen una baja capacidad reproductiva debido a que su reproducción es estacional con un período de gestación de aproximadamente 340 a 345 días (Sumar, 1996). Dependiendo de la edad y del animal, tienen un inicio tardío de la pubertad y sufren pérdidas embrionarias tempranas (Fernández-Baca et al., 1970), por lo que se realizan esfuerzos para lograr técnicas exitosas en la reproducción asistida, como la inseminación artificial, superovulación, transferencia de embriones y fecundación in vitro. Sin embargo, el desarrollo de la biotecnología está limitado no sólo por los limitados recursos financieros, sino por las regulaciones de protección y registro de la cría sobre estas especies (Forshey et al., 2018; Herrid et al., 2017).

### **2.2.2. Biotecnología reproductiva en alpacas**

Las biotecnologías reproductivas son herramientas que nos ayudan al progreso genético de las especies domésticas y aportan nuevas soluciones para facilitar el manejo genético de poblaciones de especies en peligro de extinción (Gomendio et al., 2006). Desde el 2000, los camélidos sudamericanos se han vuelto más populares a nivel internacional por la difusión de sus características productivas, incrementándose el interés en la aplicación de tecnologías reproductivas (Miragaya et al., 2006). En los camélidos sudamericanos (CSA) la transferencia de embriones (TE) nos brinda un amplio potencial respecto a la capacidad reproductiva de los donantes de alto mérito genético en los rebaños



domésticos y de facilitar la conservación y repoblación de especies de camélidos silvestres (Sumar, 2013).

La transferencia de embriones requiere varios pasos, cada uno de los cuales tiene ciertas limitaciones, para tener una técnica exitosa, ya que estos camélidos son ovuladores reflejos o inducidos, en los que, las señales neuronales de la cópula y proteínas seminales, como el factor de crecimiento  $\beta$ -neural (Adams et al., 2005; Adams & Ratto, 2013), además de ser el principal factor que estimula o provoca la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) desde el hipotálamo, también estimula la liberación de la hormona luteinizante preovulatoria (LH). Por tanto, la ovulación no es un evento cíclico regular (Silva et al., 2020). En este sentido, el reto es una superovulación exitosa para producir más embriones, una recuperación óptima de los embriones y una buena sincronización de la actividad ovárica entre las hembras donante y receptora, ya que la transferencia se realiza inmediatamente después de la recuperación del embrión (Vaughan et al., 2013).

En el tema de la biotecnología reproductiva existen diversas técnicas de colección de embriones de las cuales la más utilizada es de lavado uterino en alpacas con ovulación simple, que no requiere un tratamiento previo de multiovulación; razón por la cual generará un menor costo, obteniendo un resultado de 70% de efectividad de colección de embriones (Huanca et al., 2012; Vaughan et al., 2013).

### **2.2.3. Monta natural en alpacas**

La monta o cópula en los camélidos presenta características particulares y consiste en varias fases, a saber:



- Fase 1: Galanteo: consiste en la detección del celo por parte de la alpaca y el proceso puede ir desde la persecución de la hembra, hasta que ésta se acueste o simplemente la hembra se echa ante el acercamiento del macho y éste la monta directamente.
- Fase 2: Acercamiento o "punteo": el macho en la posición se muestra echado sobre la hembra invagina reiteradamente el pene y con la cresta cartilaginosa del glande busca la entrada a la vagina, se acerca y acomoda de acuerdo a las distancias y al tamaño de la hembra. Esta fase finaliza cuando la hembra levanta la cola y el macho inicia la intromisión del pene.
- Fase 3: Intromisión o monta: es cuando se inicia la eyaculación que es lenta y con bajo volumen de semen eyaculado. Al momento de la intromisión y eyaculación se verifica externamente por la curvatura del dorso y la grupa del macho y por el inicio de movimientos pélvicos, rítmicos y acompasados del animal macho (Frank, 2017).

Según el estudio de investigación por Pimentel, (2009) en mamíferos el efecto de la introducción del macho al grupo de hembras para detectar el celo indica que el macho aumenta el nivel de cortisol en las hembras, mientras que cuando no existe contacto no hay aumento.

## **2.2.4. Cortisol**

### **2.2.4.1. Definición**

El cortisol muestra una variabilidad muy breve y es uno de los biomarcadores más comunes para medir el estrés en los animales. Sin embargo, su incremento en la concentración en sangre solo refleja un indicador neuroendocrino primario. La medición de los niveles basales de



cortisol y sus cambios después de la exposición a factores estresantes son buenos biomarcadores para evaluar el estrés crónico (Alende et al., 2014). Así también el cortisol como biomarcador de estrés en el área de producción es un término de bienestar animal para designar el estado de un paciente en un entorno de bienestar, ya sea que el paciente esté sano, cómodo, buena condición corporal y buenas actitudes de comportamiento y si no padece de dolor, miedo o desasosiego (Odeón & Romera, 2017). Además es el principal glucocorticoide en los mamíferos, se utiliza comúnmente como indicador fisiológico del estrés (Ralph & Tilbrook, 2016; Sheriff et al., 2011). Existen tres procesos fundamentales en la liberación de glucocorticoides. El hipotálamo libera el factor liberador de corticotropina (CRF) que actúa sobre el lóbulo anterior de la hipófisis para estimular la producción de ACTH, asimismo la ACTH interactúa con los receptores situados en la superficie de las células de la corteza suprarrenal para estimular e incrementar el nivel de secreción de cortisol (Romero et al., 2011). La corteza suprarrenal produce cortisol a partir del colesterol mediante una serie de reacciones enzimáticas. El sistema nervioso central (SNC) regula y ajusta la cantidad de cortisol producido, adaptándola a diversas condiciones como la temperatura, el estrés y los traumatismos (Sumano & Ocampo, 2006).

Aunque los estudios sobre estrés en animales suelen medir el cortisol en sangre, también es posible evaluar los niveles de cortisol en otros fluidos biológicos como la saliva, la orina y las heces, esta última se observó en investigaciones realizadas con camélidos sudamericanos (Arias C. & Velapatiño, 2015).



Si nos referimos al tiempo que se tarda en medir el cortisol, además de su vida media de 60 minutos, se necesitan otros 10 a 20 minutos para alcanzar su valor máximo (Joseph & Whirledge, 2017; Souza et al., 2006; Toghiani et al., 2020).

Para la evaluación del cortisol sérico se requiere una muestra de suero sanguíneo y un kit de radioinmunoensayo competitivo (Otten et al., 2010; Bulitta et al., 2015), de ELISA (Ahmed et al., 2014; Candiani et al., 2008; Dehnhard et al., 2003) o de quimioluminiscencia (Ceballos et al., 2013).

#### **2.2.4.2. Estrés**

El estrés se define como un estado de homeostasis modificado como resultado de un agente estresante, que puede ser un estímulo extrínseco o intrínseco, obteniendo como respuesta en los animales cambios fisiológicos y de conducta con el fin de adaptarse o compensar el nuevo estado interno (Manteca et al., 2013). Si el animal no se adapta, este estado de estrés puede provocar inmunosupresión y aparición de enfermedades (Ávila, 2014; Pérez-Núñez et al., 2014). Además, los efectos del estrés pueden provocar la liberación de epinefrina y noradrenalina.

El mecanismo del estrés se fundamenta en dos conceptos clave: el síndrome de respuesta de emergencia y el síndrome general de adaptación (Herskin & Munksgaard, 2004). En el síndrome de emergencia, actúa el sistema simpático-adrenal, este se da ante situaciones súbitas peligrosas, la respuesta que se genera es rápida y breve, se activa la parte neuronal del



hipotálamo, hay liberación de adrenalina y noradrenalina desde médula adrenal causando el aumento de: frecuencia cardíaca, disponibilidad de glucosa, presión arterial y volumen sanguíneo hacia el corazón y músculos estriados para que se logre la huida (Marroquín, 2018). En el síndrome general de adaptación ocurre tres estadios: la respuesta inmediata, que es de duración limitada, donde ocurren cambios fisiológicos como taquicardia y taquipnea, aumenta la coagulación sanguínea, hay mayor contracción esplénica con liberación de glucocorticoides al torrente sanguíneo; la resistencia del organismo con el fin de intentar hacer frente al agente nocivo, activándose el eje hipotálamo- hipófisis-corteza adrenal para estabilizar los niveles de corticoides y cese la aparición de los síntomas; y la reacción de agotamiento que se da en situación de diestrés o estrés crónico, cuando la situación estresante sobrepasa su capacidad de resistencia, impulsando la actividad endocrina ocasionado efectos dañinos en el organismo del animal que en el peor de los casos termina con la muerte del individuo (Velez & Uribe, 2010). Las condiciones medioambientales podrían afectar el comportamiento reproductivo así como también se menciona con el stress de calor y frío (Toghiani et al., 2020; Torreño et al., 2008).

#### **2.2.4.3. Factores asociados al estrés en camelidos sudamericanos**

En la producción ganadera, se utilizan diversas prácticas de manejo y relaciones entre humanos y animales para mejorar tanto la eficiencia como el bienestar de los animales domésticos. Estas prácticas abarcan la manipulación, estrategias nutricionales, medicina preventiva, procedimientos quirúrgicos, y el uso de corrales y jaulas, así como



métodos de transporte, entre otros. Sin embargo, estas acciones pueden generar molestias o dolor en los animales, lo que puede causar estrés y, a su vez, provocar cambios en su comportamiento y fisiología, lo que repercute negativamente en su bienestar (Mpakama et al., 2014).

#### **2.2.4.4. Fisiopatología del estrés**

Para Romero et al., (2011) el grado de estrés es utilizado como un indicador de bienestar animal. Al generar cambios en la actividad del eje “hipotálamo-pituitaria-adrenocortical” (HPA) y el “sistema simpático-adreno-medular” se produce un aumento en la liberación de catecolaminas: adrenalina y noradrenalina, de la médula adrenal y de las fibras nerviosas del locus coeruleus, respectivamente, como respuesta cuando el animal necesita luchar o huir ante una amenaza, colocándolo en estado de alerta continua (Dickens et al., 2010).

Inmediatamente después del efecto estresante, el sistema nervioso una cantidad de neuronas hipofisiotropas ubicadas en el eje HPA se da la activación de la “hormona liberadora de corticotropina” (CRH) y arginina-vasopresina (AVP), que actúa sobre la hipófisis propiciando la liberación de la “hormona adrenocorticotrópica” (ACTH), En respuesta, la corteza adrenal produce glucocorticoides (cortisol, corticosterona) (Herman et al., 2003).

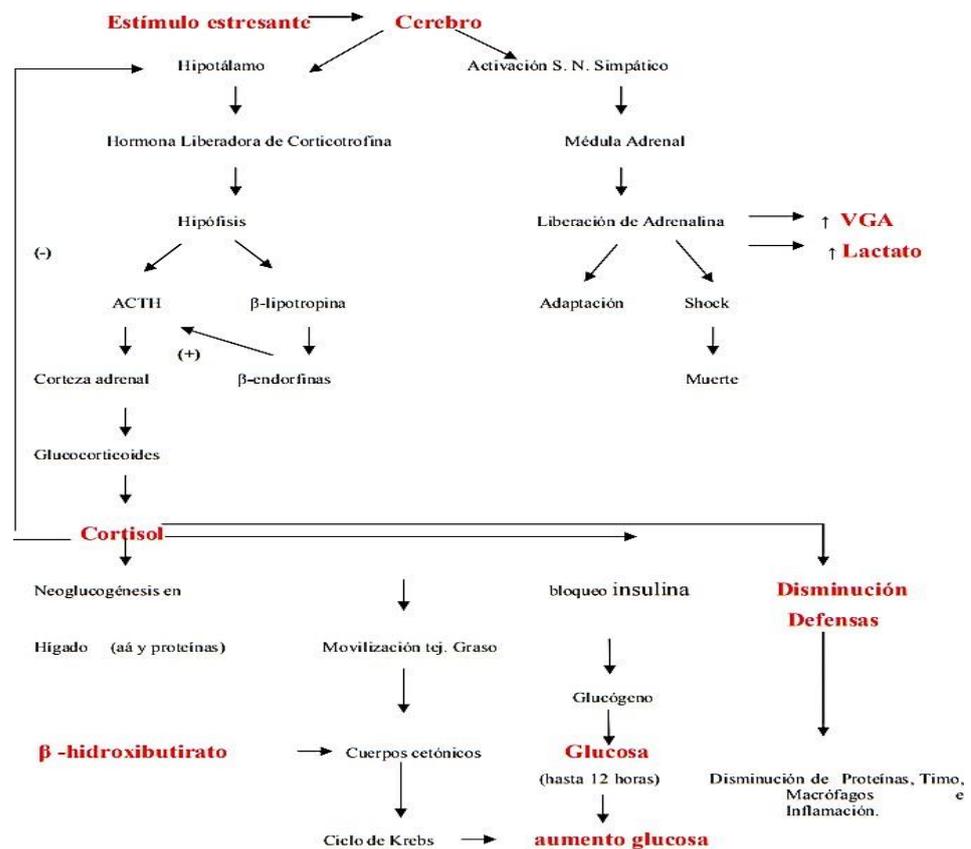
Tras estos eventos, como reacción al estrés, se eleva la concentración de cortisol en la sangre, lo que provoca un aumento en la actividad cardiovascular y cognitiva, así como en la movilización de glucosa. Al mismo tiempo, se reduce o limita la función reproductiva,

inmune y digestiva. El cortisol presente en el torrente sanguíneo es procesado por el hígado y eliminado a través de la orina y las heces (Cortés et al., 2018; Dallman, 2003).

Los estados de estrés pueden ser medidos a través de variables sanguíneas sean éstas hormonas o metabolitos, la ventaja de estas mediciones es que producen resultados cuantificables y posibles de comparar (Tadich, 2008).

**Figura 1**

*Fisiología del estrés*



Fuente: (Tadich, 2008)

Otro factor que puede interferir con las tasas reproductivas es el nivel de estrés del animal (García, 2018).



#### **2.2.4.5. Relación Estrés y cortisol**

El estrés se manifiesta como la reacción del cuerpo ante estímulos estresantes que perturban su equilibrio interno. Frente a estos estímulos, el cerebro desencadena una serie de respuestas fisiológicas que incluyen cambios en el comportamiento, la respuesta inmune, la activación del sistema nervioso autónomo y la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA). Este eje HPA libera cortisol en el torrente sanguíneo. Una respuesta rápida al estrés puede ser beneficiosa al ayudar al organismo a afrontar adversidades ambientales; sin embargo, si el estrés persiste, puede afectar negativamente la salud y el bienestar (Dickens et al., 2010).

Después del evento estresante, el sistema nervioso activa neuronas hipofisiotrópicas en el hipotálamo, que liberan las hormonas liberadoras de corticotropina (CRH) y arginina-vasopresina (AVP) en la circulación portal. Estas hormonas estimulan la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) en la sangre, lo que a su vez induce a la corteza adrenal a producir glucocorticoides como cortisol y corticosterona (Herman et al., 2003).

La respuesta al estrés se caracteriza por un aumento en los niveles de cortisol en sangre, una mayor actividad cardiovascular y cognitiva, y la movilización de glucosa. Al mismo tiempo, se reduce o se inhibe la función reproductiva, inmune y digestiva. El cortisol en la sangre es metabolizado por el hígado y se excreta a través de la orina y las heces (Dallman, 2003).



## **2.2.5. Técnicas para determinar el cortisol**

Para evaluar el cortisol sérico se requiere una muestra de suero sanguíneo y un kit de radioinmunoensayo competitivo (Bulitta et al., 2015; Otten et al., 2010), de ELISA (Ahmed et al., 2014; Candiani et al., 2008; Dehnhard et al., 2003) o de quimioluminiscencia (Ceballos et al., 2013).

### **2.2.5.1. Técnica de Elisa**

Son técnicas de alta precisión capaces de detectar cantidades en el rango de nanogramos, relacionadas con enzimas que se emplean como marcadores para medir la formación de complejos entre antígenos y anticuerpos, para realizar estas pruebas se han desarrollado métodos para aplicar ELISA que tienen en común un marcador enzimático que se puede unir a un anticuerpo o a un antígeno, también en todos estos métodos en su procedimiento se lleva a cabo una separación que tiene el objetivo de eliminar el conjugado enzimático libre antes de que se determine la cantidad de conjugado enzimático enlazado, esto se logra por medio de una reacción catalítica entre el sustrato y la enzima (Guzmán, 2004; Stanchi, 2010).

Es una de las pruebas más importantes de la inmunoanálisis que es usada en la Medicina veterinaria, la prueba de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) para la detención de antígenos como anticuerpos (Ramsey & Tennant, 2012; Tizard, 2017).

La principal ventaja de las pruebas de ELISA radica en la amplificación de la reacción obtenida con cada complejo anticuerpo-enzima, que puede interactuar con numerosas moléculas de sustrato para



generar un producto coloreado. Sin embargo, el principal inconveniente es que las reacciones ocurren en un medio líquido, lo que requiere el uso de varias soluciones y una técnica precisa de pipeteo (Ramsey & Tennant, 2012).

#### A. Tipos de ELISA

- ELISA Indirecta

Este método se utiliza para detectar anticuerpos (Abs) y antígenos (Ags). Se incubaba el antígeno en un tampón adecuado en los pocillos de una placa de microtitulación, donde se adhiere a las paredes. Los antígenos libres se eliminan mediante un lavado. Posteriormente, los anticuerpos no unidos también se retiran a través de otro lavado, mientras que el antígeno que se ha adherido interactúa con un anticuerpo específico. Esta combinación de antígeno y anticuerpo se identifica utilizando un segundo anticuerpo marcado con una enzima, que reconoce regiones constantes de los anticuerpos y suele ser específico para una determinada especie. Esto permite que un anticuerpo marcado pueda detectar diferentes antígenos. El conjugado se une al anticuerpo de interés y, tras lavar el conjugado no ligado, el complejo se visualiza añadiendo un cromógeno. La cantidad de enzima unida refleja la cantidad de anticuerpos en la muestra, lo cual se puede medir mediante la degradación de su sustrato (Ríos et al., 2012; Suárez, 2017).

- ELISA Directa

El nombre de ELISA directa tiene su desglosamiento, en la comparación de la inmunofluorescencia directa, en donde una sola etapa

es necesaria, para que la reacción se lleve a cabo y se evidencie (Gómez et al., 1994).

Es la técnica más sencilla y rápida, donde un anticuerpo primario marcado con una enzima se une directamente al antígeno que se desea estudiar, lo que facilita su identificación o medición (Abyntek, 2019).

- ELISA Tipo de Sándwich

Este método se utiliza para identificar y cuantificar un antígeno o un anticuerpo específico para lo cual se utiliza una placa de poliestireno tapizados con un antígeno específico al cual se le conoce como anticuerpo de captura posteriormente se añade la solución de antígeno a analizar en cada uno de los pocillos y su el suero corresponde al animal enfermo el anticuerpo de captura se unirán antígeno presente en esta solución problema produciendo la primera unión (Tizard, 2017; Urse, 2016).

Se llevan a cabo múltiples lavados antes de agregar un anticuerpo específico, denominado anticuerpo de detección, que se unirá al antígeno. Luego, se incuban todos los sueros y se lavan de nuevo las placas para eliminar cualquier anticuerpo que no se haya unido. Posteriormente, se añade una antiglobulina marcada con una enzima y el sustrato, que provocará un cambio de color en los sueros. Es crucial que el anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección provengan de especies diferentes, y que la antiglobulina específica de especie se utilice para visualizar el anticuerpo de detección, ya que esto ayuda a prevenir resultados falsos positivos (Rojas, 2006; Tizard, 2017).

- ELISA Cuantitativo



Este es un método innovador que, a diferencia de otros, emplea protocolos más complejos y su uso está limitado a laboratorios especializados debido a su alto costo, ya que requiere equipos específicos para llevarlo a cabo (Beneanula, 2010).

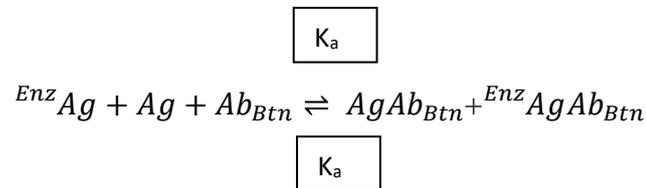
La ELISA cuantitativa se basa en la utilización de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, formando conjugados que presentan tanto propiedades inmunológicas como enzimáticas. Los componentes (antígeno o anticuerpo) al estar marcados con una enzima e insolubilizado sobre un soporte, tienen la reacción del antígeno anticuerpo, este quedará inmovilizado y por lo tanto será más fácil revelarla por esto la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso del espectrofotómetro o un colorímetro (Buñay, 2019).

- Cortisol accubind ELISA

El kit de ELISA Monobind Cortisol emplea un anticuerpo monoclonal específico contra el cortisol y no necesita que se extraiga previamente una muestra de suero o plasma. La inclusión de diferentes referencias séricas con distintas concentraciones de cortisol permite crear gráficos tanto dinámicos como de concentración, donde se puede comparar la curva con la respuesta a la dosis y correlacionar una muestra desconocida con su concentración de cortisol (AccuBind® ELISA, 2019).

Los reactivos necesarios para un inmunoensayo enzimático incluyen anticuerpos, conjugados de enzima-antígeno y antígeno nativo. Al mezclar un anticuerpo biotinilado, un conjugado de enzima-antígeno y un suero que contiene el antígeno nativo, se genera una reacción competitiva entre el antígeno nativo y el conjugado de enzima-antígeno,

dado que hay un número limitado de uniones de anticuerpos (AccuBind® ELISA, 2019). Esta interacción se puede expresar con la siguiente ecuación:



Fuente: (AccuBind® ELISA, 2019).

- $\text{Ab}_{\text{btn}}$  = Anticuerpo marcado con biotina (cantidad constante)
- $\text{Ag}$  = Antígeno nativo (cantidad variable)
- $\text{EnzAg}$  = conjugado enzima-antígeno (cantidad constante)
- $\text{AgAb}_{\text{Btn}}$  = complejo antígeno-anticuerpo
- $\text{EnzAgAb}_{\text{Btn}}$  = Complejo de anticuerpo-Conjugado enzima-antígeno
- $k_a$  = Rango constante de asociación
- $k_{-a}$  = Rango constante de disociación
- $K = k_a/k_{-a}$  = Constante de equilibrio

Se produce una reacción simultánea entre la biotina unida al anticuerpo y la estreptavidina adsorbida en el micro pocillo. Esto permite la separación de la fracción unida al anticuerpo tras el proceso de aspiración o decantación (AccuBind® ELISA, 2019).

- **Unión y lavados**

Estos dos procesos son cruciales, ya que durante las distintas etapas del lavado se eliminan todas las moléculas libres que no han reaccionado. Esto ayuda a evitar interferencias no deseadas y asegura que la unión se



realice de manera correcta, sin la presencia de fracciones libres que puedan interferir. (Suárez, 2017).

- **Tiempos de incubación y temperaturas**

Es fundamental garantizar que tanto el tiempo como la temperatura de incubación sean adecuados en cada fase, ya que incluso una pequeña variación en cualquiera de estas dos variables puede provocar cambios significativos en los resultados del ensayo.. Por eso se debe trabajar con equipos bien calibrados, estufas de incubación, frigoríficos o congeladores en los que la temperatura sea exacta y no tenga leves variaciones y ser especialmente cuidadosos a la hora de finalizar una fase del ensayo y comenzar la siguiente, evitando que transcurra más o menos tiempo de incubación del adecuado (Suárez, 2017).

- **Enzimas y sustratos**

Las enzimas actúan como elementos marcadores debido a su notable capacidad catalítica, su alta especificidad, la amplia variedad de sustratos con los que pueden interactuar, y la considerable estabilidad de los conjugados que forman (Ochoa, 2012).

Las enzimas más utilizadas en los ensayos heterogéneos (todas las modalidades de ELISA) incluyen: peroxidasa, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucosa oxidasa, ureasa, glucoamilasa, acetilcolinesterasa, glutamato descarboxilasa y anhidrasa carbónica. De estas, las que se emplean con mayor frecuencia son la fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano picante y la  $\beta$ -galactosidasa. No obstante, existen otras como son: microperoxidasa y citocromo C, entre otras (Ochoa, 2012).



- **Anticuerpos y antígenos empleados**

En el método ELISA, es fundamental utilizar los anticuerpos (Abs) y antígenos (Ags) de forma adecuada para cumplir con el objetivo establecido, lo que garantiza su calidad y pureza. Si se obtienen de proveedores comerciales, deben incluir un certificado de análisis que proporcione información sobre el producto, así como el número de lote de fabricación (Suárez, 2017).

- **Lector ELISA**

Los lectores de ELISA son espectrofotómetros que pueden realizar lecturas en serie de cada pocillo de la placa. Al igual que los espectrofotómetros convencionales, estos dispositivos son capaces de medir diversas longitudes de onda en el rango ultravioleta y visible. Sin embargo, los lectores de ELISA más utilizados cuentan con un sistema de filtros que permite la lectura de un conjunto específico de longitudes de onda, enfocándose en la adsorción de los cromógenos más comunes. Además, existen sistemas de detección que son colorimétricos, fluorescentes y luminiscentes (Coello, 2010).



## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. LUGAR DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro Experimental Chuquibambilla de la Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano, que se encuentra ubicado en el distrito de Umachiri provincia de Melgar del departamento de Puno con una altitud de 3910 msnm, con latitud de 15° 16'45" y con una longitud de 70° 04'25" a una temperatura de 20.4°C como máximo, así mismo se presenta una temperatura mínima de 0.4°C, con una precipitación pluvial de 739.93mm/año y su humedad relativa es de 57.71% promedio (SENAMHI, 2021).

El Centro Experimental Chuquibambilla cuenta con una gran superficie de pasto natural. Estas praderas están divididas en potreros y pastoreo extensivo. Según el mapa ecológico del Perú, el centro experimental se encuentra ubicado en la zona agroecológica de puna húmeda debido a la limitación de las estaciones lluviosas y secas (Zúñiga, 2018).

#### 3.2. MATERIAL DE ESTUDIO

Para el trabajo de investigación se utilizaron 30 alpacas de la raza Suri las cuales fueron divididas en grupo post transferencia de embriones y post monta natural con 15 alpacas Suri cada grupo, tomando en cuenta que las alpacas tuvieran al menos un parto, con una condición corporal de 3 de una escala de 1 a 5 alimentadas con pastos naturales, además estos animales fueron alimentados en praderas naturales a campo abierto.

**Tabla 1**

*Distribución de animales en grupos experimentales*

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>ALPACAS SURI</b>
Alpacas post transferencia de embriones	15
Alpacas post monta natural	15

Fuente: Elaboración propia

### **3.3. MATERIALES Y EQUIPOS**

- Cuaderno de campo
- Pintura en spray
- Sogas
- Alcohol
- Algodón
- Papel absorbente
- Jeringas hipodérmicas de 1, 3 ,5, 20 y 60 ml
- Jeringa tuberculina
- Guantes de inspección
- Guantes ginecológicos
- Prostaglandina F2 $\alpha$
- GnRH (acetato de buseralina)
- Ecógrafo IMV imgaging.
- Estereoscopio.
- Lector de ELISA
- Centrifuga
- Refrigeradora



- Baño María

### 3.4. METODOLOGÍA

#### 3.4.1. Niveles de cortisol sérico en alpacas Suri post transferencia de embriones.

- Obtención de embriones de las donadoras

Se seleccionaron 15 alpacas Suri de una condición corporal de 3 a 3.5 en una escala del 1 al 5, las cuales se utilizaron como donadoras y fueron servidas naturalmente, posterior a ello al día 8 post monta se realizó el lavado, evaluación y transferencia de embriones hacia el grupo de alpacas post transferencia de embriones.

- Preparación de las receptoras

Para la sincronización de alpacas se inició aplicando el día “0” un análogo de GnRH (acetato de buserelina) a una dosis de 2 ml (0.0042 mg: Gestar® - Over - Argentina) por vía intramuscular, cuando el folículo preovulatorio alcanzó un diámetro de  $\geq 7$  mm., el día “9” se administró 1 ml de prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF: 0.075 mg: Cloprostenol: Prostal® Over - Argentina) por vía intramuscular (IM), el día “11” se aplicó una segunda dosis de análogo de GnRH por vía IM para asegurar la ovulación y la formación del cuerpo lúteo, y finalmente el día “18” se realizó una evaluación ultrasonográfica del ovario para observar la presencia del cuerpo lúteo (CL), utilizando el modo B del ecógrafo IMV imaging.

Posteriormente las alpacas receptoras fueron trasladadas al laboratorio de Biotecnología de la reproducción del Centro experimental Chuquibambilla, para realizar la transferencia de embriones como se detalla a continuación:



- Procedimiento:
  - a. Una vez preparada la pistola de inseminación, que contiene el embrión dentro de la pajilla.
  - b. Se llevó a la alpaca suri del grupo de post transferencia de embriones al laboratorio, donde fue asegurada en la mesa de trabajo, y se realizó una limpieza rectal, retirando el contenido fecal con la mano enguantada y bien lubricada.
  - c. A continuación, se insertó el transductor lineal del ecógrafo IMV Imaging, con una frecuencia de 6.5 MHz, para visualizar el cuerpo lúteo.
  - d. Una vez localizado el cuerpo lúteo, se introdujo la pistola de inseminación con la pajilla que contiene el embrión, avanzando transcervicalmente hasta alcanzar la parte distal del cuerno uterino ipsilateral.
  - e. Finalmente, realizado la transferencia de embriones, se realizó la obtención de la muestra sanguínea para su respectivo análisis.

#### **3.4.2. Niveles de cortisol sérico en alpacas Suri post monta natural**

Se seleccionaron 15 alpacas Suri de una condición corporal de 3 a 3.5, las cuales estaban receptivas al apareamiento con los reproductores Suri, una vez terminada la monta natural, se tomaron las muestras de sangre para obtener el suero sanguíneo y luego se determinaron los niveles de cortisol sérico mediante la prueba de ELISA, cuya metodología es de la siguiente manera:

- Obtención de muestra de sangre

La obtención de las muestras de sangre se realizó inmediatamente después de la transferencia de embriones y se utilizó una aguja Vacutainer 21g x 1, tubos vacutainer sin anticoagulante. Se extrajo sangre de la vena yugular con una jeringa



de 5 ml. Primero se depiló la zona del cuello y se desinfectó el surco yugular de la alpaca con una gasa impregnada en alcohol. Luego, se realizó la punción en la vena para recoger entre 3 y 4 ml de sangre, que se depositó en un tubo Vacutainer con tapa roja, sin anticoagulante. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos para separar el suero, que se utilizaría en la prueba de cortisol.

- Procedimiento para realizar la prueba de cortisol

Antes de realizar la prueba, se trasladaron al Laboratorio de Sanidad del Centro Experimental Chuquibambilla de la Universidad Nacional del Altiplano todos los reactivos, calibradores de suero de referencia y controles, manteniéndolos a temperatura ambiente (20 – 27 °C). El kit empleado fue de la marca AccuBind® ELISA, importado desde Lake Forest, condado de Orange, California, EE. UU.

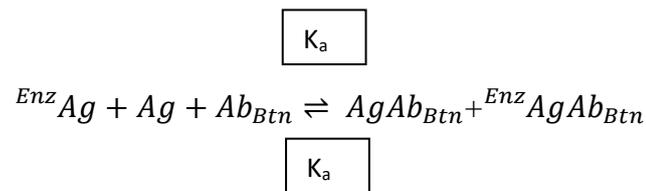
- Prueba de ELISA
  - ELISA cuantitativo

El Elisa cuantitativo se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígenoanticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar sobre la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro (Benenaula, 2010).

- Cortisol Accubind Elisa

El kit Accu Bind ELISA Microwells de California, EE. UU., contiene los reactivos esenciales necesarios para realizar un ensayo inmunoenzimático, los cuales incluyen un anticuerpo, un conjugado de enzima-antígeno y el antígeno nativo. Al combinar el anticuerpo biotinilado, el conjugado enzima-antígeno y un suero que contiene el antígeno nativo, se genera una reacción competitiva entre el antígeno nativo y el conjugado enzima-antígeno para ocupar los sitios de unión limitados del anticuerpo. Esta interacción se muestra en la siguiente ecuación (Accu Bind ELISA Microwells, 2024).

- Ecuación de inmunoensayo enzimático competitivo



- Ab Btn = Anticuerpo biotinilado (cantidad constante)
- Ag = Antígeno nativo (cantidad variable)
- EnzAg = Conjugado enzima antígeno (cantidad constante)
- AgAb Btn = Complejo antígeno anticuerpo
- Enz AgAb Btn = Complejo conjugado enzima-antígeno-anticuerpo
- Ka = Tasa constante de asociación
- k-a = Constante de tasas de disociación
- K = ka/k-a = Equilibrio constante

Se genera una reacción simultánea entre la biotina unida al anticuerpo y la estreptavidina fijada en el micropocillo. Esto permitirá la separación de la fracción unida al anticuerpo después de realizar la decantación o aspiración.



- Procedimiento Determinación de la concentración de cortisol

El kit que se utilizó es de la marca Accu Bind ELISA Microwells de California, USA. Así mismo el procedimiento de prueba se realizó por personas y profesionales capacitados.

- Se prepararon los pocillos de las microplacas, asignando un pozo para cada suero de referencia, control y muestra de los animales, realizando el análisis por duplicado.
- Se pipetearon 25  $\mu$ L del suero (ya sea control o muestra) en el pozo correspondiente.
- Se añadió 50  $\mu$ L del reactivo enzimático para cortisol en cada pocillo.
- Se agitó suavemente la microplaca durante 20 a 30 segundos para asegurar una mezcla adecuada.
- Se incorporaron 50  $\mu$ L del reactivo biotina-cortisol en todos los pocillos.
- Se volvió a agitar suavemente la microplaca durante 20 a 30 segundos para mezclar los reactivos.
- Se cubrió la microplaca e incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente.
- Se eliminó el contenido de los pocillos mediante decantación y se secó el plato con papel absorbente.
- Se vertieron 350  $\mu$ L de tampón de lavado en cada pocillo y se decantó; este paso se repitió dos veces más, realizando un total de tres lavados.
- Se añadieron 100  $\mu$ L de solución de sustrato de trabajo en todos los pocillos.
- Se incubó la microplaca durante 15 minutos a temperatura ambiente.

- Se incorporaron 50  $\mu$ L de solución Stop o de parada en cada pocillo y se mezcló suavemente durante 15 a 20 segundos.

Finalmente, se midió la absorbancia de cada pocillo a 450 nm utilizando un lector de microplacas (Accu Bind ELISA Microwells, 2024).

### 3.5. MÉTODO ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics, versión 25. Los resultados fueron sometidos a la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney para variables independientes, para la prueba de normalidad se tomó en cuenta el test de Shapiro-Wilk, el análisis estadístico se realizó con un margen de error del 5%. Los datos sobre los niveles de cortisol de alpacas Suri post monta natural y post transferencia de embriones fueron analizados a través de la prueba estadística de U de Mann-Whitney la siguiente formula:

$$U_1 = n_1n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - \sum R_1$$

$$U_2 = n_1n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - \sum R_2$$

Donde:

$U_1$  y  $U_2$  = valores estadísticos de U Mann-Whitney.

$n_1$  = Tamaño de la muestra del grupo 1.

$n_2$  = Tamaño de la muestra del grupo 2.

$R_1$  = Sumatoria de los rangos del grupo 1.

$R_2$  = Sumatoria de los rangos del grupo 2.

## CAPITULO IV

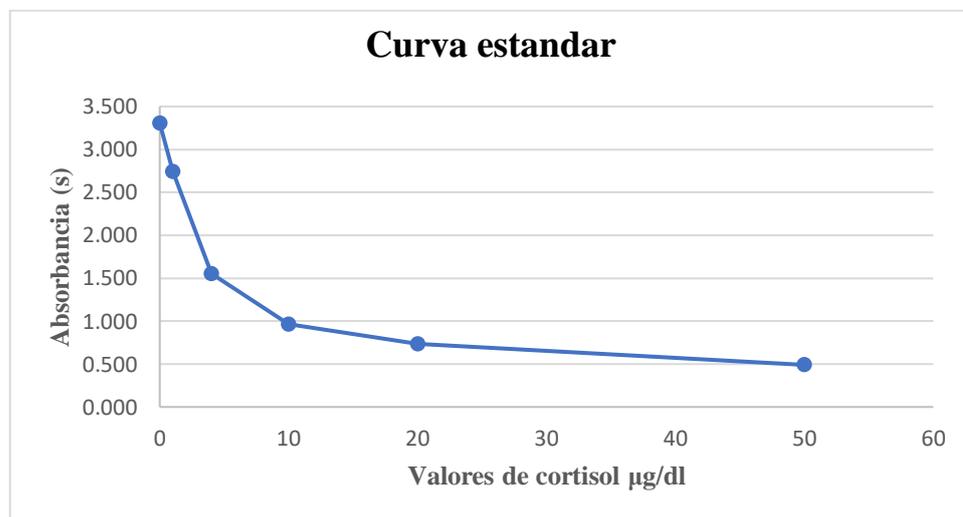
### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTISOL SÉRICO EN ALPACAS SURI POST TRANSFERENCIA DE EMBRIONES Y POST MONTA NATURAL.

Para la comparación de los niveles de cortisol sérico de ambos grupos de alpacas Suri, primero se determinó la fracción de cortisol unida al anticuerpo, tras añadir el sustrato, y luego se procedió a registrar la absorbancia a 450 nm, como se observa en la figura 2.

#### Figura 2

*Curva estándar de los datos de absorbancia y valores de cortisol en  $\mu\text{g}/\text{dl}$  esta investigación en alpacas Suri post transferencia de embriones y post monta natural*

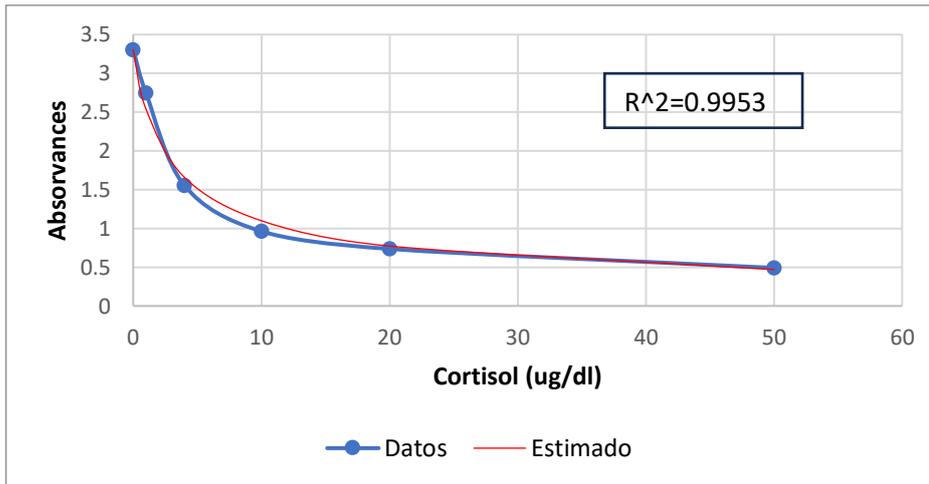


Los resultados obtenidos con el equipo de ELISA se presentan en un gráfico donde el eje y (lineal) muestra los valores de absorbancia, mientras que el eje x (logarítmico) refleja la concentración, con un ajuste mediante spline cúbico, permitiendo obtener el valor en  $\mu\text{g}/\text{dl}$ .

Para convertir los resultados de absorbancia a 450 nm a  $\mu\text{g/dl}$ , se utilizó una hoja de cálculo de Microsoft Excel, donde se derivó la ecuación a partir de la gráfica de dispersión con líneas rectas y marcadores, como se observa en la figura 3.

**Figura 3**

*Dispersión de líneas rectas y marcadores*



En la tabla 2, se observan los valores de la placa de micro titulación a una absorbancia de 450 nm, en el lector de microplacas ELISA.

**Tabla 2**

*Placa de micro titulación analizadas en el lector automático de Microplacas ELISA:  
absorbancia a 450nm*

Lectura de absorbancia a 450 nm de muestras de sangre de alpacas Suri					
Grupo post transferencia de embriones	1.770	1.377	1.597	1.414	1.093
	1.411	0.894	1.353	1.539	1.388
	1.495	1.758	1.176	1.483	1.343
	1.779	2.487	1.761	1.446	1.753
Grupo post monta natural	2.136	2.229	2.165	1.453	1.704
	2.479	2.204	1.214	1.647	1.943

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 3, se observan los valores de los niveles de cortisol sérico de alpacas Suri post transferencia de embriones y post monta natural

**Tabla 3**

*Niveles de cortisol sérico ( $\mu\text{g/dl}$ ) de alpacas Suri post transferencia de embriones y post monta natural*

Niveles de cortisol ( $\mu\text{g/dl}$ )					
Grupo post transferencia de embriones	3.382	6.189	4.385	5.831	10.121
	5.859	15.107	6.436	4.793	6.080
	5.131	3.443	8.700	5.228	6.542
Grupo post monta natural	3.337	1.100	3.427	5.541	3.469
	1.956	1.693	1.870	5.480	3.732
	1.115	1.760	8.136	4.065	2.616

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 4, se observa la comparación entre los valores de cortisol post transferencia de embriones y post monta natural.

**Tabla 4**

*Concentración de cortisol en  $\mu\text{g/dl}$  en alpacas post transferencia de embriones y post monta natural*

Tratamiento	n	Media $\mu\text{g/dl}$	Desviación estándar $\mu\text{g/dl}$	Mínimo	Máximo	IC Media 95%	Sig. Asintótica (bilateral)
Post transferencia de embriones	15	6.48 <sup>a</sup>	2.97	3.38	15.11	[4.84 – 8.12]	0.001
Post monta natural	15	3.29 <sup>b</sup>	1.94	1.10	8.14	[2.21 – 4.36]	

Nota: a,b Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística altamente significativa p-valor “Sig. Asintótica (bilateral)” = 0.001<0.05) realizado con la prueba de U de Mann- Whitney.



En la tabla 4 los niveles de cortisol en las alpacas fueron significativamente diferentes entre los dos tratamientos evaluados. En el tratamiento post transferencia de embriones, los niveles de cortisol fueron más altos, con una media de 6.48  $\mu\text{g}/\text{dl}$ , lo que sugiere una respuesta de estrés mayor a este procedimiento en comparación con el tratamiento post monta natural, donde la media fue de 3.29  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . La desviación estándar y el coeficiente de variabilidad indican que, aunque los niveles de cortisol fueron más bajos en el tratamiento post monta natural, la variabilidad entre los individuos es considerablemente mayor.

Los resultados obtenidos, se encuentran dentro del rango normal mencionado por Larry, (2012), que reportó concentraciones plasmáticas de cortisol en mamíferos de 4 a 16  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . Además, debemos indicar que son pocos los estudios de niveles de cortisol que se han realizado en alpacas durante el desarrollo de los procedimientos en biotecnología de la reproducción como es la transferencia de embriones. Sin embargo, al comparar nuestros resultados con otros autores que midieron cortisol sérico en otras especies como vaquillas durante procedimientos como la aspiración folicular, se observaron valores similares de cortisol de 6.68  $\text{ug}/\text{ml}$ , las cuales tuvieron una menor proporción de ovocitos viables recuperados y menor proporción de gestaciones (Gomes et al., 2008). Es así que, el estrés puede tener efectos significativos en la fisiología reproductiva de los animales, como se observó también en el estudio de Faria et al., (2023).

Por otro lado, estos resultados son consistentes con la investigación de Prágai & Kovács (2020), donde se observó un aumento de cortisol en alpacas durante procedimientos estresantes como la esquila. Además, la movilización y manipulación de los animales a un entorno desconocido es el momento en el que el estrés por manejo produce mayores efectos perjudiciales sobre la reproducción, esta acción puede provocar un aumento en los niveles de cortisol en los animales y causar una respuesta



desfavorable a los programas de transferencia de embriones (Córdova–Izquierdo et al., 2008). Además, la medición de la concentración de glucocorticoides en sangre presenta inconvenientes ya que la toma de la muestra por sí misma es un procedimiento estresante para el animal (Keay et al., 2006).

Aunque los tratamientos en este estudio no son exactamente los mismos, el patrón de mayores niveles de cortisol durante un procedimiento invasivo como la transferencia de embriones se alinea con lo que se espera en situaciones de estrés elevado. Es posible que la transferencia de embriones, al ser un proceso más invasivo, cause un estrés fisiológico más intenso que la monta natural, lo que explicaría los niveles de cortisol más elevados observados.

En adición, Díaz, (2016) reportó diferencias significativas en los niveles de cortisol en animales bajo condiciones de estrés, lo que respalda la idea de que los procedimientos invasivos o desconocidos pueden inducir una respuesta de estrés. Además, el cortisol como un indicador del nivel de estrés sugiere que las alpacas podrían estar enfrentando un estrés adicional durante el proceso de transferencia, lo que podría tener implicaciones en su bienestar general (Rosiára et al., 2016).

El análisis comparativo de los niveles de cortisol en alpacas con los niveles observados en otros estudios de especies animales, como caballos y vacas, permite una mejor comprensión de las respuestas al estrés en distintas condiciones. En el estudio de González (2023), los niveles de cortisol en equinos fueron más elevados (media de 6.73  $\mu\text{g}/\text{dl}$  en machos) y comparables a los niveles observados en el tratamiento post transferencia de embriones en este estudio (6.48  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ). Esto sugiere que, en situaciones de estrés moderado a intenso, los niveles de cortisol pueden ser similares entre distintas



especies, especialmente cuando están sometidas a procesos que requieren intervención humana.

Por otro lado, los estudios de Gálvez (2019) en vacas y Díaz (2016) en cabras mostraron que los niveles de cortisol también variaban según las condiciones del manejo, como el encierro y el estrés ambiental. Estas investigaciones refuerzan la idea de que los niveles de cortisol en los animales son una medida importante del estrés, y que los procesos reproductivos o el manejo inadecuado pueden generar un aumento en los niveles de esta hormona. Sin embargo, los resultados de este estudio también indican que los tratamientos de monta natural, aunque asociados con menores niveles de cortisol en comparación con la transferencia de embriones, aún pueden generar un estrés fisiológico, aunque en menor medida.

Contrariamente a nuestro resultado, Norrby et al., (2007) indica que durante la inseminación artificial, el nivel de cortisol es menor que cuando se usa la monta natural.

El estrés es un factor crítico que afecta la fisiología reproductiva de los animales, y se ha demostrado que influye en los niveles hormonales, especialmente el cortisol, que es un biomarcador del estrés, en alpacas Suri el estrés inducido por procesos reproductivos, como la transferencia de embriones o la monta natural, puede alterar significativamente los niveles de cortisol, afectando su bienestar y rendimiento reproductivo. Asimismo, la activación del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) está vinculada con la estimulación del eje HHA (hipotálamo-hipófisis-adrenal) y la liberación de glucocorticoides. La respuesta comienza con la estimulación del núcleo paraventricular del hipotálamo, que libera CRH y vasopresina, que viajan a la adenohipófisis para estimular la producción de ACTH, esta hormona activa las glándulas adrenales, donde se producen cortisol, andrógenos y aldosterona. Como es conocido, en



el ámbito de la producción animal existe una serie de prácticas de manejo e interacciones humano-animal que se requieren para la mejora de eficiencia productiva y reproductiva de los animales domésticos, tales como la manipulación, la aplicación de técnicas reproductivas, mecanismos y medios de transporte, entre otros. Esto puede implicar incomodidad o incluso dolor para los animales, lo cual generará estrés y, por consiguiente, cambios comportamentales, fisiológicos que conllevan a la disminución de su bienestar y debilitarán el funcionamiento reproductivo de las hembras (Mpakama et al., 2014).



## V. CONCLUSIONES

**PRIMERA:** La concentración media de cortisol en alpacas Suri post transferencia de embriones fue de 6.48  $\mu\text{g/dl}$  y la media de cortisol en alpacas Suri post monta natural fue de 3.29  $\mu\text{g/dl}$ , existiendo una diferencia significativa en los niveles de cortisol entre las alpacas Suri tras la transferencia de embriones y aquellas después de la monta natural, observándose concentraciones mayores en el grupo post transferencia de embriones.



## VI. RECOMENDACIONES

**PRIMERA:** Fomentar estudios adicionales que analicen otras variables que puedan influir en los niveles de cortisol, como la raza, la sanidad y el manejo, para obtener una visión más completa del bienestar en programas de reproducción de alpacas.

**SEGUNDA:** Asegurarse de que el ambiente donde se realiza la transferencia de embriones sea tranquilo y cómodo para las alpacas, utilizando técnicas de manejo que minimicen el estrés, como el uso de técnicas de inmovilización adecuadas y la provisión de enriquecimiento ambiental.

**TERCERA:** Se recomienda investigar en cuanto a la tasa de preñez en alpacas Suri para complementar el estudio.

**CUARTA:** Se recomienda también realizar investigaciones en condiciones de altitud para evaluar el cortisol con distintas técnicas y kits de distintos fabricantes.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abyntek. (2019). *Tipos de ELISA*. <http://www.abynetek.com/tipos-de-elisa/>
- Accu Bind ELISA Microwells. (2024). *Monobind Inc. Lake Forest, CA 92630, USA*. 2024.
- AccuBind® ELISA. (2019). *Cortisol Test System Product Code : 3625-300*. 4, 0–1. [file:///C:/Users/HP/Downloads/Monobind Cortisol elisa.pdf](file:///C:/Users/HP/Downloads/Monobind%20Cortisol%20elisa.pdf)
- Adams, G. P., & Ratto, M. H. (2013). Ovulation-inducing factor in seminal plasma: A review. *Animal Reproduction Science*, *136*(3), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.004>
- Adams, G. P., Ratto, M. H., Huanca, W., & Singh, J. (2005). Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biology of Reproduction*, *73*(3), 452–457. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.040097>
- Ahmed, A. A., Ma, W., Ni, Y., Wang, S., & Zhao, R. (2014). Corticosterone in ovo modifies aggressive behaviors and reproductive performances through alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the chicken. *Animal Reproduction Science*, *146*(3–4), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.013>
- Alende, M., Volpi Lagreca, G., Pordomingo, A. J., Pighín, D., Grigioni, G., Carduza, F., Pazos, A., Babinec, F., & Sancho, A. M. (2014). Effects of transport, lairage and ageing time on stress indicators and on instrumental and sensory quality of beef from steers. *Archivos de Medicina Veterinaria*, *46*(2), 217–227. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2014000200007>
- Arias C., N., & Velapatiño, B. (2015). Cortisol como indicador fiable del estrés en alpacas y llamas. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, *26*(1), 1. <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i1.10915>
- Ávila, J. (2014). "El estrés un problema de salud del mundo actual". *Revista Con Ciencia*, *2*, 115–124.
- Benatti, L. (2010). Avaliação do cortisol, perfil hematológico e proteico na resposta dos bovinos ao estresse. *Vet J*, *159*, 201–206.



- Beneanula, D. (2010). Determinación de inmunoglobulina a en suero sanguíneo por los métodos de inmunodifusión radial y elisa cuantitativo indirecto en niños de edad escolar. *Universidad De Cuenca Facultad De Ciencias Químicas Escuela De Bioquímica Y Farmacia*, 65–80. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2462/1/tq1003.pdf>
- Benenaula, D. (2010). *Determinación de la inmunoglobulina A en suero sanguíneo por los métodos de inmunodifusión radial y Elisa cuantitativo indirecto en niños de edad escolar*. Universidad de Cuenca.
- Bravo, P. W., Garnica, J., & Aviles, E. (2001). Short communication: Cortisol concentrations in the perinatal and weaning periods of alpacas. *Animal Reproduction Science*, 67(1–2), 125–129. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00112-9](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00112-9)
- Budzyńska, M., Kapustka, J., & Stępniewska, A. (2024). Behavioural and neuroendocrine responses in alpacas (*Vicugna pacos*) to the shearing procedure. *Small Ruminant Research*, 240(July). <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2024.107383>
- Bulitta, F. S., Aradom, S., & Gebresenbet, G. (2015). Effect of Transport Time of up to 12 Hours on Welfare of Cows and Bulls. *Journal of Service Science and Management*, 08(02), 161–182. <https://doi.org/10.4236/jssm.2015.82019>
- Buñay, T. (2019). Diagnóstico comparativo de moquillo en caninos (*Canis lupus familiaris*) machos y hembras mediante la técnica ELISA cuantitativa y ELISA cualitativa [Universidad Politécnica Salesiana]. In *Universidad Politécnica Salesiana De Cuenca*. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/17819>
- Candiani, D., Salamano, G., Mellia, E., Doglione, L., Bruno, R., Toussaint, M., & Gruys, E. (2008). A combination of behavioral and physiological indicators for assessing pig welfare on the farm. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1080/10888700701729080>
- Carbonero, A., Maldonado, A., Perea, A., García-Bocanegra, I., Borge, C., Torralbo, A., Arenas-Montes, A., & Arenas-Casas, A. (2011). Factores de riesgo del Síndrome respiratorio bovino en terneros lactantes de Argentina. *Archivos de Zootecnia*,



60(229), 41–51. <https://doi.org/10.21071/az.v60i229.4687>

- Ceballos, D., Villa, M., Zinerman, M., Opazo, W., & Tracaman, J. (2013). *Evaluación de canales e indicadores fisiológicos de estrés en ovejas merino de refugio faenadas a diferente tiempo post esquila*. 1–8.
- Coello, D. (2010). *Técnica de Elisa (Enzyme Linked immunoabsorbent assay) Método de Elisa y micro Elisa*. Universidad de la Salle.
- Córdova–Izquierdo, A., Córdova–Jiménez, C. A., Córdova–Jiménez, M. S., Saltijeral–Oaxaca, J. A., Ruiz–Lang, C. G., Xolalpa–Campos, V. M., Cortés–Suárez, S., & Guerra–Liera, J. E. (2008). Efecto de la mastitis y el estrés sobre la reproducción de la vaca. *Revista Veterinaria*, 19(2), 161. <https://doi.org/10.30972/vet.1921899>
- Cortés, C., Escobar, A., Cebada, J., Soto, G., Bilbao, T., & Vélez, M. (2018). Estrés y cortisol: implicaciones en la ingesta de alimento. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 37(3), 1–15. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002018000300013](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002018000300013)
- Dallman, M. (2003). Stress by any other name...? *Horm Behav*, 18–20. [https://doi.org/10.1016/S0018-506X\(02\)00034-X](https://doi.org/10.1016/S0018-506X(02)00034-X)
- Dehnhard, M., Schreer, A., Krone, O., Jewgenow, K., Krause, M., & Grossmann, R. (2003). Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). *General and Comparative Endocrinology*, 131(3), 345–352. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00033-9](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00033-9)
- Díaz, M. (2016). *Efecto del estrés ambiental y social en la reproducción de cabras criollas*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Dickens, M., Delehanty, D., & Romero, L. (2010). Stress: an inevitable component of animal translocation. *Elsevier Biological Conservation*, 143, 1329–1341. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.02.032>
- Edwards, L., Rahe, C., Griffen, J., Wolfe, D., Marple, D., Cummins, K., & Prichet, J.



- (1987). Efecto del estrés del transporte sobre la función ovárica en novillas Hereford superovuladas. *Teriogenología*, 28, 291–299.
- Faria, N., Pacheco-Lima, J., da Silva, M. H. M., Borba, A., & da Silva, J. F. M. (2023). Effects of cortisol levels on reproductive success in cattle of different temperaments during fixed-time artificial insemination (FTAI). *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology*, 12(1). <https://doi.org/10.31893/jabb.2024002>
- Fernández-Baca, S. (1991). *Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos* (Santiago de Chile : Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe (ed.)). [https://bibliotecadigital.uchile.cl/discovery/fulldisplay?docid=alma991002649259703936&context=L&vid=56UDC\\_INST:56UDC\\_INST&lang=es&adaptor=LocalSearchEngine&tab=Everything&query=title,exact,Avances en investigación,AND&mode=advanced](https://bibliotecadigital.uchile.cl/discovery/fulldisplay?docid=alma991002649259703936&context=L&vid=56UDC_INST:56UDC_INST&lang=es&adaptor=LocalSearchEngine&tab=Everything&query=title,exact,Avances+en+investigacion,AND&mode=advanced)
- Fernández-Baca, S., Hansel, W., & Novoa, C. (1970). Embryonic mortality in the alpaca. *Biol Reprod*, 3, 243–251. <https://doi.org/10.1093/biolreprod/3.2.243>
- Forshey, B. S., Moraes, C. R., Lakritz, J., Pinto, C. R. F., Coffman, E., Schanbacher, B. J., Place, N. J., & Coutinho da Silva, M. A. (2018). Embryo production by superovulation and dual siring in alpacas (*Vicugna pacos*). *Small Ruminant Research*, 162(63–68). <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.03.006>
- Frank, E. (2017). Curso de Manejo Reproductivo de Camelidos Sudamericanos Domesticos. *Sitio Argentino de Producción Animal.*, 28. [https://www.produccion-animal.com.ar/libros\\_on\\_line/23-curso\\_camelidos\\_1999/05-manejo\\_reproductivo.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/libros_on_line/23-curso_camelidos_1999/05-manejo_reproductivo.pdf)
- Gálvez, G. E. (2019). *Concentraciones séricas de cortisol en el proceso ante mortem en vacas cruzadas conducidas al matadero de Cajabamba - Cajamarca* [Universidad Nacional de Cajamarca]. <https://repositorio.unc.edu.pe/handle/20.500.14074/2957>
- García, A. S. (2018). *La producción de llamas y alpacas para la industria y la alimentación en la Región Pasco al año 2010 - 2017*. Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión.



- Gomendio, M., Roldán, E., Garde, J., & Espeso, G. (2006). El papel de las biotecnologías reproductivas en la conservación animal. *Ecosistemas*, 15(2):50–57.
- Gomes, O., Castillo, C., Ramos, E., Iwamura, J., & Oba, E. (2008). Concentração sérica de cortisol e temperatura retal no momento da aspiração folicular em vacas e suas correlações com o subsequente desenvolvimento embrionário. *Veterinária e Zootecnia*, 15(3), 510–520.  
<https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/1331/850>
- Gómez, S., Gutiérrez, M., Rueda, N., & Rodríguez, J. (1994). *La Inmunología en el Diagnóstico Clínico* (Centro Editorial Javeriano (ed.)).
- González, B. (2023). Determinación De Los Niveles Sanguíneos De Cortisol En Equinos (Equus Caballus) Aparentemente Sanos En Condiciones De Altitud. *Facultad De Ciencias Veterinarias Y Biológicas Carrera Profesional De Medicina Veterinaria Y Zootecnia*.
- González, B. (2023). *Determinación de los niveles sanguíneos de cortisol en equinos (Equus caballus) aparentemente sanos en condiciones de altitud*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Guzmán, E. (2004). Las pruebas de Elisa. *Gaceta Médica de México*, 140(3), 48–49.
- Herman, J., Figueiredo, H., Mueller, N., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M., Choi, D., & Cullinan, W. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo–pituitary–adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 24(3), 151–180.  
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2003.07.001>
- Herrid, M., Vajtac, G., & Skidmore, J. (2017). No TitleCurrent status and future direction of cryopreservation of camelid embryos Author links open overlay panel. *Theriogenology*, 89(20–25).  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.10.005>
- Herskin, M. S., & Munksgaard, L. (2004). Relations between adrenocortical and nociceptive responses toward acute stress in individual dairy cows. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 13(SUPPL. 1), 635–638.  
<https://doi.org/10.22358/jafs/74077/2004>



- Huanca, T., Gonzáles, M., Mamani-Cato, R., Cárdenas, O., Sapana, R., & Naveros, M. (2012). Twin reciprocal embryo transfer between alpacas and llamas. *ICAR. Satellite Meeting on Camelid Reproduction. Canada.*
- Joseph, D., & Whirledge, S. (2017). Stress and the HPA axis: Balancing homeostasis and fertility. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10). <https://doi.org/10.3390/ijms18102224>
- Keay, J. M., Singh, J., Gaunt, M. C., & Kaur, T. (2006). Fecal glucocorticoids and their metabolites as indicators of stress in various mammalian species: A literature review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 37(3), 234–244. <https://doi.org/10.1638/05-050.1>
- Koscinczuk, P. (2014). Ambiente, adaptación y estrés. *Revista Veterinaria*, 25, 67–76.
- Larry, E. (2012). Metabolic and Endocrine Physiology. In *Animal Physiology* (3ra. Edici). New York. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/b16175>
- López, J. (2021). Valoración De Los Niveles De Cortisol En Bovinos Aparentemente Sanos Mediante La Técnica De Elisa Cuantitativo En Condiciones De Altitud. *Universidad Politécnica Salesiana*, 1(1), 1–72. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/20182>
- Lowman, B., Scott, N., & Scott, P. (1994). Una evaluación de algunas opciones de manejo reproductivo en rebaños de carne en el Reino Unido. *Veterinario*, 135, 9–12.
- Lozano, R. R., Asprón, M. A., Vásquez, C. G., González, E., & Aréchiga, C. F. (2010). Efecto del estrés calórico sobre la producción embrionaria en vacas superovuladas y la tasa de gestación en receptoras. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 1(3), 189–203.
- Manteca, X., Mainau, E., & Temple, D. (2013). Estres en animales de granja: conceptos y efectos sobre la produccion. *Farm Animal Welfare Education*, 1(6), 2.
- Marroquín, A. (2018). Impacto del estrés calórico sobre los parámetros reproductivos del ganado bovino de leche. *Tesis de Pregrado*, 1–21. [https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/15775/4/2019\\_estres\\_calorico\\_parametros\\_reproductivos.pdf](https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/15775/4/2019_estres_calorico_parametros_reproductivos.pdf)



- Miragaya, M., Chaves, M., & Agüero, A. (2006). Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research*, 61(2–3), 199–310.
- Mpakama, T., Chulayo, A., & Muchenje, V. (2014). Bruising in slaughter cattle and its relationship with creatine kinase levels and beef quality as affected by animal related factors. *Asian Austral.* <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.-13483>
- Norambuena, C., Hernández, F., Alfaro, J., Cárcamo, G., Olavarría, Á., & Velasco, M. (2018). Relationship between the nutritional state before the breeding period and the reproductive success in alpacas (*Vicugna pacos*) from the Chilean Puna. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 50(1), 55–57. <https://doi.org/10.4067/s0719-81322018000100110>
- Norrby, M., Madsen, M., Alexandersen, C., Kindahl, H., & Madej, A. (2007). *Plasma concentrations of cortisol and PGF2 $\alpha$  metabolite in danish sows during mating, and intrauterine and conventional insemination.*
- Novoa, C. (1970). Reproduction in the Camelidae. *J Reprod. Fert.*, 22: 3-20.
- Ochoa, R. (2012). *Técnicas Inmunoenzimáticas Para Ensayos Clínicos De Vacunas Y Estudios Inmunoepidemiológicos* (Finlay). [http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/investigaciones/Tecnicas\\_inmunoenzimaticas\\_para\\_ensayos\\_clinicos\\_de\\_vacunas\\_y\\_estudios\\_inmunoepidemiologicos.pdf](http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/investigaciones/Tecnicas_inmunoenzimaticas_para_ensayos_clinicos_de_vacunas_y_estudios_inmunoepidemiologicos.pdf)
- Odeón, M. M., & Romera, S. A. (2017). Estrés en ganado: causas y consecuencias. *Revista Veterinaria*, 28(1), 69. <https://doi.org/10.30972/vet.2811556>
- Orellana, J., & Peralta, E. (2007). Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and Sexing Technologies. *Manual de Procedimientos Para El Laboratorio de Transferencia de Embriones En Bovinos de La Empresa Genetic Resources International (GRI) and Sexing Technologies*, 1–56. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/758/1/T2520.pdf>
- Otten, W., Kanitz, E., Couret, D., Veissier, I., Prunier, A., & Merlot, E. (2010). Maternal social stress during late pregnancy affects hypothalamic-pituitary-adrenal function and brain neurotransmitter systems in pig offspring. *Domestic Animal*



*Endocrinology*, 38(3), 146–156.  
<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2009.09.002>

- Pérez-Núñez, D., García-Viamontes, J., García-González, T. E., Ortiz-Vázquez, D., & Centelles-Cabrerías, M. (2014). Conocimientos sobre estrés, salud y creencias de control para la Atención Primaria de Salud. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 30(3), 354–363.
- Pimentel, G. (2009). *Efecto de la estimulación mecánica del clítoris antes de la inseminación artificial sobre la conducta y los niveles de cortisol en cerdas (Sus Scrofa domestica)* [Universidad Veracruzana].  
<https://cdigital.uv.mx/server/api/core/bitstreams/62f1400e-21d2-457d-82ac-c21390d4ce29/content>
- Prágai, A., & Kovács, A. (2020). Stress of alpacas caused by shearing in Hungary. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 26(1), 207–212.
- Raggi, L. A., Crossley, J. C., Marín, M. P., & Ferrando, G. (1994). Modificaciones adaptativas de algunas constantes fisiológicas de alpaca (*Lama pacos*) sometidas a cambios de ambiente. *Arch Zootec*, 43, 201–206.
- Ralph, C. R., & Tilbrook, A. J. (2016). Invited Review: The usefulness of measuring glucocorticoids for assessing animal welfare. *Journal of Animal Science*, 94(2), 457–470. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9645>
- Ramsey, I., & Tennant, B. (2012). *Manual de enfermedades infecciosas en pequeños animales* (Lexus). Acribia S.A.
- Ratto, M., Huanca, W., Singh, J., & Adams, G. (2006). Comparison of the effect of natural mating, LH and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas. *Anim. Reprod, Sci.* 91: 229-306.
- Ratto, M., Silva, M., Huanca, W., Huanca, T., & Adams, G. (2013). Induction of superovulation in South American camelids. *Animal Reproduction Science*, 136, 164–169.
- Ríos, J., Mercadillo, P., Yuil, E., & Ríos, M. (2012). ELISA and its applications in Dermatology. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 10(3), 212–222.



- [http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/investigaciones/Tecnicas inmunoenzimaticas para ensayos clinicos de vacunas y estudios inmunoepidemiologicos.pdf](http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/investigaciones/Tecnicas%20inmunoenzimaticas%20para%20ensayos%20clnicos%20de%20vacunas%20y%20estudios%20inmunoepidemiologicos.pdf)
- Rojas, O. (2006). *Inmunología (de memoria)*. Editorial Medica Panamericana. [https://books.google.com.ec/books?id=CtWACreo-BkC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=CtWACreo-BkC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Romero, M., Uribe-Velasquez, L., & Snachez, J. (2011). Stress biomarkers as indicators of animal welfare in cattle beef farming. *Biosalud*, 10(1), 71–87.
- Rosadio, R., Cirilo, E., Manchego, A., & Rivera, H. (2011). Respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses coexisting with *Pasteurella multocida* and *Mannheimia hemolytica* in acute pneumonias of neonatal alpacas. *Small Ruminant Research*, 97(1–3), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.02.001>
- Rosiára, D., Ian, M., Maria, C., & João, P. (2016). *Avaliação das concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona em vacas nelore (bos taurus indicus) submetidas a manejo diário ou manejo semanal*. 4(Januari), 17–25.
- Sapana, R., Huanca, T., Cárdenas, O., Mamani, R., Gonzáles, M., & Apaza, N. (2009). *Empadre controlado de alpacas Huacaya del CIP Quimsachata del INIA Puno*. 2009. [http://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/inia/489/1/Sapana-Empadre\\_controlado\\_de\\_alpacas.pdf](http://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/inia/489/1/Sapana-Empadre_controlado_de_alpacas.pdf)
- SENAMHI. (2021). *Servicio nacional de meteorología e hidrología*.
- Sheriff, M. J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., & Boonstra, R. (2011). Measuring stress in wildlife: Techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, 166(4), 869–887. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-1943-y>
- Silva, M., Paiva, L., & Ratto, M. H. (2020). Ovulation mechanism in South American Camelids: The active role of  $\beta$ -NGF as the chemical signal eliciting ovulation in llamas and alpacas. *Theriogenology*, 150, 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.078>



- Souza, M., Velásquez, L., Ramos, A., & Oba, E. (2006). Níveis Plasmáticos De Colesterol Total, Lipoproteínas De Alta Densidade (HDL) E Cortisol, E Sua Biorritmicidade, Em Carneiros Ideal-Polwarth. In *Ciência Animal Brasileira*, (Vol. 7, pp. 433–438).
- Stanchi, N. (2010). *Microbiología Veterinaria* (Intermédica (ed.)). [https://www.academia.edu/37283154/Stanchi\\_Microbiologia\\_Veterinaria](https://www.academia.edu/37283154/Stanchi_Microbiologia_Veterinaria)
- Suárez, I. (2017). *Metodología ELISA para estudiar la estabilidad de medicamentos biotecnológicos*. Universidad de Granada.
- Sumano, H., & Ocampo, L. (2006). *Farmacología Veterinaria* (McGraw- Hill Interamericana (ed.); 3ra ed.).
- Sumar, J. (1996). Reproduction in llamas and alpacas. *Anim. Rep. Sc*, 42, 405–415.
- Sumar, J. (2013). Embryo transfer in domestic South American camelids. *Anim Reprod*, 136, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.029>
- Svensson, C., Lundborg, K., Emanuelson, U., & Olsson, S. O. (2003). Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. *Preventive Veterinary Medicine*, 58(3–4), 179–197. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00046-1](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00046-1)
- Tadich, N. B. (2008). Claudicaciones en la vaca lechera y su relación con el bienestar animal. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, IX(10B).
- Tizard, I. (2017). *Inmunología Veterinaria*. In *Elsevier* (Octava, Vol. 01).
- Toghiani, S., Hay, E. H., Roberts, A., & Rekaya, R. (2020). Impact of cold stress on birth and weaning weight in a composite beef cattle breed. *Livestock Science*, 236(February), 104053. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104053>
- Torreão, J., Pimenta, F., Medeiros, A., Gonzaga, N., Catanho, M., Barreto, L., & Silva, J. (2008). Retorno da atividade cíclica reprodutiva em ovelhas da raça Morada Nova submetidas a diferentes níveis de energia metabolizável. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 9, 621–630. [https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/revista-brasileira-de-saude-e-producao-animal/9-\(2008\)-3/retorno-da-atividade-ciclica-reprodutiva-em-ovelhas-da-raca-morada-](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/revista-brasileira-de-saude-e-producao-animal/9-(2008)-3/retorno-da-atividade-ciclica-reprodutiva-em-ovelhas-da-raca-morada-)



nov/

- Urse, J. (2016). *Control de calidad de vacunas de uso en animales de producción*. Universidad de la República Uruguay.
- Vaughan, J., Mihm, M., & Wittek, T. (2013). Factors influencing embryo transfer success in alpacas - A retrospective study. *Anim Reprod Sci*, 136, 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.010>
- Velez, M., & Uribe, L. (2010). ¿Cómo afecta el estrés calórico en la reproducción? *Biosalud*, 9(2), 83–95.
- Viana, J., Diniz, A., Satrapa, R. A., Antônio, J., & Aqua, D. (2022). Bioclimatic interference in fertility in cows in the Amazon biome Interferencia bioclimática en la fertilidad en vacas del bioma amazónico Instituto Federal do Acre ( IFAC ). *Conjecturas*, 22. <https://doi.org/10.53660/CONJ-2153-2Z57>
- von Keyserlingk, M., Rushen, J., De Passillé, A., & Weary, D. (2009). The welfare of dairy cattle – Key concepts and the role of science. *J Dairy*. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2326>
- Zúñiga, E. (2018). *Eficiencia de la producción láctea de vacas Brown Swiss PPC, bajo el sistema de crianza semi-intensiva en CIP. Chuquibambilla – Puno*.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Panel fotográfico

#### Figura 4

*Selección de alpacas*



#### Figura 5

*Aplicación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)*



### Figura 6

*Aplicación de la hormona prostaglandina F2a*



### Figura 7

*Aplicación de la hormona GnRH*



### Figura 8

*Empadre del grupo de alpacas Suri post monta natural*



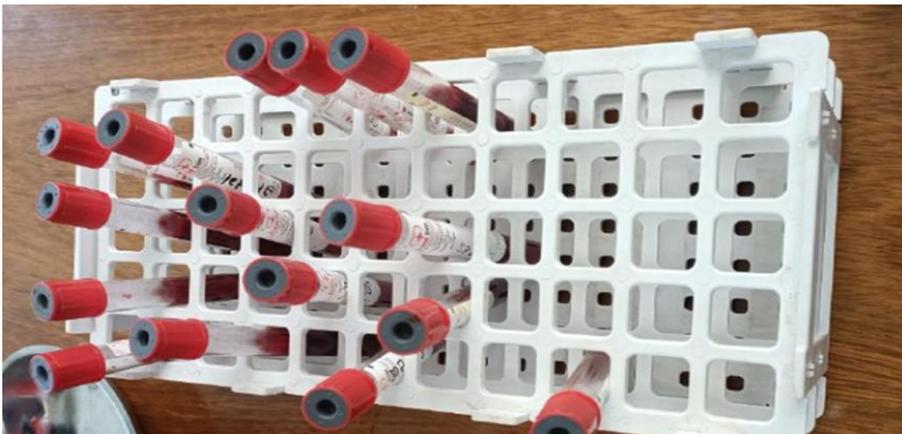
**Figura 9**

*Obtención de muestras de sangre*



**Figura 10**

*Toma de muestra de sangre del grupo de alpacas suri post monta natural*



**Figura 11**

*Materiales para lavado de embriones*



## Figura 12

*Sujeción del animal*



## Figura 13

*Introducción de catéter folley e insuflado con una jeringa*



## Figura 14

*Introducción de la solución para el lavado*



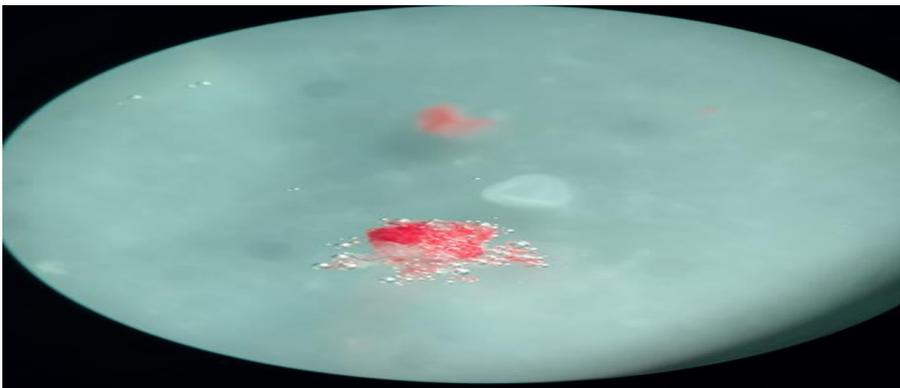
**Figura 15**

*Lavado hacia el filtro Emcon*



**Figura 16**

*En la observación al microscopio se ve al embrión de calidad media, contorno irregular*



**Figura 17**

*Preparación de la pistola de inseminación*



### **Figura 18**

*Colocación de la funda*



### **Figura 19**

*Introducción de la pistola de inseminación*



### **Figura 20**

*Desinfección del surco yugular y extracción de la sangre en un tubo Vacutainer*



**Figura 21**

*Muestra de suero sanguíneo*



**Figura 22**

*Kit ELISA*



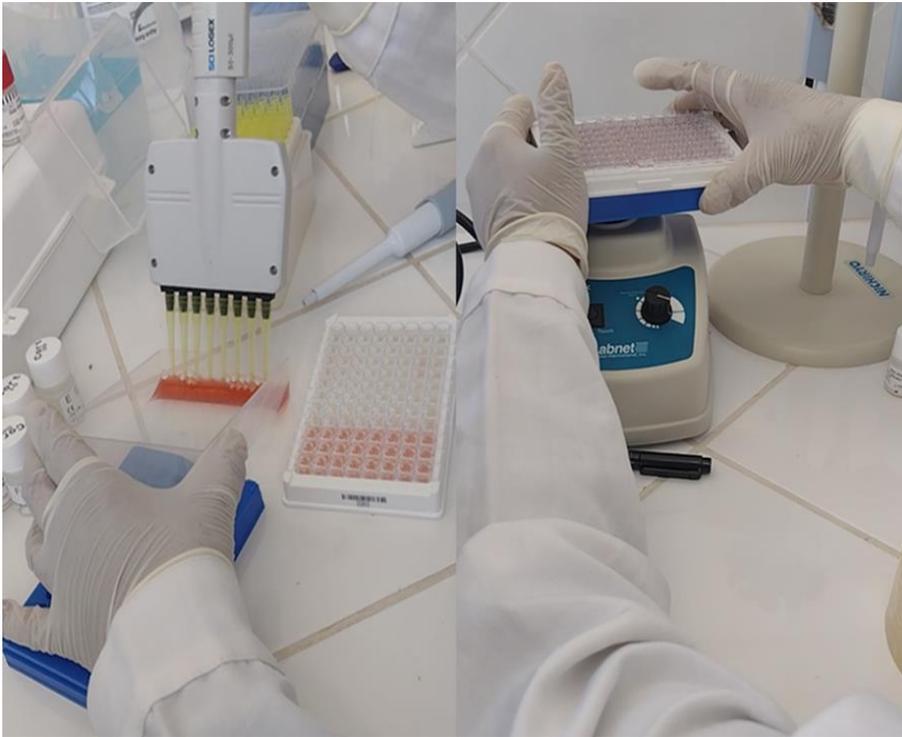
**Figura 23**

*Pipeteo de suero sanguíneo*



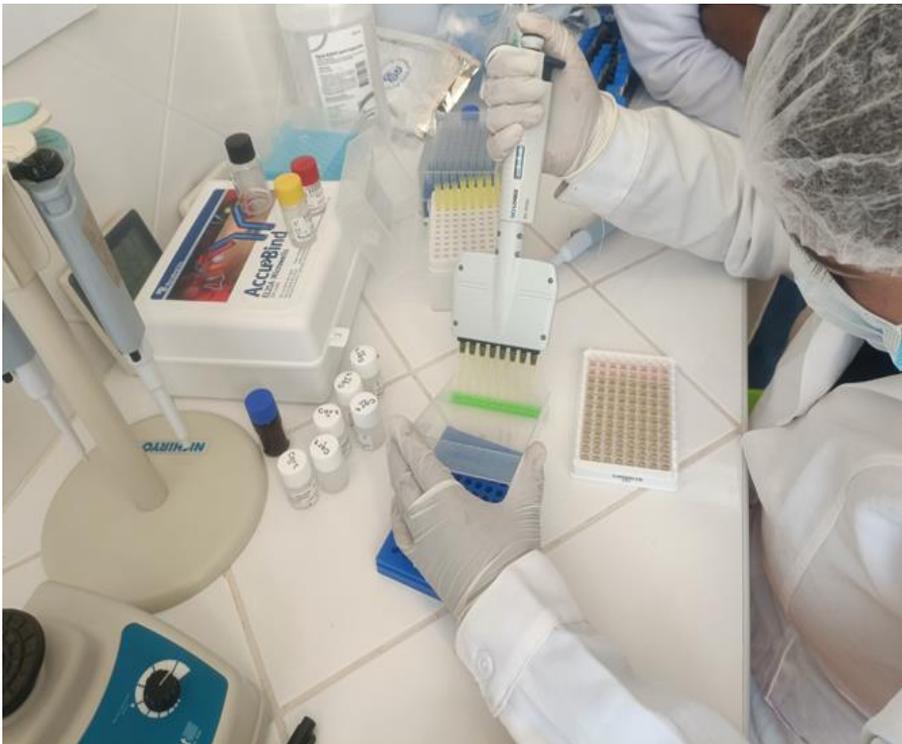
**Figura 24**

*Reactivo enzimático cortisol y la agitación en microplaca*



**Figura 25**

*Adición de reactivo de biotina cortisol*



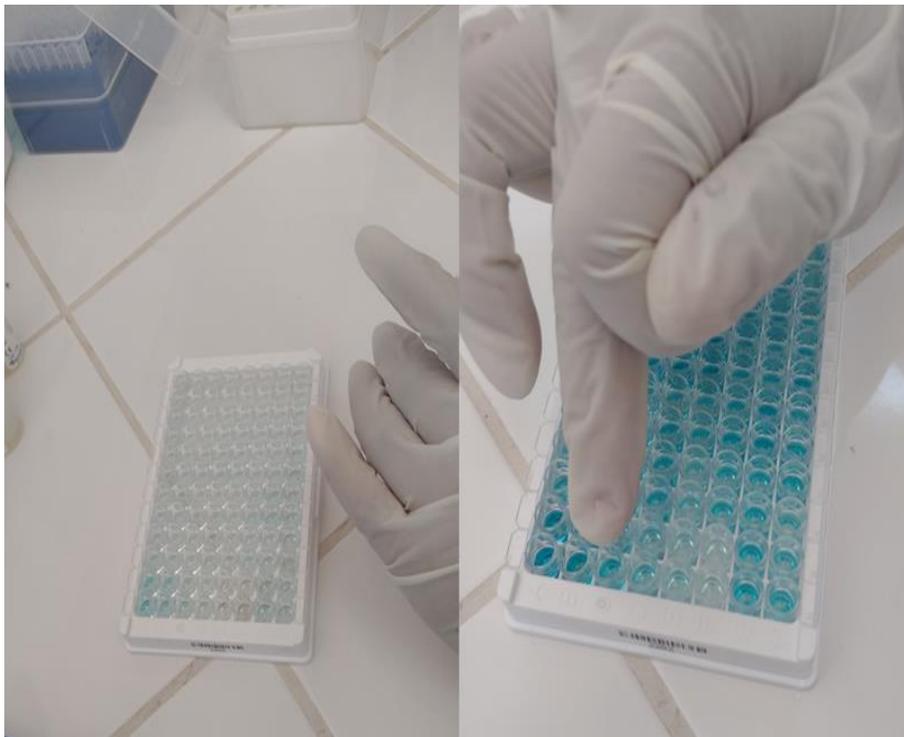
**Figura 26**

*Adición de tampón de lavado*



**Figura 27**

*Adición de solución de sustrato de trabajo*



**Figura 28**

*Añadir solución Stop*



**Figura 29**

*Lectura de absorbancia a 450 nm*



## ANEXO 2. Datos estadísticos

**Tabla 5**

*Resultado de la prueba de Shapiro-Wilk*

		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Cortisol	PTE	,292	15	,001	,800	15	,004
	PMN	,153	15	,200*	,897	15	,085

**Tabla 6**

*Resultados de la prueba estadística de U de Mann-Whitney*

CORTISOL	
U de Mann-Whitney	31,000
W de Wilcoxon	151,000
Z	-3,380
Sig. asintótica(bilateral)	,001
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,000

**Tabla 7**

*Grupo de alpacas Suri post monta natural*

ID		CARACTERÍSTICAS DE LA HEMBRA				
CLASE		ARETE	RAZA	SEXO	COLOR	ESPECIE
Nº						
01	16S119E	SY	H	BL	C.S	
02	21S237E	SY	H	BL	C.S	
03	S/A	SY	H	BL	C.S	
04	20S198E	SY	H	BL	C.S	
05	13S03D	SY	H	BL	C.S	



06	20S130E	SY	H	BL	C.S
07	18S251M	SY	H	BL	C.S
08	21S218E	SY	H	BL	C.S
09	23S002X	SY	H	BL	C.S
10	23S001X	SY	H	BL	C.S
11	19S058E	SY	H	BL	C.S
12	19S048E	SY	H	BL	C.S
13	19S183E	SY	H	BL	C.S
14	12S480M	SY	H	BL	C.S
15	20S023D	SY	H	BL	C.S

**Tabla 8**

*Grupo de alpacas Suri post transferencia de embriones*

ID		CARACTERÍSTICAS DE LA HEMBRA			
CLASE					
Nº	ARETE	RAZA	SEXO	COLOR	ESPECIE
01	19S072D	SY	H	BL	C.S
02	22S250E	SY	H	BL	C.S
03	17S515E	SY	H	BL	C.S
04	22S094E	SY	H	BL	C.S
05	21S99F	SY	H	BL	C.S
06	S/A	SY	H	BL	C.S
07	22S134E	SY	H	BL	C.S
08	21S117E	SY	H	BL	C.S
09	22S172E	SY	H	BL	C.S
10	14S393E	SY	H	BL	C.S
11	17S338E	SY	H	BL	C.S
12	19S300E	SY	H	BL	C.S
13	14S67D	SY	H	BL	C.S
14	18S257M	SY	H	BL	C.S
15	19S367F	SY	H	BL	C.S



### ANEXO 3. Declaración jurada de autenticidad de tesis



Universidad Nacional  
del Altiplano Puno



VRI  
Vicerrectorado  
de Investigación



Repositorio  
Institucional

#### DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo WILBERTH MARCELINO AJAHUANO FLORES,  
identificado con DNI 71133307 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:  
"EFECTO DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES SOBRE LOS NIVELES DE  
CORTISOL EN ALPACAS SURJ DEL CENTRO EXPERIMENTAL CHUQUIBAMBILLA  
"

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 10 de Diciembre del 2024

  
\_\_\_\_\_  
FIRMA (obligatoria)



Huella



## ANEXO 4. Autorización para el depósito de tesis o trabajo de investigación en el 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 WILBERTH MARCELINO AJAHUANA FLORES,  
identificado con DNI 74133707 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:  
" EFFECTO DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES SOBRE LOS NIVELES  
DE CORTISOL EN ALPACAS SURI DEL CENTRO EXPERIMENTAL  
CHUQUIBAMBILLA "

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 10 de Diciembre del 2024

  
FIRMA (obligatoria)



Huella