

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**



**“ESTATUS DE COBRE EN ALPACAS (*Vicugna pacos*) EN
PASTIZALES DE LA ZONA ALTO-ANDINA DEL PERÚ”**

Presentada por:

RICARDO ALFONSO OJEDA D'UGARD

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE EN NUTRICIÓN**

Lima - Perú

2020

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN**

**“ESTATUS DE COBRE EN ALPACAS (*Vicugna pacos*) EN
PASTIZALES DE LA ZONA ALTO-ANDINA DEL PERÚ”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
MAGISTER SCIENTIAE EN NUTRICIÓN**

Presentada por:

RICARDO ALFONSO OJEDA D’UGARD

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

.....
Mg. Sc. Víctor Hidalgo Lozano

PRESIDENTE

.....
Ph. D. Carlos Gómez Bravo

ASESOR

.....
Ph. D. Víctor Guevara Carrasco

MIEMBRO

.....
Ph. D. Mariano Echevarría Rojas

MIEMBRO

DEDICATORIA

Dedicado a mi madre Jenny D'Ugard Egg y a mi hermano Roberto Ojeda D'Ugard por brindarme siempre su apoyo incondicional y ser el principal motivo para conseguir mis propósitos

AGRADECIMIENTOS

Al Ph. D. Carlos Gómez, asesor de tesis, por el apoyo constante durante la elaboración de la tesis y los conocimientos brindados durante el tiempo de estudios.

Al Ph. D. Robert Van Saun, profesor principal de la Universidad Estatal de Pensilvania, por el asesoramiento constante durante la elaboración de la tesis.

Al Ph. D. Hugo Deza, profesor auxiliar de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por permitirme realizar la parte experimental con sus animales.

Al Ph. D. Sergio Vargas, por el apoyo constante durante la parte experimental de la tesis.

Al Mg. Sc. Víctor Hidalgo, Ph. D. Mariano Echevarría, Ph. D. Víctor Guevara, miembros del comité que conformó el jurado de tesis, por el apoyo constante durante la maestría y los conocimientos brindados durante el tiempo de estudios.

Al Blgo. Eder Apumayta, por el apoyo constante durante la fase de laboratorio en la parte experimental de la tesis.

Al programa CIENCIACTIVA de CONCYTEC por el financiamiento de los estudios cursados durante la maestría y la elaboración de la tesis.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1 Importancia del cobre en la nutrición animal.....	2
2.2 Requerimientos nutricionales de cobre.....	5
2.3 Metabolismo del cobre.....	6
2.3.1 Absorción del cobre.....	6
2.3.3 Almacenamiento del cobre.....	7
2.3.4 Excreción del cobre.....	7
2.4 Diagnóstico de la deficiencia y exceso de cobre dietario.....	8
2.4.1 Diagnóstico, caracterización y signos de hipocuprosis.....	8
2.4.2 Diagnóstico, caracterización y signos de hipercuprosis.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1 Experimento 1: Contenido de cobre, hierro y molibdeno de dietas seleccionadas por alpacas	17
3.1.1 Localización.....	17
3.1.2 Metodología.....	17
3.1.3 Análisis de muestras.....	19
3.1.4 Diseño experimental.....	20
3.2 Experimento 2: Concentración de cobre en suero sanguíneo de alpacas madre y sus crías	22
3.2.1 Localización.....	22
3.2.2 Animales experimentales.....	22
3.2.3 Metodología.....	22
3.2.4 Análisis de muestras.....	25
3.2.5 Diseños experimentales.....	26

4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	29
4.1	Experimento 1: Contenido de cobre, hierro y molibdeno de dietas seleccionadas por alpacas	29
4.1.1	Composición florística.....	29
4.1.2	Concentración de cobre, hierro y molibdeno en dietas seleccionadas por alpacas.....	29
4.2	Experimento 2: Concentración de cobre en suero sanguíneo de alpacas madre y sus crías	34
4.2.1	Composición florística de las zonas muestreadas.....	34
4.2.2	Contenido mineral de dietas seleccionadas por alpacas.....	35
4.2.3	Contenido de cobre en el suero sanguíneo de alpacas.....	36
5.	CONCLUSIONES.....	41
6.	RECOMENDACIONES.....	42
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
8.	ANEXOS.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de cobre, hierro y molibdeno en dietas seleccionadas por alpacas en tres localidades durante las épocas seca y húmeda.....	30
Tabla 2. Concentración de cobre, hierro y molibdeno en dietas seleccionadas por alpacas en tres diferentes localidades.....	31
Tabla 3. Concentración de cobre, hierro y molibdeno en dietas seleccionadas por alpacas durante las épocas húmeda y seca.....	32
Tabla 4. Concentración de cobre en el suero sanguíneo de alpacas madre durante tres etapas fisiológicas.....	36
Tabla 5. Concentración de cobre en el suero sanguíneo de alpacas madre y sus crías durante la etapa de lactación	38

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Esquema de muestreo de los pastos consumidos por las alpacas durante los meses de marzo (época de lluvias) y agosto (época seca)	18
Gráfico 2. Esquema de muestreo de cobre en alpacas (madres y crías) durante los diferentes estadios fisiológicos según calendario productivo.....	23
Gráfico 3. Concentración de cobre en suero sanguíneo de alpacas en diferentes etapas fisiológicas.....	37
Gráfico 4. Concentración de cobre en suero sanguíneo de alpacas madres con sus respectivas crías durante la época de lactación.....	39
Gráfico 5. Concentración de cobre en suero sanguíneo de crías de alpacas durante la época de lactación.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Secado de la muestra de pasto.....	18
Figura 2. Molienda de la muestra de pasto.....	18
Figura 3. Calentamiento de la muestra de pasto.....	20
Figura 4. Filtrado de la muestra de pasto.....	20
Figura 5. Técnica de veno-punción.....	23
Figura 6. Suero sanguíneo de alpaca.....	23
Figura 7. Transección lineal.....	24
Figura 8. Suero desproteinizado de alpacas.....	26
Figura 9. Espectrofotómetro de flama.....	26

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Composición florística durante la época seca y lluviosa en tres localidades.....	54
ANEXO 2. Valores de cobre y ANOVA en dietas seleccionadas por alpacas durante las épocas seca y húmeda.....	56
ANEXO 3. Valores de hierro y ANOVA en dietas seleccionadas por alpacas durante las épocas seca y húmeda.....	57
ANEXO 4. Valores de molibdeno y ANOVA en dietas seleccionadas por alpacas durante las épocas seca y húmeda.....	58
ANEXO 5. Composición florística de la cancha de pastoreo durante el pre-parto.....	59
ANEXO 6. Composición florística de la cancha de pastoreo durante la lactación temprana.....	60
ANEXO 7. Composición florística de la cancha de pastoreo durante lactación tardía.....	61
ANEXO 8. Valores de cobre en suero sanguíneo de alpacas en tres estados fisiológicos	62
ANEXO 9. Valores de cobre en suero sanguíneo de alpacas madre versus sus propias cría.....	63
ANEXO 10. Test de mínimos cuadrados entre la interacción madre y cría en la concentración de cobre en suero sanguíneo.....	64
ANEXO 11. ANOVA entre la relación madre-cría en la concentración de cobre en suero sanguíneo durante la lactación temprana.....	65
ANEXO 12. ANOVA entre la relación madre-cría en la concentración de cobre en suero sanguíneo durante la lactación temprana.....	66

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar la variación en la concentración de cobre, hierro y molibdeno en las dietas seleccionadas por alpacas en dos épocas distintas y de cobre en suero sanguíneo de las mismas en distintos estados fisiológicos. Además, se evaluó si existe alguna relación entre la concentración de cobre en suero sanguíneo entre la madre y su cría. La investigación constó en dos experimentos: El primero se realizó en tres localidades: San Pedro de Racco (Pasco), Pachacayo (Junín) y Chuquibambilla (Puno), en los cuales se recolectó muestras de pastos durante la época seca y húmeda; mientras que el segundo se realizó en Ocuvi (Puno), donde se sacaron muestras de pastos y a su vez muestras de sangre de alpacas hembras con sus respectivas crías en tres diferentes estados fisiológicos (preparto, lactación temprana y tardía). Los resultados obtenidos indican que existe una variación de Cu y Mo en las dietas seleccionadas por alpacas entre las épocas seca y húmeda, obteniéndose concentraciones superiores durante la época húmeda ($P < 0.05$), mientras que no se encontró diferencia estadística en la concentración de Fe durante ambas épocas ($P > 0.05$). No se encontró diferencia estadística al comparar los niveles de cobre en suero sanguíneo en los estados fisiológicos de preparto (0.370^a), lactación temprana (0.398^a) y lactación tardía (0.404^a), siendo estos niveles marginales. Por otro lado, se encontró que las madres (0.398^a) poseen una mayor concentración de cobre en suero sanguíneo en comparación con sus crías (0.287^b) durante la lactación temprana (no se encontró relación en el nivel de cobre en suero sanguíneo entre las alpacas madre y sus crías durante la lactación).

Palabras Clave: *alpacas, suero sanguíneo, cobre, dietas seleccionadas*

ABSTRACT

The objective of this research was to determine the variation in the concentration of copper, iron and molybdenum in diets selected by alpacas at two different times and serum copper concentration of alpacas in different physiological states. In addition, it was evaluated if there is any relationship between the serum copper concentration between the mother and her calf. The research consisted of two experiments: The first was carried out in three locations: San Pedro de Racco (Pasco), Pachacayo (Junín) and Chuquibambilla (Puno), in which grass samples were collected during the dry and wet season; the second one was carried out in Ocuwiri (Puno), where pasture samples were taken, and blood samples were taken from female alpacas with their respective calves in three different physiological states (prepartum, early and late lactation). The results obtained indicate that there was a variation of Cu and Mo between the dry and wet seasons in diets selected by alpacas, obtaining higher concentrations during the wet season ($P < 0.05$), while no statistical difference was found in Fe concentration during both seasons ($P > 0.05$). No statistical difference was found when comparing serum copper concentration in the physiological stages of prepartum (0.370^a), early lactation (0.398^a) and late lactation (0.404^a), being marginal levels. On the other hand, mothers (0.398^a) had a higher serum copper concentration compared to their calves (0.287^b) during the early lactation (no relationship was found in the serum copper concentration between mother alpacas and their calves during lactation).

Key Words: *alpacas, blood serum, copper, diets selected*

I. INTRODUCCIÓN

Existen investigaciones en años anteriores acerca de la concentración mineral de pastos naturales en Perú (Echevarria *et al.* 1970; Kalinowski 1970; Gómez 1984), donde se observó que existe una deficiencia de cobre o cantidades altas de sus antagonistas. La concentración mineral puede variar por diversos factores como cambios en la composición florística de los campos, condiciones de pastizal, efectos del cambio climático, entre otros (McDowell 2003). Es por ello que es importante conocer si existe alguna variación en la concentración de cobre en los pastos naturales pertenecientes a la zona altoandina entre dos épocas marcadas del año como la época seca y húmeda, la cual pueda afectar el estatus de cobre de alpacas que son criadas bajo estas condiciones.

Realizar ensayos sobre el estatus de cobre en alpacas permitirá avanzar en el ajuste de los requerimientos de este mineral para su posible incorporación en la dieta, ya que los requerimientos minerales para esta especie no se han definido con exactitud hasta el momento. Sin embargo, existen estudios anteriores donde se indican valores referenciales en los cuales las alpacas no muestran algún signo clínico (Kamphues *et al.* 1999; Hoffman 2006; Van Saun y Herdt 2014). En el caso particular del análisis cobre en dietas seleccionadas por alpacas, es necesario la determinación de otros minerales, como el molibdeno y el hierro, ya que estos pueden interactuar con el cobre, disminuyendo así su absorción o disponibilidad en el organismo (Mills 1983).

El objetivo de esta investigación fue contribuir al conocimiento en la nutrición de cobre en alpacas mediante la valoración de su estatus en este mineral. Esto fue llevado a cabo mediante la evaluación de la concentración y variación del cobre en dietas seleccionadas por alpacas durante las épocas seca y húmeda. A su vez, se realizó la valoración de las concentraciones de cobre en suero sanguíneo de alpacas y sus respectivas crías en tres diferentes estados fisiológicos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 IMPORTANCIA DEL COBRE EN LA NUTRICIÓN ANIMAL

- Producción de Energía

La enzima citocromo C oxidasa es una enzima dependiente de cobre (Cu) y está ubicada en el complejo IV de la cadena transportadora de electrones, donde cumple un rol fundamental en la formación de ATP (Pecina *et al.* 2004). Esta enzima cataliza la reducción del oxígeno molecular (O₂) a agua (H₂O) y genera un gradiente eléctrico usado por la mitocondria para la generación de ATP (Uauy *et al.* 1998).

- Oxidación del hierro

El Cu, al formar parte de cupro-proteínas como la ceruloplasmina (unida a la membrana celular), zyklopen (intestinos) o hephaestin (placenta), cumple un rol importante en el metabolismo del hierro, permitiendo la oxidación de Fe⁺² a Fe⁺³, facilitando su transporte y absorción (Vashchenko y MacGillivray 2013). Trabajos en ratones, los cuales no tenían la capacidad de sintetizar ceruloplasmina, tuvieron un metabolismo normal de cobre, pero una acumulación anormal de hierro en el hígado (Harris *et al.* 1999; Meyer *et al.* 2001). Algunos estudios han demostrado que ciertos individuos, los cuales necesitan ceruloplasmina, muestran una sobrecarga de hierro en el hígado, cerebro y la retina (Thackeray 2011; Kono 2012). Además, la actividad ferroxidasa de la ceruloplasmina previene que los iones libres de hierro (Fe²⁺) participen en reacciones potencialmente dañinas, cuyo resultado final es la producción de radicales libres (Johnson *et al.* 1992). Sin embargo, la suplementación oral de cobre restaura los niveles adecuados de ceruloplasmina y por lo tanto la actividad ferroxidasa en el plasma, corrigiendo algún tipo de desorden en el metabolismo del hierro en un individuo con deficiencia de cobre (Videt-Gibou *et al.* 2009).

- **Formación de tejido conectivo**

El Cu es necesario para la formación de tejido conectivo (hueso, corazón, músculo y vasos sanguíneos) (Shils *et al.* 2006). Este proceso se lleva a cabo mediante una enzima dependiente de Cu llamada lisil oxidasa, la cual es fundamental para el entrecruzamiento del colágeno y la elastina, ayudando a mantener la integridad del tejido conectivo y la formación ósea (Vashchenko y MacGillivray 2013).

- **Función antioxidante**

La enzima dependiente de Cu superóxido dismutasa, se encargada de disminuir el daño causado por radicales libres debido al estrés oxidativo presente en la célula (Elchuri *et al.* 2005), así como regular la expresión de algunos genes (Meyer *et al.* 2001). Esta enzima funciona como antioxidante al catalizar la conversión de radicales superóxidos a peróxidos de hidrógeno, para que estos puedan ser reducidos a agua con la ayuda de otras enzimas (Johnson *et al.* 1992). Existen dos formas de superóxido dismutasa: Una que se encuentra en la mayoría de las células del cuerpo, incluyendo eritrocitos (puede usar al zinc como cofactor) y otro tipo específica de cobre, la cual se encuentra en altos niveles en pulmones, pero en bajos niveles en el plasma sanguíneo (Shils *et al.* 2006).

- **Función inmunológica**

Los neutrófilos son uno de los componentes de la respuesta innata mayor estudiada en rumiantes con deficiencia de Cu, ya que su función se ve deteriorada incluso antes de la presencia de algún signo clínico (Mills 1987). Boyne y Arthur (1986) encontraron que los neutrófilos en vaquillas con deficiencia de Cu inducida por Mo o Fe en sus dietas mostraron una fagocitosis alterada de *Candida albicans*, el cual es un hongo que causa infecciones a nivel de intestino delgado (Hooper *et al.* 2009). Por otro lado, Olkowski *et al.* (1990) encontraron que la capacidad de los neutrófilos para fagocitar *Candida albicans* disminuyó en las ovejas con dietas deficientes en Cu.

Las citosinas, como el factor de necrosis tumoral e interleucinas son mediadores solubles que contribuyen a iniciar y regular la respuesta inmune (Akira *et al.* 1990), estas tienen un efecto endocrino que explica a detalle los signos sistémicos de inflamación, definidos como la respuesta de fase aguda (Ringler 1996). Los terneros con un estatus de Cu deficiente tendieron a tener concentraciones más bajas de factor de necrosis tumoral (TNF) en plasma que los terneros con un estatus normal de Cu (Gengelbach *et al.* 1997). Las células mononucleares aisladas de novillas con deficiencia de Cu tendieron a producir menos interleucina-2 (IL-2) *in vitro* que las células de novillas suplementadas con Cu, sin embargo, la suplementación de Cu revirtió estas tendencias (Torre *et al.* 1995). Por otro lado, la producción de interleucina-1 (IL-1) no se vio afectada por el estado de Cu en terneros (Gengelbach y Spears 1998).

Las NK o células asesinas naturales son una población de linfocitos granulares cuya función es matar las células objetivo que muestran una expresión disminuida de los complejos de péptidos o células recubiertas con moléculas específicas de inmunoglobulina G (Bonham *et al.* 2002). Un estudio llevado por Koller *et al.* (1987) compararon la actividad citotóxica de las células NK aisladas de bazo de ratas, donde se usaron animales control con niveles adecuados y otros deficientes en Cu, mostrando que las ratas control tuvieron cinco a siete veces más efectividad de respuesta de las células NK que las ratas con deficiencia de Cu.

- **Síntesis de neurotransmisores**

El cobre es un importante cofactor enzimático para la formación del sistema nervioso central y síntesis de neurotransmisores (Shils *et al.* 2006). Por ejemplo: La dopamina β hidroxilasa cataliza la conversión de la dopamina para el neurotransmisor norepinefrina, mientras que la envoltura de la mielina está constituida de fosfolípidos, cuyas síntesis son dependientes de la correcta función de la enzima citocromo c oxidasa (O'Dell y Sunde 1997).

- **Formación de la melanina**

Una cupro-enzima llamada tirosinasa, es necesaria para la formación del pigmento melanina. La melanina se forma en células llamadas melanocitos y juega un rol fundamental en la pigmentación del cabello, la piel y los ojos (Shils *et al.* 2006).

2.2 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE COBRE

Los requerimientos de Cu en alpacas pueden ser divididos en dos grupos: Requerimientos de mantenimiento, los cuales sirven para compensar las pérdidas endógenas y otros considerados para la producción (crecimiento, gestación o lactancia). Estos requerimientos indican la cantidad de Cu que el animal debe obtener a partir de la dieta, siendo estos superiores a la capacidad de absorción de este mineral por parte del animal, conocidos también como requerimiento bruto (Rosa y Mattioli 2002).

Al respecto, Suttle (1983) estimó que, en pequeños rumiantes en crecimiento, las dietas que se ofrecen deben contener entre 6,2 y 7,5 ppm de Cu (dieta en base seca), según la edad y el ritmo de crecimiento. Por otro lado, Mills *et al.* (1976) requirieron aumentar la concentración de Cu en la dieta para evitar signos clínicos de hipocuprosis en animales en crecimiento, siendo estos de 8 a 15 ppm (base seca). En animales adultos, los requerimientos aumentan durante la etapa gestación y no tanto en la lactancia, debido a la baja concentración de Cu en la leche (Gooneratne *et al.* 1989). El National Research Council (NRC) (1984) recomienda una concentración de Cu en la dieta de 8 ppm (dieta en base seca) para todas las categorías de bovinos de carne.

Los requerimientos de Cu en alpacas no han sido reportados con exactitud, sin embargo, Van Saun (2009), divide los requerimientos de cobre para alpacas a partir de la extrapolación de otros rumiantes en etapas tales como: Crecimiento y mantenimiento de 8 a 12 ppm y durante la etapa de preñez y lactación de 9 a 12 ppm de Cu (dieta en base seca). Además, Kamphues *et al.* (1999) recomiendan 8 ppm de Cu, mientras que Hoffman (2006) recomienda valores superiores a 11 ppm de Cu de materia seca en dietas para alpacas por día.

Al establecer la afinidad entre el pasto y el animal, deben tomarse en cuenta la concentración de otros minerales que pueden interactuar con el Cu y alterar su disponibilidad en función a los requerimientos del animal (Suttle 1983). Además de las diferencias en la concentración mineral de diversas especies que se pueden encontrar en las zonas de pastoreo, estado fenológico o maduración de la planta (Fleming 1973), la variación estacional (Thornton *et al.* 1972) y la posible contaminación con la tierra (Appleton 1992). No se ha reportado información relevante a los factores mencionados en trabajos realizados en Perú, sin embargo, este relevamiento en forrajes ha permitido caracterizar la deficiencia de Cu en

áreas extensas de países como Guatemala (Tejada *et al.* 1985), Canadá (Boila *et al.* 1987) y la Argentina (Mattioli *et al.* 1996; Balbuena *et al.* 1989).

2.3 METABOLISMO DEL COBRE

2.3.1 Absorción del cobre

Los rumiantes tienen un menor porcentaje de absorción de Cu proveniente de la dieta a comparación de los monogástricos (30-50%) (Rosa y Mattioli 2002). Esto puede deberse al ambiente reductor del rumen, el cual transforma al Cu^{+2} a Cu^{+} , siendo este último más difícil de absorber (Nederbragt 1984) y por la acción de sulfuros que capturan al Cu, formando CuS , el cual es altamente insoluble, evitando así su absorción (Suttle 1974). En vacunos de la raza Holstein durante la lactación, la absorción estimada de Cu es aproximadamente de $5.1 \pm 1,5$ % (Buckley 1991), sin embargo, la absorción varía en función de la raza (Ward *et al.* 1995), forma química del Cu (Kegley y Spears 1994) y la presencia de ciertos factores de interferencia con otros minerales (Mills 1983).

El Cu ingresa a través del ribete en el cepillo del enterocito, el cual lo deposita uniéndolo a la metalotioneína (MT), la cual es una proteína con aproximadamente 25-30 % de cisteína en sus grupos sulfhidrilos ($-\text{SH}_2$) (Cousin 1985). La mayor estimulación en cuanto a la producción del MT en el enterocito la realiza el Zn, sin embargo, esta enzima tiene una mayor afinidad por el Cu, quedando libre para estimular la síntesis de nueva MT (Cousin 1985). En el duodeno, la MT tendría dos funciones primordiales, por un lado, sería responsable de la captación y almacenaje temporario del Cu hasta su absorción, y por otro lado representa un mecanismo de defensa el cual evita la captación de cantidades excesivas de Cu u otros metales (Fuentealba y Bratton 1994).

Dietas altas en hierro pueden reducir la absorción del cobre, debido a que existe una competencia por el tipo de transportador a nivel de intestino delgado (Transportador de metal divalente 1 o DMT1) (Arredondo *et al.* 2006). Por otro lado, altas ingestas de zinc por extensos períodos de tiempo pueden causar una deficiencia de cobre, debido a que esto incrementa la síntesis de una proteína celular llamada metalotioneína (Cousin 1985). Esta proteína tiene la capacidad de capturar metales y además tiene una mayor afinidad al cobre

que al zinc, por esta razón es que al tener altos niveles de metalotioneína inducidos por un exceso de zinc, ocasionan una reducción en cuanto a la absorción normal del cobre (Roberts y Schilsky 2008). Además, el molibdeno junto al azufre tiene la capacidad de formar por acción microbiana al interior del organismo de rumiantes un complejo llamado Tiomolibdato, el cual puede capturar al cobre formando Tiomolibdato de cobre, resultando de una disponibilidad reducida de estos minerales (Laven y Livesey 2005). Experimentos demostraron que ovejas suplementadas con molibdeno y sulfato disminuían la concentración de cobre en el hígado, haciendo que esta se elevara en sangre debido a la movilización de las reservas (Dick 1956).

2.3.2 Almacenamiento del cobre

Una vez que el Cu ingresa al torrente sanguíneo, este se une principalmente a la albúmina y secundariamente a aminoácidos libres, ambas fracciones son denominadas cobre de reacción directa (CRD) debido a que reaccionan con el dietilditiocarbamato sin acidificación previa, incorporando el Cu fácilmente al tejido hepático (Evans y Wiederanders 1967). El hígado es el principal órgano donde se deposita de Cu en el organismo, y este cumple un rol importante en su metabolismo (Gooneratne *et al.* 1989). El $92,5 \pm 5$ % del CRD es captado por el hígado, mientras que resto se distribuye por otros tejidos ($2,9 \pm 0,8$ %), leche ($4,5 \pm 3,5$ %) y orina ($1,5 \pm 0,3$ %) (Buckley 1991). Una vez que el Cu es incorporado al hepatocito, este se almacena unido a la MT en los lisosomas, para ser utilizado en la síntesis de ceruloplasmina, previa degradación lisosomal o por intercambio mediado por glutatión (GSH). La ceruloplasmina sintetizada en el hígado se libera hacia el plasma, donde representa entre el 70 a 95 % del Cu sérico y es la principal fuente de Cu para los tejidos (Cousin 1985). Estudios realizados en bovinos indican que el 24 % del Cu presente en leche provenía directamente del Cu absorbido en el aparato digestivo (Buckley 1991).

2.3.3 Excreción del cobre

La principal vía de excreción del Cu absorbido es la bilis, donde los lisosomas serían los encargados de captar al Cu y removerlo hacia a la bilis posiblemente por un mecanismo de exocitosis (Nederbrag *et al.* 1984). Buckley (1991) reportó una pérdida diaria de Cu por bilis del 0,87 % del Cu hepático en bovinos en lactación, obteniendo valores similares reportados por Charmley *et al.* (1982) en novillos. La propia bilis limita la reabsorción del Cu por lo

que la mayor parte de éste sigue su camino por el tracto digestivo y se pierde por las heces (Cousin 1985).

Durante la gestación en bovinos, la madre confiere al hígado fetal una gran cantidad de Cu, de modo que al nacer el ternero posee una concentración hepática hasta 300 ppm mayor a la de su madre (base seca) (Gooneratne y Christensen 1989). La concentración hepática de Cu en el feto depende del período de gestación (creciendo en forma exponencial) y de la concentración hepática de la madre, ya que cuando esta es menor a 25 ppm (materia seca) el depósito hepático fetal se reduce (Gooneratne y Christensen 1989). La transferencia de Cu hacia el feto es probablemente una adaptación fisiológica para compensar la baja concentración de Cu en la leche, ya que esta posee alrededor de 0.15 ppm de Cu (Underwood y Suttle 1999) y puede ser menor en estados de deficiencia. Sin embargo, la concentración no se incrementa más allá del rango normal al aumentar el aporte de Cu en la dieta (Underwood 1981). Buckley (1991) registró una pérdida vía urinaria de 0,24 mg por día en bovinos que absorben 11,8 mg de Cu. Ward *et al.* (1995) informan que la pérdida de Cu por esta vía representa alrededor del 1 % de Cu ingerido.

2.4 DIAGNÓSTICO DE LA DEFICIENCIA Y EXCESO DE COBRE DIETARIO

2.4.1 Diagnóstico, caracterización y signos de hipocuprosis

La composición mineral del suelo puede ser un indicador razonablemente exacto de deficiencias potenciales en los animales (Appleton 1992). Boila *et al.* (1984) asociaron un área de mayor incidencia de hipocuprosis (bajo contenido de Cu en un organismo) con formaciones geológicas ricas en Mo. Sin embargo, existe una gran cantidad de factores que afectan la disponibilidad del mineral en el suelo, como, por ejemplo: El pH, grado de drenaje y materia orgánica, sumadas a las limitadas metodológicas para estimarla, hacen que la correlación entre la concentración mineral entre suelo y pasto sea limitada (Tejada *et al.* 1985).

Usualmente, los sedimentos de los cursos de agua son un reflejo de la composición mineral de los suelos donde son drenados, representando un método apropiado para obtener información de zonas relevantes a bajo costo (Appleton 1992). En el Reino Unido, Thornton *et al.* (1966) relacionaron las áreas con excesivo, moderado y bajo Mo en los sedimentos con

los niveles de cupremia en ganado, obteniendo una clara correlación negativa entre ambos parámetros. Esta metodología es más útil en los países, en los cuales la producción ganadera se basa en el pastoreo extensivo, con bajo o nulo nivel de fertilización y contaminación (Appleton 1992). Se tienen resultados obtenidos con esta técnica en 8 países en desarrollo, los cuales fueron recopilados por el Centro de Medicina Veterinaria Tropical de Inglaterra (1992).

La hipocuprosis tiene incidencia geográfica debido a que el medio ambiente provoca el desequilibrio en la nutrición del animal, caracterizándose por la asociación entre el suelo, el pasto y el animal (Boila *et al.* 1984). La caracterización de la hipocuprosis en una zona específica permite definir el desbalance de algún mineral específico en tiempo real, además permite ajustar las medidas de control deseables e incluso alertar sobre una posible ocurrencia de enfermedades subclínicas (Thornton 1983; Appleton 1992). Hasta el momento, no se ha identificado un parámetro preciso que indique el momento exacto en que las alpacas comienzan a sufrir las alteraciones clínicas o subclínicas de la hipocuprosis. Por ello se emplean las concentraciones de Cu en hígado, suero o en plasma como indicadores indirectos y la actividad de algunas enzimas cupro-dependientes como indicadores directos del desbalance de este mineral (Suttle 1986).

La concentración hepática de Cu es el primer parámetro afectado, donde la concentración normal es de 100 a 400 ppm (base seca) y guarda una relación lineal con la absorción intestinal cuando la dieta cubre los requerimientos (Underwood 1981; Suttle 1983; Underwood y Suttle 1999). Estos valores de Cu hepático muestran un buen indicador de depósito, pero una pobre sensibilidad como indicador de deficiencia (Suttle 1986). Esto puede observarse en las diferentes concentraciones hepáticas sugeridas como indicadores de pérdidas productivas. Ammerman (1970) sostiene que los signos clínicos de hipocuprosis en bovinos son concurrentes al tener concentraciones hepáticas inferiores a 25 ppm. Por otro lado, Humphries *et al.* (1983) encontraron resultados positivos en la ganancia diaria de peso en terneros con menos de 5 ppm, Mills *et al.* (1976) con valores inferiores a 15 ppm, Viejo y Casaro (1993) con 44 y 33 ppm, mientras que Suttle (1986) postula que la disfunción se presenta con menos de 5 ppm, todas expresadas en base seca. La obtención de las muestras fue realizada por biopsia hepática, por lo cual este tipo de análisis de Cu es un auxiliar útil y necesario en trabajos experimentales, pero de uso más conservador en un diagnóstico de rutina (Carrillo y Bingley 1964).

Cuando existe molibdenosis, los análisis de cupremias pueden ser engañosamente elevadas por complejos de Cu y Mo no disponibles, sin embargo, estos pueden descartarse tratando el plasma o el suero con ácido tricloroacético (Kincaid 1999). Otra opción es medir la actividad de ceruloplasmina, ya que esta representa del 70 al 90 % de Cu plasmático (Kincaid 1999). Debido a que el muestreo de sangre es rápido y sencillo, su elección en diagnósticos de rutina y estudios poblacionales es más eficaz (Ramírez *et al.* 1977). La cupremia no es un indicador directo de daño, por lo que resulta útil subdividir estos valores de cupremia en tres rangos: por encima de 60 µg/dl (normocupremia), entre 60 y 30 µg/dl (hipocupremia leve) y aquellos menores de 30 µg/dl (hipocupremia severa) (Rosa y Mattioli 2002). La normocupremia sugiere que los animales no se hallan expuestos al desbalance (salvo en molibdenosis donde pueden coexistir normocupremias y signos de deficiencia) (Rosa y Mattioli 2002). La hipocupremia leve, en cambio, indica que la reserva hepática de Cu se ve ligeramente afectada y ya no es capaz de mantener el nivel plasmático normal, pero posiblemente no se vean afectadas las enzimas dependientes de Cu a nivel de tejido ya que los animales no suelen mostrar signos clínicos considerables de la enfermedad ni responden a la suplementación con Cu en ensayos de dosis-respuesta realizados (Ferrer *et al.* 1989). La hipocupremia severa indica un desbalance de Cu más grave, con la posibilidad de que si esta se mantiene pueda tener complicaciones a nivel enzimático, ya que con valores inferiores a 30 µg/dl se presentan las consecuencias de la enfermedad (Suttle 1983). Se ha realizado ensayos de dosis-respuesta en grupos con hipocupremia severa, de 19 µg/dl (Humphries *et al.* 1983), menores de 18 µg/dl (Gengelbach *et al.* 1994), de 2 a 12 µg/dl (Steffan *et al.* 1982) y menores de 30 µg/dl (Viejo y Casaro 1993).

Una menor actividad de las enzimas dependientes de Cu es un indicador directo de la etapa de disfunción que posteriormente podrían llevar a manifestaciones de hipocuprosis (Underwood y Suttle 1999). Sin embargo, existen algunos inconvenientes para que sean utilizados con el fin de establecer algún diagnóstico. La etiología de los signos clínicos descritos por hipocupremia es muchas veces compleja y el rol de las enzimas específicas no siempre es claro, ya que muchas veces éstas cumplen más de una función principal (Gooneratne *et al.* 1989). Por otro lado, detectar una menor actividad enzimática no siempre es indicio de un disturbio bioquímico, como por ejemplo la enzima citocromo C oxidasa posee una actividad normal que sobrepasa en un 60 % la actividad mínima que requiere el tejido hepático para mantener el metabolismo oxidativo (Mills 1983).

Medir la actividad enzimática requiere de muestreos altamente invasivos y de técnicas engorrosas, lo cual suele impedir su utilización con el fin de obtener diagnósticos de rutina (Underwood y Suttle 1999; Suttle 1986). Suttle (1986) propone medir la actividad de la enzima superóxido dismutasa eritrocitaria (SOD-e), que, al reflejar el balance de Cu en el animal durante la eritropoyesis, desciende más lentamente que en la cupremia. Esta evaluación convierte a la actividad de SOD-e en un marcador de mayor valor predictivo de disfunción y por otro lado permitiría, junto al análisis de cupremia, inferir la duración del desbalance. Sin embargo, la medición de SOD-e no es sencilla de realizar y controlar, sirviendo para facilitar la interpretación de los valores de Cu obtenidos durante la evaluación de la cupremia, pero no como posible alternativa en un diagnóstico rutinario (Suttle 1986).

Debido a que varias enzimas dependientes de Cu pueden resultar afectadas en la etapa de disfunción, la signología clínica relacionada con la hipocuprosis es variada, incluyendo alteraciones del pelaje, diarrea, desórdenes cardiovasculares, trastornos óseos y articulares, menor desarrollo corporal, anemia, menor resistencia a las infecciones y alteraciones en la reproducción (Rosa y Mattioli 2002). Según Underwood (1981), la acromotriquia (despigmentación del pelaje) suele ser el primer signo clínico de la deficiencia de Cu, presentándose aun cuando el aporte de Cu hacia los tejidos es suficiente como para prevenir otros signos. Algunos animales llegan a presentar signos clínicos graves antes de que la acromotriquia se haga evidente (Mills *et al.* 1976). Se acordó por convención en aceptar que las alteraciones en el pelaje se deben a la actividad reducida de la enzima dependiente de Cu tirosinasa (Underwood y Suttle 1999).

La diarrea es otro signo presente en la hipocuprosis, presentada con más frecuencia en casos de deficiencia relacionadas con el exceso de Mo en la dieta, aunque también es asociada a una deficiencia simple de Cu (Mills *et al.* 1976). La evaluación ultramicroscópica de las vellosidades intestinales en animales con deficiencia de Cu con un cuadro diarreico muestra que existen marcadas alteraciones a nivel mitocondrial, ligadas a una actividad reducida de la enzima citocromo C oxidasa en todo el intestino delgado (Rosa y Mattioli 2002). La evidencia más fidedigna que la falta de Cu a nivel intestinal es la responsable de la diarrea es su rápida inhibición al administrar una dosis baja de Cu por vía oral (10mg), la cual no es suficiente para revertir otros signos clínicos de hipocuprosis, ni tampoco elevar los niveles de Cu plasmático (Mills *et al.* 1976).

El antecedente más importante de enfermedades cardiovasculares relacionadas a bovinos con hipocuprosis es la denominada Falling disease o enfermedad de las caídas, la cual se presenta en el oeste de Australia cuando los animales consumen forrajes con un contenido inferior a los requerimientos nutricionales de Cu (1-3 ppm) (Rosa y Mattioli 2002). Esta lesión consiste básicamente en una degeneración progresiva del miocardio con fibrosis reemplazante, la cual conduce a una muerte súbita por falla cardíaca ante un estrés o ejercicio moderado (Underwood 1981). Por otro lado, Leigh (1975) observó hipertrofia cardíaca en novillos con hipocuprosis, asociada a alteraciones mitocondriales. Mills *et al.* (1976), también informaron alteraciones vasculares en terneros con hipocuprosis, especialmente en un animal que murió debido a una ruptura de la vena cava posterior. Estas lesiones probablemente se debieron a una elastogénesis defectuosa causada por una actividad reducida de la enzima dependiente de Cu lisil oxidasa (Rosa y Mattioli 2002).

En cuanto a los desórdenes óseos y articulares, éstos se presentan en casos de hipocuprosis extrema, especialmente en animales jóvenes, donde se manifiestan deformaciones articulares en el tarso, metatarso, carpo y metacarpo, claudicaciones y debilidad ósea que provoca fracturas espontáneas, especialmente de costillas, además estas lesiones incluyen rarefacción y adelgazamiento del hueso cortical en húmero, fémur, tibia, radio, metacarpo y metatarso (Rosa y Mattioli 2002). El tejido óseo en un animal con deficiencia de Cu presenta osteoporosis, con una actividad osteoblástica reducida y con actividad osteoclástica normal. A nivel epifisiario se observa osificación demorada del cartílago calcificado, adelgazamiento cortical y deficiencia del hueso trabecular (Smith *et al.* 1975; Mills *et al.* 1976). La lesión bioquímica primaria a nivel óseo es probablemente debido a una actividad reducida de la enzima lisil oxidasa (Underwood 1981).

Una menor resistencia a infecciones es considerada como una de las consecuencias de la hipocuprosis, sin embargo, a pesar de los numerosos trabajos realizados al respecto, sólo puede afirmarse que existen fundamentos para pensar que existe alguna relación sin que ésta haya sido realmente demostrada (Rosa y Mattioli 2002). Los primeros resultados en estudios realizados al respecto se obtuvieron en corderos de razas y líneas genéticas más sensibles a la hipocuprosis, en los que aumentó el número de muertes por infecciones (Suttle 1989). Trabajos experimentales en bovinos con hipocuprosis inducida, demostraron que ésta se asocia con linfopenia, especialmente del grupo B y monocitosis, dando como resultado una disminución de la capacidad fagocítica y lítica de los neutrófilos (Cerone *et al.* 1998).

La presencia de Mo, más que la deficiencia de Cu en dietas, parece ser la responsable de una fertilidad reducida, causando retraso en la pubertad, menor tasa de concepción y alteraciones del ciclo estral en bovinos (Rosa y Mattioli 2002). Los mecanismos en los cuales el Cu interviene no son del todo claros, pero los bovinos suplementados con Mo presentan una menor liberación de hormona luteinizante (Phillippo *et al.* 1987). En ratas deficientes en Cu se demostró que dietas ricas en Mo reducen los picos de hormona folículo estimulante y la secreción de estrógenos, mientras que sólo este último efecto fue observado en los animales con deficiencia simple de Cu, lo cual parece indicar que estarían involucrados diferentes mecanismos (Igarza *et al.* 1996).

La anemia es un caso frecuente en casi todas las especies con hipocuprosis severa (Underwood 1981), sin embargo, es poco frecuente en animales criados al pastoreo con un contenido rico en hierro (Campbell *et al.* 1974; Humphries *et al.* 1983; Gengelbach *et al.* 1994). La causa de la anemia es relacionada con una actividad ferroxidasa reducida por parte de la ceruloplasmina, la cual concuerda con un aumento en la concentración hepática de Fe (Mills *et al.* 1976). Sin embargo, otra causa puede ser la reducción en la vida media de los eritrocitos a causa de una actividad reducida de la enzima SOD eritrocitaria durante la hipocuprosis (Gooneratne *et al.* 1994).

Si bien las lesiones causadas por una hipocuprosis severa alteran notablemente el estado general de los animales, una menor ganancia diaria de peso puede ser la alteración clínica más importante ya que puede pasar desapercibida a menos que los animales sean pesados con frecuencia (Rosa y Mattioli 2002). En la recopilación de resultados obtenidos de ensayos dosis-respuesta, se encontró que hubo menores ganancias diarias de peso en aquellos animales cuyas dietas contenían un exceso de Mo (Phillippo 1983). Sin embargo, pruebas realizadas de deficiencia simple de Cu también causó alteraciones en el crecimiento de los animales (Mills *et al.* 1976). En ambos casos, una pobre ganancia diaria de peso se debería a un menor consumo de alimento y a una conversión alimenticia reducida (Mills *et al.* 1976; Humphries *et al.* 1983).

2.4.2 Diagnóstico, caracterización y signos de hipercuprosis

La hipercuprosis (niveles altos de cobre en un organismo), puede causar a nivel histológico, una necrosis hepatocelular generalizada, con una cierta proliferación en las vías biliares (Mullaney *et al* 1996). Las concentraciones de cobre en suero e hígado pueden medirse haciendo uso de un análisis estándar, sin embargo, este tipo de análisis suelen ser en algunas ocasiones poco confiables, debido a que las concentraciones pueden permanecer normales en las fases de necrosis hepática aguda o incluso con una enfermedad más crónica (Junge y Thornburg 1989). Las concentraciones séricas superiores a 0,9 ppm se consideran anormales, pero los valores normales no excluyen este diagnóstico, ya que en casos de toxicidad en la que se midió el cobre en suero justo antes de la muerte, se informaron concentraciones muy elevadas que oscilan entre 2.2 y 5.7 ppm (Mullaney *et al.* 1996). Se puede realizar una biopsia con una aguja fina para medir el contenido mineral hepático, donde la concentración de cobre hepático reportada en casos de toxicidad varió de 640 a 1700 ppm de peso seco (Carmalt *et al.* 2001). En promedio, el contenido de materia seca en el hígado es del 32%, por lo tanto, estos valores serían equivalentes a 205 y 544 ppm de peso húmedo (Junge y Thornburg 1989; Mullaney *et al.* 1996). Los rangos esperados en las concentraciones de cobre hepático para alpacas adultas y fetales son de 90 a 300 y de 178 a 450 ppm de peso seco, respectivamente (Van Saun y Herdt 2014). Los recién nacidos y animales jóvenes tienen concentraciones de cobre hepático entre los rangos descritos, lo que sugiere que se debe considerar la edad del animal al interpretar las concentraciones de cobre en el hígado (Ashton *et al.* 1979). El análisis dietético puede revelar altas concentraciones de cobre o altas concentraciones en relación con las concentraciones de molibdeno y otros minerales que pueden alterar la absorción del mismo. El contenido de cobre en la dieta reportado en casos de toxicidad varió de 25 a 36.6 ppm en materia seca (Carmalt *et al.* 2001). En todos los casos de toxicidad de cobre reportada, la proporción entre Cu: Mo en la dieta fue mayor que 16: 1. Dietas con mayor a 20 ppm de cobre y una relación 10: 1 Cu: Mo aumentan el riesgo de inducir toxicidad por cobre en llamas y alpacas (Junge y Thornburg 1989).

La principal hepatotoxicosis mineral en los camélidos se relaciona con el cobre acumulado en el organismo del animal (Mullaney *et al.* 1996; Junge y Thornburg 1989; Carmalt *et al.* 2001; Levy 2007). Los suplementos usados en el concentrado son las fuentes más frecuentes ya que estas pueden contener demasiado cobre debido a errores de mezcla o formulación

para especies más tolerantes como aves, caballos o ganado vacuno (Junge y Thornburg, 1989). En situaciones únicas, el contenido excesivo de cobre forrajero (> 20 ppm) se atribuyó a las condiciones de toxicidad (Mullaney *et al.* 1996). Como se ve con otras especies, el equilibrio de cobre en relación con otros minerales como el molibdeno y el azufre inorgánico afecta la biodisponibilidad del cobre (Mullaney *et al.* 1996). Las plantas de *Heliotropium* y *Senecio* también parecen aumentar la acumulación hepática de cobre en rumiantes (Junge y Thornburg 1989). La toxicosis en un caso resultó de alimentar al animal con una mezcla mineral pre-comercial formulada para mejorar la calidad del vellón en alpacas y en otro de la alimentación continua de un bloque mineral bovino reformulado con más cobre para cumplir con las recomendaciones bovinas actuales (Junge y Thornburg 1989). En un tercero, se descubrió que una mezcla mineral contiene 10 veces el contenido de cobre que indica, poniéndonos en casos de mala formulación nutricional (Levy 2007). Estos reportes indican que los camélidos pueden ser más sensibles a los efectos de una sobre-suplementación de cobre en comparación con otras especies de rumiantes y que nuestro conocimiento con relación a los requisitos y tolerancias de este micro-mineral en camélidos aún es limitado. El cobre ingerido se almacena en lisozomas hepáticos y cuando estos alcanzan su máxima capacidad o se produce un evento desencadenante de estrés, el cobre puede ser liberado al citoplasma, lo que conduce a una posterior muerte del hepatocito y a una liberación más amplia del cobre (este ión libre conduce a la peroxidación lipídica y al daño a las membranas celulares) (Junge y Thornburg 1989).

Los signos clínicos relacionados a un exceso de cobre en el animal incluyen anorexia, disnea, letargo, debilidad, reclinación y posibles signos de cólico que progresan rápidamente, lo que a menudo resulta en la muerte del camélido en aproximadamente dos días (Junge y Thornburg 1989). Las anormalidades clinicopatológicas consisten principalmente en aumentos en las actividades séricas de algunas enzimas tales como: Aspartato aminotransferasa (AST), lactato deshidrogenasa (LDH) y succinato deshidrogenasa (SDH), a menudo a valores 10 o 20 veces superiores a los valores superiores de referencia, además se observan aumentos más leves (hasta cinco veces) en la γ -glutamyl transferasa (GGT) (Van Saun y Herd 2014). Se informaron valores normales de enzimas hepatocelulares en un caso clínico sospechoso en un grupo de llamas que se creía que tuvieron acumulación de cobre hepático subclínico (Weaver *et al.* 1999; Carmalt *et al.* 2001).

La hemoglobinuria, hemoglobinemia, hiperbilirrubinemia e ictericia parecen ser menos frecuentes o no ocurrir en los camélidos, ya que un informe mostró un volumen celular empaquetado (PCV) del 8% al 12% y un alto recuento de eritrocitos nucleados en dos alpacas afectadas (Weaver *et al.* 1999). Las lesiones macroscópicas por lo general se limitan a un agrandamiento leve e ingurgitación del hígado, camélidos particularmente, no suelen desarrollar la decoloración de los riñones y otros órganos en forma de pistola de metal reportada en otras especies de rumiantes (Weaver *et al.* 1999).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 EXPERIMENTO 1: CONTENIDO DE COBRE, HIERRO Y MOLIBDENO DE DIETAS SELECCIONADAS POR ALPACAS

3.1.1 Localización

Para la fase experimental se consideraron tres localidades diferentes de la sierra peruana: Pachacayo – Junín (11°S, 75°W / 3820 m.s.n.m.), San Pedro de Racco – Pasco (10°S, 76°W / 4325 m.s.n.m.) y Chuquibambilla – Puno (14°S, 72°W / 3340 m.s.n.m.), cuya clasificación ecológica según Holdridge es la de Páramo húmedo para las tres localidades (SENAMHI 2017).

3.1.2 Metodología

El primer muestreo de dietas seleccionadas por alpacas, las cuales que fueron sometidas a análisis de Cu, Fe y Mo, se realizó en el mes de marzo (época de lluvias) y el segundo en el mes de agosto (época seca), ambos en el año 2018. Se usó la técnica de simulación manual, la cual consiste en observar el pastoreo individual de un animal de dos a tres horas cerca del área de pastoreo y luego tomar muestras representativas del pasto natural consumido por el mismo (Austin *et al.* 1983).

Tomando como referencia la publicación de Burton *et al.* (2003), se realizó la simulación de los hábitos de consumo de las alpacas en cada fecha y lugar mencionadas, seleccionando a dos alpacas hembra de seis dientes pertenecientes a la punta. Se muestrearon 30 estaciones alimentarias por cada animal, cortando el forraje a una altura aproximada de 5 cm, arriba del suelo, obteniendo dos bolsas con lo colectado y cada bolsa representará una muestra independiente, teniendo al final seis bolsas diferentes en cada época (Gráfico 1).

Además, mediante la utilización del método de transección al paso se recopiló la composición florística del campo, la cual nos permitió conocer ciertas características y especies de pastos que se encuentran en las zonas donde las alpacas pastorean (Parker 1951).

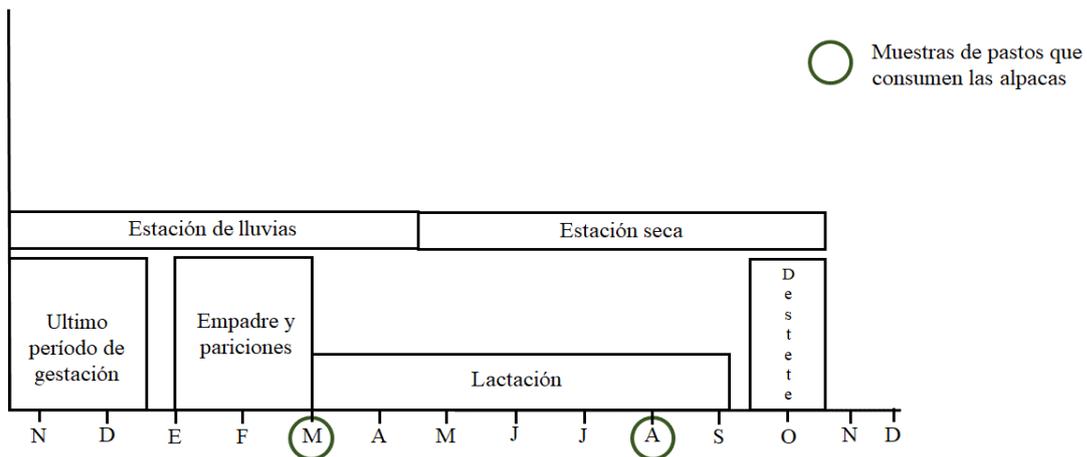


Gráfico 1: Esquema de muestreo de los pastos consumidos por las alpacas durante los meses de marzo (época de lluvias) y agosto (época seca).

FUENTE: Tomado y adaptado de San Martín (1991)



Figura 1: Secado de la muestra de pasto



Figura 2: Molienda de la muestra de pasto

3.1.3 Análisis de muestras

Una vez obtenidas las muestras en campo, fueron secadas en el laboratorio de Nutrición de Rumiantes de la Facultad de Zootecnia (UNALM) a 60 °C hasta obtener un peso constante. Posteriormente fueron moliendas y almacenadas en bolsas con naftalina para evitar la presencia de insectos y humedad.

Según el manual de análisis de cobre en tejido vegetal por digestión húmeda del Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas, Aguas y Fertilizante (Bazán 2018), el procedimiento para el análisis de cobre es el siguiente:

- Se pesó 0.5 g de muestra de tejido vegetal y se colocó dentro de frascos de 50 ml, resistentes al calor.
- Se adicionaron 5 ml de la solución nítrica-perclórica (la relación entre HNO_3 y HClO_4 fue de 5:1).
- Se colocó sobre una plancha de calentamiento y se elevó gradualmente la temperatura hasta 175 °C.
- Se dejó en digestión por 1 hora y 30 minutos (la solución se vuelve clara).
- Se puso un embudo sobre el frasco de digestión para dar efecto de tubo de reflujo (Figura 1).
- Se removió el frasco y adicionó 15 ml de 0.1 N HCl.
- Se agitó el frasco para disolver las cenizas y filtrar la solución. (Este filtrado original representa una dilución de 30 veces (30x) con respecto al material vegetal) (Figura 2).
- Por último, se llevó el filtrado al laboratorio de análisis de minerales de la facultad de zootecnia de la UNALM para su lectura mediante el espectrofotómetro de flama marca GBC modelo SavantAA Σ a una longitud de onda de 324.7 nm.



Figura 3: Calentamiento de la muestra de pasto



Figura 4: Filtrado de la muestra de pasto

El análisis para hierro (Fe) y molibdeno (Mo) fue realizado por Cumberland Valley Analytical Services (Waynesboro, Pensilvania, EE. UU.), utilizando análisis ICP-MS (espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo) después de la digestión húmeda (<https://www.foragelab.com/Resources/Lab-Procedures>). Este Laboratorio comercial está acreditado por la Asociación Nacional de Pruebas de Forraje (www.foragetesting.org).

3.1.4 Diseño experimental

Este experimento se llevó a cabo mediante Análisis de varianza (ANOVA, Proc. GLM) con términos de Localidad (Pachacayo, San Pedro de Racco y Chuquibambilla), estación (seca y húmeda) y su interacción ($n = 6$) en el modelo. Se usó una prueba de Tukey para comparar medias. El análisis estadístico se realizó utilizando SAS 9.4 (Sistema de Análisis Estadístico), haciendo uso de un diseño completamente al azar en diseño factorial 2×3 con 0.05 como nivel de significancia (SAS Institute 2002).

Diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 3:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + u_{ij}$$

Y_{ij} : Representa la observación correspondiente al nivel (i) del factor localidad y al nivel (j) del factor estación.

μ : Efecto constante denominado media global.

τ_i : Efecto producido por el nivel i-ésimo del factor localidad, ($\sum_i \tau_i = 0$)

β_j : Efecto producido por el nivel j-ésimo del factor estación, ($\sum_j \beta_j = 0$).

$(\tau\beta)_{ij}$ = Efecto producido por la interacción entre localidad \times estación, ($\sum_i (\tau\beta)_{ij} = \sum_j (\tau\beta)_{ij} = 0$).

U_{ij} = Variables independientes con distribución $N(0, \sigma)$.

3.2 EXPERIMENTO 2: CONCENTRACIÓN DE COBRE EN SUERO SANGUÍNEO DE ALPACAS MADRE Y SUS CRÍAS

3.2.1 Localización

La fase experimental se llevó a cabo en las zonas de pastoreo pertenecientes a la familia Deza, ubicada en Ocuwiri – Puno (15°S, 70°W/ 4230 m.s.n.m.). Su clasificación ecológica según Holdridge es la de Páramo húmedo (SENAMHI 2017).

3.2.2 Animales experimentales:

- Se utilizaron 17 alpacas hembra gestantes de raza Suri con una condición corporal de 2.94 ± 0.47 (2 - 3.5 unidades como mínimo y máximo respectivamente) y una edad estimada de 4.06 ± 1.34 años (2.5 - 6 años de edad como mínimo y máximo respectivamente).
- También se utilizaron las 17 crías de las alpacas gestantes seleccionadas (10 hembras y 7 machos)

3.2.3 Metodología

Se tomaron muestras de suero sanguíneo provenientes de 17 alpacas madres y sus respectivas crías (n=17), abarcando diferentes estados fisiológicos. En el caso de las madres: pre-parto (47 días pre-parto en promedio, con un rango de 13 a 89 días) en noviembre del 2018; en el año 2019, lactación temprana (10 días post-parto) y tardía (167 días post-parto en promedio, con un rango de 152 a 181 días) en los meses de febrero y julio del 2019 respectivamente (Gráfico 2). En el caso de las crías, se colectaron las muestras de suero sanguíneo de estas el mismo día que a sus madres en los meses de febrero y julio del 2019.

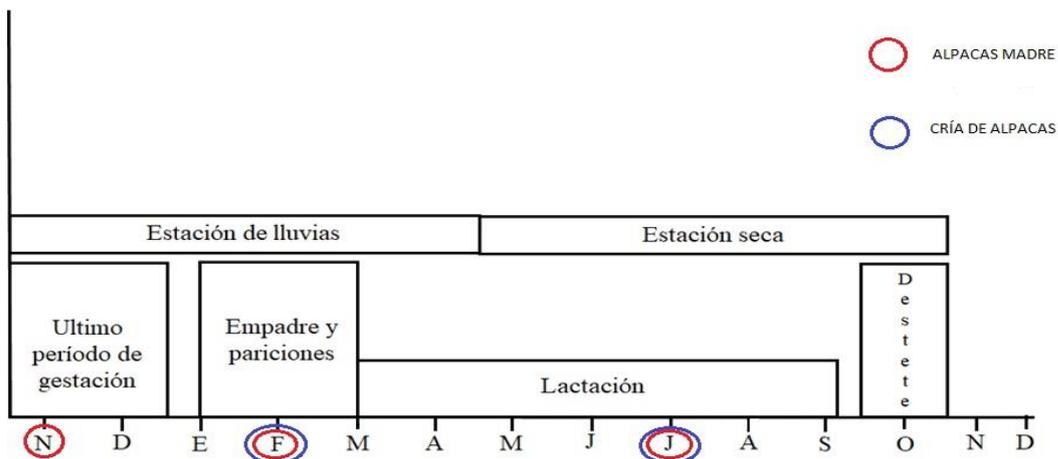


Gráfico 2: Esquema de muestreo de cobre en alpacas (madres y crías) durante los diferentes estadios fisiológicos según calendario productivo.

FUENTE: Tomado y adaptado de San Martín (1991).

La técnica a utilizada fue la veno-punción de la yugular externa, extrayéndose 10 ml de sangre tanto de las madres como de las crías (Figura 3). Estas muestras de sangre se recolectaron en tubos sin anticoagulante (Oblitas *et al.* 1998).



Figura 5: Técnica de Veno-punción



Figura 6: Suero Sanguíneo de alpaca

Para complementar la información proveniente de las concentraciones de cobre en el suero sanguíneo, se tomaron muestras de dietas seleccionadas por estos animales mediante el método de simulación a mano, tal como se detalló en el primer experimento. Se realizó en esta ocasión la observación de dos alpacas seleccionadas durante los meses de noviembre en el 2018, febrero y julio del 2019. Posteriormente, se realizó la evaluación de la composición florística del pastizal, mediante la utilización del método de transección lineal fija (Parker 1951) en las diferentes canchas donde estos animales se alimentaban (zonas de pastoreo de pre-parto, lactación temprana y lactación tardía). Se utilizaron tres transectas de 30 metros de largo con marcas por cada 30 cm (Figura 4) y con ayuda de un anillo censador se determinó las diferentes especies que se encontraban en la zona de pastoreo tanto para la etapa preparto (noviembre) y lactación (febrero y julio), estimándose así la composición florística del campo de pastoreo.



Figura 7: Transección lineal fija

3.2.4 Análisis de muestras

A. En el pasto:

Se realizó el análisis de cobre, hierro y molibdeno. Esta metodología fue descrita en el experimento 1.

B. En el suero sanguíneo:

Una vez colectadas las muestras de sangre se esperó que coagule, eliminando la fibrina formada y así obteniéndose el suero sanguíneo mediante el uso de una centrífuga. Ésta se almacenó a -20°C hasta el momento de la determinación de la concentración de cobre (dichas muestras fueron sometidas a un análisis de espectrofotometría de absorción atómica) (Rosadio *et al.* 2012).

Procedimiento según Soltero *et al.* (2007):

Desproteinización:

- Se pipeteó en tubos de centrifuga: Suero (1.0 ml) y ácido clorhídrico 1N (1.0 ml).
- Se mezcló y dejó en reposo durante 10 minutos a temperatura entre 15° y 25° C junto a una solución de ácido tricloroacético al 20% (1.0 ml).
- Se centrifugó el problema por 10 minutos a 3500 rpm.
- Se pipeteó el sobrenadante claro en tubos de ensayo secos. Sobrenadante exento de proteínas 2.0 ml aproximadamente.

Preparación de estándares

Se preparó la solución de glicerol al 10% (preparada a partir de glicerol concentrado y agua tridestilada para la obtención de la solución deseada). Esta solución se utilizó para la elaboración de los estándares que además sirvió como blanco de reactivo. Estándares de 1, 3 y 5 ppm preparados a partir de la solución patrón estándar de cobre de 100 ppm.

Lectura de las muestras

- Se realizó la lectura del blanco y los estándares para la obtención de la curva de calibración.
- Se hizo la lectura mediante el uso del espectrofotómetro de flama marca GBC modelo SavantAA Σ a una longitud de onda de 324.7 nm.
- Los resultados obtenidos se analizaron por medio del programa SAS 9.4, herramienta necesaria para la elaboración del estudio estadístico.



Figura 8: Suero desproteinizado de alpacas



Figura 9: Espectrofotómetro de flama

3.2.5 Diseños experimentales

Debido que se utilizaron los mismos individuos para ser comparados a través del tiempo se realizó un ANOVA con medidas repetidas, haciendo uso del comando PROC MIXED mediante el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis Software) version 9.4 para comparar la concentración de cobre en suero sanguíneo de las alpacas (Livacic *et al.* 2006).

Se realizaron dos diseños, uno con un factor y tres niveles en alpacas madre (estado fisiológico: pre-parto, lactación temprana y lactación tardía) y un diseño factorial 2x2 (parentesco: madre y cría; etapa fisiológica: lactación temprana y lactación tardía) con un 0.05 de significancia, de encontrarse diferencia significativa se realizó un test de mínimos cuadrados.

Se realizaron pruebas para determinar el modelo de estructura de covarianza que se ajuste mejor, siendo esta la de tipo H al tener un menor índice de Akaike (AIC) e índice de Schwarz (BIC) (SAS Institute 2002).

Diseño con medidas repetidas en un solo factor con tres niveles:

$$Y_{ij} = \mu + \pi_i + \tau_j + e_{ij}$$

Y_{ij} = Respuesta del sujeto i en el j -ésimo nivel del factor estado fisiológico

μ = Media general

π_i = Efecto aleatorio asociado al sujeto el cuál es constante bajo todas las repeticiones

τ_j = Efecto fijo en el j -ésimo nivel del factor estado fisiológico

e_{ij} = Error experimental asociado al sujeto i bajo el factor estado fisiológico

Diseño de medidas repetidas con dos factores:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_j + \beta_k + \pi_i(k) + \alpha\beta_{jk} + \pi\alpha_i(k)j + e_{ijk}$$

En este modelo:

Y_{ijk} = Puntuación obtenida en la variable Y por el sujeto i del grupo j en el tratamiento k .

μ = Parte de media común a todos los sujetos.

α_j = Efecto propio del j -ésimo nivel del factor estado fisiológico o el efecto atribuible al grupo j bajo el que se obtuvo la puntuación Y_{ijk} .

β_k = Efecto propio del k -ésimo nivel del factor etapa o el efecto atribuible al tratamiento k bajo el que se obtuvo la puntuación Y_{ijk} .

$(\alpha\beta)_{jk}$ representa el efecto de la interacción entre el grupo j del factor estado fisiológico y el nivel k del factor etapa.

π_i = efectos debidos a las diferencias entre los sujetos.

$(\pi\beta)_{ijk}$ = Término de errores aleatorios o las desviaciones de las puntuaciones del sujeto i respecto al promedio de su grupo y de los tratamientos.

e_{ijk} = Término de errores aleatorios o las desviaciones de las puntuaciones del sujeto i respecto al promedio de su grupo y de los tratamientos.

Los términos π_i , $(\pi\beta)$ y e_{ijk} son independientes y normales con media 0 y varianzas σ_{π}^2 , $\sigma_{\pi\beta}^2$ y σ_e^2 respectivamente.

Se realizó un modelo de regresión lineal para determinar si existe alguna relación entre madres y sus respectivas crías en dos estados fisiológicos (lactación temprana y lactación tardía):

$$Y = a + bX$$

Dónde:

Y: Variable dependiente, concentración en suero sanguíneo de cobre en las alpacas crías.

a: Intercepto.

b: Pendiente o coeficiente de regresión.

X: Variable independiente, concentración en suero sanguíneo de cobre en las alpacas madre

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EXPERIMENTO 1: CONTENIDO DE COBRE, HIERRO Y MOLIBDENO DE DIETAS SELECCIONADAS POR ALPACAS

4.1.1 Composición florística

Al realizarse el censo poblacional de las especies en las zonas de muestreo, se encontraron 29 especies diferentes (Anexo 1), las cuales nos dan una ligera apreciación acerca de las especies que las alpacas pueden consumir. Sin embargo, no todas las especies son deseables por estos animales, por lo que dependerá del tipo de sistema de pastoreo que se use, teniendo como restricción a la condición del pastizal para evitar casos de sobrepastoreo o erosión de suelos mediante malas prácticas de manejo del ganado (Descroix *et al.* 2008).

Las especies predominantes durante la época seca fueron: *Calamagrostis vicunarum* (12.3%), *Aciachne pulvinata* (10.7%), *Festuca rigescens* (8.3%) *Lolium perenne* (7%), *Scirpus rigidus* (6%) y *Stipa ichu* (5.3%), con un 8.3% de suelo desnudo, 0.67% de musgo y 6.33% de mantillo.

Por otro lado, durante la época húmeda, las especies predominantes fueron *Festuca dolichophylla* (14.3%), *Distichia muscoides* (8.7%), *Festuca dolichophylla* (7.7%), *Alchemilla pinnata* (6.3%) y *Luzula peruviana* (5%), con un 2% suelo desnudo, 2.3% de roca, 1% de musgo y 2.7% de mantillo.

4.1.2 Concentración de cobre, hierro y molibdeno en dietas seleccionadas por alpacas

Los valores presentados en la Tabla 1 provienen del promedio de dos muestras por cada cruce de factores (localidad x estación) (Anexos 2, 3 y 4). En la Tabla 2 se muestran valores provenientes del promedio de cuatro muestras por cada localidad, mientras que la Tabla 3 se muestra valores provenientes de seis muestras por cada estación.

Tabla 1: Concentración de cobre, hierro y molibdeno en dietas seleccionadas por alpacas en tres localidades durante las épocas seca y húmeda

	Pachacayo				San Pedro de Racco				Chuquibambilla			
	Épocas				Épocas				Épocas			
	Seca	SD	Húmeda	SD	Seca	SD	Húmeda	SD	Seca	SD	Húmeda	SD
Humedad	45.91	5.79	64.67	0.04	49.25	0.38	66.05	0.29	38.07	3.04	66.39	2
Ceniza	7.61	1.03	8.94	2.16	4.64	0.78	6.35	0.63	6.36	0.9	11.52	1.05
Cu (ppm)	8.1	1.5	9.5	0.7	8	1.4	11	4.2	4	0	8.5	0.5
Fe (ppm)	697.4	221	905.5	735	271	80.6	289.5	55.9	499.5	223	1632.5	59.5
Mo (ppm)	2.4	0.3	5.5	1.3	1.3	0.3	1.2	0.1	1.2	0	2.9	1.2

La humedad mostrada es aquella al momento del corte. Los valores de cada mineral se encuentran en base seca. La notación SD = desviación estándar. Los valores mostrados representan el contenido en ppm (partes por millón). Los valores corresponden al promedio de dos muestras en cada cruce de factores.

Después de desarrollar el diseño completamente al azar con arreglo factorial, no se encontró interacción entre localidades y la estaciones ($P\text{-Valor} > 0.05$) en ninguno de los minerales evaluados. Sin embargo, se encontró que existe diferencia significativa entre localidades (Fe y Mo) y estaciones (Cu y Mo). La información acerca de la concentración de minerales en dietas seleccionadas por alpacas criadas en zonas altoandinas es escasa. Es por ello que los valores obtenidos fueron comparados con otros dentro de los rangos considerados como normales o ideales. Además, se comparó los datos presentados contra otros obtenidos en crianzas extensivas, discutiendo algunas implicancias en relación a su concentración e interacción entre ellos.

Al realizar la comparación de medias entre las tres localidades, se pudo apreciar que no existe diferencia significativa para el Cu ($P\text{-Valor} > 0.05$) (Tabla 2). Sin embargo, en el caso de la concentración de Fe en dietas seleccionadas por alpacas, existe diferencia significativa entre las localidades de San Pedro de Racco y Chuquibambilla, mientras que la localidad de Pachacayo no tiene diferencia significativa al compararlas contra ambas. Por otro lado, en el caso de la concentración de Mo en dietas seleccionadas por alpacas, existe diferencia significativa entre las localidades de Pachacayo y San Pedro de Racco, mientras que la localidad de Chuquibambilla no tiene diferencia significativa al compararlas contra ambas. Tomando como referencia estos valores, es posible suponer que existe una posible variabilidad de estos dos minerales entre las zonas altoandinas.

La concentración de Cu en las dietas seleccionadas por alpacas se encuentra en los niveles nutricionales adecuados (8-12 ppm) en las tres localidades, sin embargo, el 50% de las muestras tomadas en Chuquibambilla mantiene valores nutricionales marginales (4-7 ppm) (Van Saun y Herdt 2014). En la localidad de San Pedro de Racco, la concentración de Fe en dietas seleccionadas por alpacas supera a los valores nutricionales adecuados (50-200 ppm), mientras que en Chuquibambilla, al igual que el 75% de las muestras de Pachacayo se encuentran dentro del rango de valores nutricionales excesivos (>400 ppm) (Van Saun y Herdt 2014). La concentración de Mo en las dietas seleccionadas por alpacas de las tres localidades es superior a los rangos nutricionales adecuados (>1 ppm) e incluso excesivos (>3 ppm) en el 50 % de las muestras obtenidas en Pachacayo (Van Saun y Herdt 2014).

Tabla 2. Concentración de cobre, hierro y molibdeno en dietas seleccionadas por alpacas en tres diferentes localidades

	Localidades						
	Pachacayo	SD	San Pedro de Racco	SD	Chuquibambilla	SD	P-Valor
Cu (ppm)	8.8 ^a	1.3	9.50 ^a	3.1	6.3 ^a	2.6	0.12
Fe (ppm)	801.5 ^{ab}	459	280.3 ^b	57.6	1066.0 ^a	668.4	0.04
Mo (ppm)	3.9 ^a	1.9	1.3 ^b	0.2	2.1 ^{ab}	1.4	0.01
Cu : Mo	2.25		7.42		3.03		

La notación SD = desviación estándar. Los valores de cada mineral se encuentran en base seca. Los valores mostrados representan el contenido en ppm = partes por millón. $\alpha = 0.05$. ^{a,b} Letras diferentes indican diferencia estadística. Los valores corresponden al promedio de cuatro muestras colectadas en tres diferentes zonas descritas en la metodología.

Al comparar la relación de Cu:Mo en las dietas seleccionadas por alpacas, se puede encontrar relaciones inferiores a los valores nutricionales adecuados para las localidades de Pachacayo y Chuquibambilla (<4:1) y dentro de los rangos nutricionales deseables (6-10:1) para la localidad de San Pedro de Racco (Van Saun y Herdt 2014). Es por ello, que es válido asumir que puede existir una menor absorción de Cu debido a la concentración de Mo en las dietas seleccionadas por alpacas (Laven y Livesey 2005).

Al realizar la comparación de medias entre las épocas húmeda y seca, se pudo apreciar que no existe diferencia significativa para el Fe (P-Valor > 0.005) en las dietas seleccionadas por alpacas. Por otro lado, si se obtuvo diferencia significativa entre la concentración de Cu y Mo, donde existe una mayor concentración durante la época húmeda en comparación con la época seca para ambos minerales (Tabla 3).

Tabla 3: Las épocas húmeda y seca Concentración de cobre, hierro y molibdeno en dietas seleccionadas por alpacas durante

	Épocas				P-valor
	Húmeda	SD	Seca	SD	
Cu (ppm)	9.7 ^a	1.9	6.7 ^b	3.3	0.04
Fe (ppm)	942.5 ^a	686.7	489.3 ^a	239.7	0.06
Mo (ppm)	3.2 ^a	2	1.6 ^b	1.5	0.02
Cu : Mo	3.02	-	4.07	-	-

La notación SD = desviación estándar. Los valores de cada mineral se encuentran en base seca. Los valores mostrados representan el contenido en ppm = partes por millón. $\alpha = 0.05$. ^{a,b} Letras diferentes indican diferencia estadística. Los valores corresponden al promedio de seis muestras colectadas en las épocas seca y húmeda descritas en la metodología.

Se puede apreciar niveles marginales y adecuados de Cu en las dietas seleccionadas por alpacas en la época seca y húmeda respectivamente. Por otro lado, Hoffman (2006) recomienda valores superiores a 11 ppm de Cu por día, mientras que Kamphues *et al.* (1999) recomiendan 8 gramos de Cu por Kg de materia seca en dietas para alpacas. Los valores obtenidos en este estudio son similares a los reportados por Espinoza *et al.* (1982), obteniendo 10.3 y 7 ppm de Cu para la época húmeda y seca respectivamente, sin embargo, no encontraron diferencia significativa en la concentración de Cu entre las estaciones. En zonas templadas, Judson *et al.* (2011) encontraron diferencias entre meses en la concentración de Cu al analizar dietas seleccionadas por alpacas, donde al igual que este estudio, se encontraron valores superiores durante la época húmeda en comparación con la época seca, obteniendo 8.7 y 4.3 ppm como máximo y mínimo respectivamente, correspondiendo a la época húmeda y seca respectivamente. Jones y Tracy (2013) también encontraron diferencias entre meses en la concentración de Cu en pastos naturales de zonas templadas, donde a diferencia de este estudio este estudio, se encontraron valores superiores durante la época seca en comparación con la época húmeda, siendo estos 11 y 7.2 ppm como

máximo y mínimo respectivamente, correspondiendo a la época seca y húmeda respectivamente.

En ambas épocas existe una cantidad excesiva de Fe en los valores obtenidos de las dietas seleccionadas por alpacas (Van Saun y Herdt 2014). Esto puede ocasionar una sobrecarga de este micro-mineral en los órganos que son depositados (hígado, corazón, glándulas endocrinas) causando lesiones (Powell *et al.* 2000). Por otro lado, a diferencia de este estudio, Espinoza *et al.* (1982) encontraron diferencia significativa en la concentración de Fe entre las estaciones al comparar dietas seleccionadas por llamas en zonas altoandinas, obteniendo 323 y 164 ppm en la época húmeda y seca respectivamente. En zonas templadas, Judson *et al.* (2011) encontraron diferencias entre meses en la concentración de Fe al analizar dietas seleccionadas por alpacas, obteniendo 1396 y 134 ppm como máximo y mínimo respectivamente, correspondiendo a la época húmeda y seca respectivamente, donde al igual que el presente estudio, se reportaron valores superiores a los adecuados durante la época húmeda, sin embargo, a pesar de contener niveles excesivos, no se reportaron problemas en los animales relacionados a este mineral. Además, es válido afirmar que el Fe depende de otros minerales como el Cu, el cual participa en su oxidación para su posterior transporte (Bento *et al.* 2007).

Se aprecian valores excesivos de Mo con respecto a los rangos normales durante la época húmeda y valores superiores a los adecuados durante la época seca en las dietas seleccionadas por alpacas (Van Saun y Herdt 2014). Al igual que este estudio, Espinoza *et al.* (1982) también encontraron diferencias entre estaciones en dietas al evaluar la concentración de Mo seleccionadas por llamas en zonas altoandinas, obteniendo 0.68 y 0.53 ppm en la época húmeda y seca respectivamente. En zonas templadas, Judson *et al.* (2011) encontraron diferencias entre meses en la concentración de Mo al analizar dietas seleccionadas por alpacas, obteniendo 1.8 y 1.3 ppm como máximo y mínimo respectivamente, correspondiendo a la época húmeda y seca respectivamente. Los valores reflejan que tanto en zonas altoandinas como en zonas templadas, existe una mayor concentración de Mo en pastos en la época húmeda en comparación con la época seca.

Al analizar la interacción de minerales en las dietas seleccionadas por alpacas en las dos estaciones, encontramos que existe una posible deficiencia de Cu debido a la interacción que esta tiene con el Mo durante la época húmeda, mientras que durante la época seca se obtuvo valores nutricionales marginales (4-4.5:1) al ser comparado con los valores adecuados (>4.5-6:1) (Van Saun y Herdt 2014).

4.2 EXPERIMENTO 2: CONCENTRACIÓN DE COBRE EN SUERO SANGUÍNEO DE ALPACAS MADRE Y SUS CRÍAS DURANTE EL PERIPARTO

4.2.1 Composición florística de las zonas muestreadas

La composición florística durante las tres etapas de muestreo determinó las especies que se encontraron con mayor frecuencia, así como el porcentaje de suelo desnudo, roca, musgo y mantillo (Anexos 5, 6 y 7)

Pre-parto

Durante esta época se encontró con mayor frecuencia a las especies *Alchemilla pinnata* (42.9%), *Calamagrostis vicunarum* (14.1%) y *Festuca dolichophylla* (12.7 %). Además, se encontró 8.7% de suelo desnudo, 1.6% de roca, 1.1% de musgo y 6.33% de mantillo. Las características del campo correspondían a una especie de pajonal por su gran cantidad de agrupaciones de gramíneas altas de hojas duras (Izco *et al.* 2007).

Lactación temprana

Durante esta época se encontró con mayor frecuencia a las especies *Calamagrostis vicunarum* (36 %), *Plantago tubulosa* (21.9 %) y *Festuca dolichophylla* (8.6 %). Además, se encontró 18.4% de suelo desnudo, 3.3% de roca, 0.1% de musgo y 1.8% de mantillo. Las características del campo correspondían a una especie de bofedal, debido a la acumulación de agua de lluvia o deshielo en el área de evaluación y a la presencia de especies típicas en el área de pastoreo (Fonkén 2014).

Lactación tardía

Durante esta época se encontró en mayor frecuencia a las especies *Alchemilla pinnata* (52 %), *Festuca dolichophylla* (13.7 %) y *Trifolium amabile* (12.8 %). Además, se encontró 0.7% de suelo desnudo, 0.8% de roca, 0.4% de musgo y 3.2% de mantillo. Las características del campo correspondían, al igual que durante el pre-parto, a una especie de pajonal por su gran cantidad de agrupaciones de gramíneas altas de hojas duras (Izco *et al.* 2007).

4.2.2 Contenido mineral de dietas seleccionadas por alpacas

Al comparar los niveles de cobre entre las dietas seleccionadas por alpacas con datos referenciales sobre los requerimientos descritos por Van Saun y Herdt (2014), se aprecia que hubo una cantidad adecuada (11 ppm) durante la época de pre-parto, esta colección de muestras coincidió con el inicio de la época húmeda. Mientras que, en la época de lactación temprana, los valores de Cu en las dietas seleccionadas por alpacas estaban dentro de los valores marginales (5 ppm) (Van Saun y Herdt 2014), este muestreo también coincidió con la época húmeda. Estos valores fueron similares a los reportados por Espinoza *et al.* (1982), obteniendo 10.3 ppm de Cu para la época húmeda. Para rumiantes, Kamphues *et al.* (1999) recomiendan que el contenido mínimo de Cu en la dieta debería ser de 8 ppm (materia seca) como mínimo, mientras que Hoffman (2006) recomienda valores superiores a 11 ppm de Cu por día (materia seca). Sin embargo, Van Saun (2014) recomienda en base a la extrapolación de requerimientos de cobre en otros rumiantes que las dietas de alpacas deberían contener cantidades entre 8-12 ppm para mantenimiento y crecimiento, mientras que para preñez y lactación niveles de 9-12 ppm en base seca. Suttle (1983) estimó que, en pequeños rumiantes en crecimiento, como por ejemplo las dietas de terneros, deben contener entre 6,2 y 7,5 ppm de Cu (base seca), según la edad y el ritmo de crecimiento. Por otro lado, Mills *et al.* (1976) aumentaron la concentración de Cu en la dieta para evitar signos clínicos de hipocuprosis en animales en crecimiento, siendo estos de 8 a 15 ppm por día (base seca). En animales adultos, los requerimientos aumentan durante la etapa gestación y no tanto en la lactancia, debido a la baja concentración de Cu en la leche (Gooneratne *et al.* 1989).

No se observó cantidades excesivas de Mo en las dietas seleccionadas por alpacas en relación al Cu en ninguna de las dos épocas muestreadas (1.27 y 1.08 ppm en pre-parto y lactación tardía respectivamente) (Van Saun y Herdt 2014), por lo que es posible afirmar que no hubo interferencia en cuanto a su absorción por formación de complejos como tiomolibdatos (Laven y Livesey 2005). Por otra parte, se observó valores superiores a los adecuados durante el pre-parto (307 ppm) y excesivos de Fe durante el muestreo en la época de lactación temprana (1194 ppm) (Van Saun y Herdt 2014), esto podría reducir la absorción del Cu, debido a que existe una competencia por el tipo de transportador a nivel de intestino delgado (Transportador de metal divalente 1 o DMT1) (Arredondo *et al.* 2006).

4.2.3 Contenido de cobre en el suero sanguíneo de alpacas

a. Alpacas adultas en tres estados fisiológicos

Al realizar el análisis estadístico de la concentración de Cu en el suero sanguíneo de alpacas (Anexo 8), no se obtuvo diferencia estadística entre las diferentes etapas fisiológicas de las alpacas madre (Tabla 4). La información sobre el contenido de Cu en suero sanguíneo de alpacas es escasa. Los datos obtenidos al muestrear el suero sanguíneo de alpacas que habitan la zona altoandina están por debajo del rango normal (0.4-0.79 ppm) reportado por Van Saun y Herdt (2014) para alpacas adultas y sanas, sin embargo, a pesar de poseer valores marginales, no se observaron signos clínicos. Otro estudio realizado con alpacas provenientes de Alemania arrojó valores promedio superiores a los encontrados en este estudio (0.53 ppm de suero sanguíneo para alpacas sanas) (Clauss *et al.* 2004). Por otro lado, análisis realizados en la universidad de Michigan-USA, reportaron un rango más amplio de concentración de cobre en suero sanguíneo en alpacas adultas, siendo este de 0.28 a 0.76 ppm (Herdt *et al.* 2000). Judson (1966) reportó otro rango de valores de Cu en suero sanguíneo de alpacas con un rango más estrecho para alpacas que se alimentan de pasturas naturales en Australia (0.48-0.65 ppm) (después de realizar la conversión de sus resultados de $\mu\text{mol/L}$ a ppm). Además, Ellison (2004) reportó que las alpacas que se alimentan de pastos naturales de Nueva Zelanda muestran un rango variado de Cu en suero sanguíneo de alpacas (0.33-1.02 ppm) (después de convertir sus resultados de $\mu\text{mol/L}$ a ppm), donde se presume que podría existir tanto casos de deficiencia como de toxicidad por este mineral, ya que las muestras provienen de diferentes áreas.

Tabla 4: Concentración de cobre en el suero sanguíneo de alpacas madre durante tres etapas fisiológicas

	Pre-parto	SD	Lactación temprana	SD	Lactación Tardía	SD	P-Valor
Cu (ppm)	0.370 ^a	0.1	0.398 ^a	0.07	0.404 ^a	0.06	0.425

Las muestras provienen de las mismas 17 alpacas en cada etapa fisiológica. SD = Desviación estándar. $\alpha = 0.05$. ^{a,b} Letras diferentes indican diferencia estadística. Pre-Parto = 47 días antes del parto en promedio, Lactación temprana = 10 días después del parto y Lactación tardía = 167 días después del parto en promedio.

A pesar de que no se encontró diferencia estadística entre los diferentes estados fisiológicos, se observa una ligera tendencia al incremento desde el pre-parto hacia la época de parto y lactación (Gráfico 3). El hígado tiene la capacidad de liberar Cu en eventos que pueden desencadenar factores de estrés, tales como: traslado (desde una zona a otra para que puedan pastorear en zonas con mejor oferta de alimento), condiciones climáticas extremas (el parto coincide con la época de lluvia y heladas), preñez avanzada y lactación (Herdt *et al.* 2000).

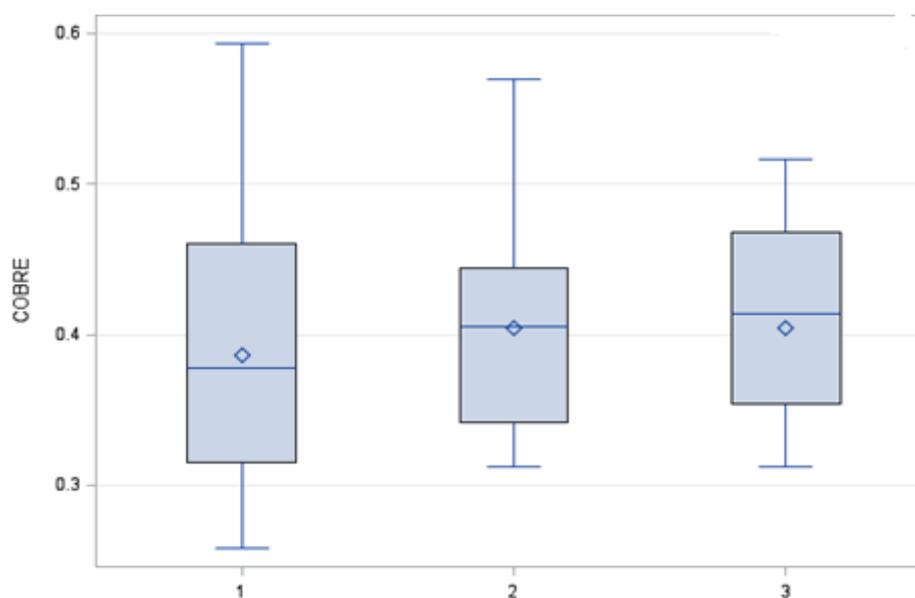


Gráfico 3: Concentración de cobre en suero sanguíneo de alpacas en diferentes etapas fisiológicas

1. Pre-parto = 47 días antes del parto en promedio. 2. Lactación temprana = 10 días después del parto en promedio 3. Lactación tardía = 167 días después del parto en promedio.

Durante la etapa de lactación temprana, la concentración de Cu en las dietas seleccionadas por las alpacas fue menor en comparación con el contenido de Cu durante la etapa de pre-parto. Sin embargo, la concentración de cobre en suero sanguíneo de alpacas durante estas épocas no fue estadísticamente diferente. Niveles bajos de Cu en el suero sanguíneo pueden indicar deficiencia de este elemento, en contraste, niveles normales o altos, no pueden asegurar con certeza que el animal posee un adecuado estatus de Cu (Claypool *et al.* 1975). Esto puede estar relacionado a la movilización de este elemento en el organismo en periodos de escasez y la capacidad que tiene este micro-mineral para su acumulación en el hígado en periodos de alta oferta (Levy *et al.* 2016).

b. Alpacas madre vs crías

Debido a la posible influencia que la edad del animal y la etapa fisiológica podrían tener en la concentración de Cu en el suero sanguíneo, se realizó el análisis del diseño factorial con medidas repetidas en dos factores. Al realizar el test de mínimos cuadrados (Anexo 10), se encontró que hubo diferencias tanto entre factores como en su interacción.

Al realizar el análisis, se obtuvo diferencia estadística entre la concentración de Cu en el suero sanguíneo de alpacas madres con sus respectivas crías durante la época de lactación (Gráfico 4). Se observó que las alpacas adultas poseen mayor concentración de Cu en el suero sanguíneo en comparación a sus crías durante la lactación temprana, sin embargo, al llegar a la lactación tardía los niveles de Cu en suero sanguíneo fueron similares entre madres y crías (Tabla 5). La gran diferencia entre niveles maternos y neonatales se debe a que la concentración de ceruloplasmina en el suero fetal es muy inferior y este no puede ser hallado con facilidad en la sangre (Schenker *et al.* 1972; Fattah *et al.* 1976). En otras especies de ruminantes, como en el caso de bovinos recién nacidos, se encontró que estos poseen unos 15 mg de cobre total (cantidad tres veces superior a la del adulto), sin embargo, posteriormente descende al 10% (Ryden y Deutsch 1978; Shaw 1980).

Tabla 5: Concentración de cobre en el suero sanguíneo de alpacas madre y sus crías durante la etapa de lactación

	Lactación temprana		Lactación tardía	
	Madre	Cría	Madre	Cría
Cu (ppm)	0.398 ^a	0.287 ^b	0.404 ^a	0.369 ^a
SD	0.07	0.09	0.06	0.05
R ² (%)	2.6		0.6	
CV (%)	31.97		13.11	

Las muestras provienen de las mismas 17 alpacas en cada etapa fisiológica con sus respectivas crías. SD = desviación estándar. $\alpha = 0.05$. ^{a,b} Letras diferentes indican diferencia estadística. R² = Coeficiente de determinación. CV = Coeficiente de variación. Lactación temprana = 10 días después del parto y Lactación tardía = 167 días después del parto en promedio.

Al realizar la prueba de mínimos cuadrados, se pudo observar que hubo influencia de la etapa fisiológica, parentesco y algunas interacciones de ambos factores en la concentración de cobre en el suero sanguíneo de las alpacas ($P\text{-Valor} < 0.05$). En los contrastes realizados entre las interacciones, se observa que existe diferencia significativa en la concentración de Cu en el suero sanguíneo de alpacas pertenecientes a la combinación Cría-Lactación temprana al compararla con las otras tres combinaciones (Anexo 10).

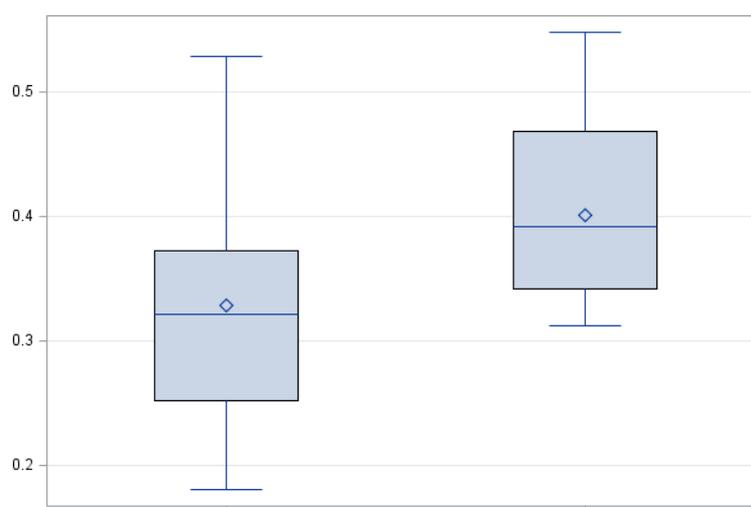


Gráfico 4: Concentración de cobre en suero sanguíneo de alpacas madres con sus respectivas crías durante la época de lactación

La caja derecha indica los valores del cobre en suero de las crías, mientras que la caja izquierda muestra los valores de las alpacas madre durante la época de lactación.

c. Crías de alpacas y relación con su madre

Se registró diferencia estadística entre la concentración de Cu en el suero sanguíneo de crías de alpacas durante la lactación temprana vs lactación tardía. Se observó que las crías de las alpacas tuvieron mayor concentración de Cu en suero sanguíneo durante la lactación tardía en comparación con la época de lactación temprana (Gráfico 5). Esto puede deberse que el animal empieza a ingerir pequeñas porciones de pasto, además de la leche materna (Van Saun 2014). No se encontró relación entre la madre y cría en cuanto a la concentración de Cu en el suero sanguíneo durante la lactación temprana (Anexo 11), ni durante la lactación tardía al realizarse el análisis de regresión lineal (Anexo 12). La concentración hepática de Cu en el feto depende del período de gestación (creciendo en forma exponencial) y de la concentración hepática de la madre, ya que cuando ésta es menor a 25 ppm (materia seca) el

depósito de Cu en el hígado del individuo prenatal es deficiente (Gooneratne y Christensen 1989). La concentración de Cu en la leche es baja (alrededor de 0.15 ppm), sin embargo, esta no se incrementa más allá del rango normal al aumentar el aporte de Cu en la dieta (Underwood y Suttle 1999; Underwood 1981), por lo que probablemente es una de las causas por las cuales no existe una relación entre el contenido de cobre en el suero sanguíneo de la madre y cría posterior al parto.

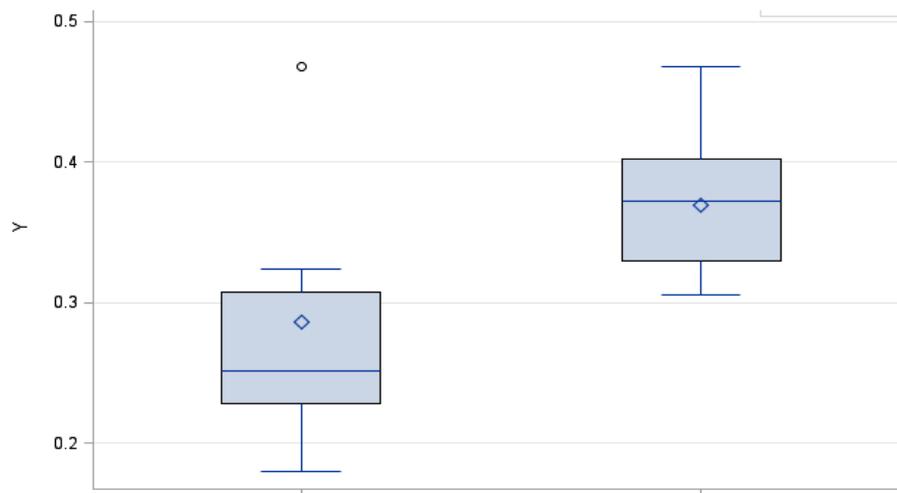


Gráfico 5: Concentración cobre en suero sanguíneo de crías de alpacas durante la época de lactación

La caja derecha indica los valores del cobre en suero de las crías durante la lactación temprana, mientras que la caja izquierda muestra los valores de las crías durante la lactación tardía.

V. CONCLUSIONES

- La concentración de Cu en dietas seleccionadas por alpacas no varió significativamente entre las localidades evaluadas.
- La concentración de Cu en dietas seleccionadas por alpacas fue significativamente superior en la época húmeda en comparación con la época seca, siendo niveles adecuados y marginales respectivamente.
- La concentración de Cu en el suero sanguíneo de las alpacas madre no varió significativamente entre el último tercio de gestación y el momento de lactación, siendo niveles marginales.
- La concentración de Cu en suero sanguíneo de las crías de alpacas en el momento de lactación tardía fue significativamente superior en comparación al momento de lactación temprana.
- La concentración de Cu en suero sanguíneo de alpacas madre fue significativamente superior al compararlo con las de sus crías durante la etapa de lactación temprana.
- No se encontró relación entre la concentración de Cu en suero sanguíneo de alpacas madre con las de su cría durante la lactación.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar biopsias hepáticas junto al muestreo de suero sanguíneo para medir la concentración y relación de Cu hepático y sérico en diferentes etapas fisiológicas del mismo animal.
- Evaluar el contenido de Cu en leche de alpaca en relación con el Cu hepático, para poder analizar la relación en cuanto a su transferencia de madre a cría posterior al parto.
- Evaluar la variación en el estatus de Cu de alpacas mediante la suplementación de Cu dietario en diferentes niveles.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akira, S.; Hirano, T.; Taga, T.; Kishimoto, T. 1990. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 and related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB*; 4: 2860-2861.

Ammerman, CB. 1970. Recent development in cobalt and copper in ruminant nutrition: A review. *J Dairy Sci*; 53: 1097-1107.

Appleton, JD. 1992. Review of the use of regional geochemical maps for identifying areas where mineral deficiencies or excesses may affect cattle productivity in tropical countries. British Geological Survey Technical Report WC/92/24.

Arredondo, M.; Martínez, R.; Núñez, M.; Ruz, M. and Olivares, M. 2006. Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc. *Biol Res* 39:95–102.

Ashton, DG.; Jones, DM.; Lewis, G. and Cinderey, RN. 1979. Some preliminary studies on blood and liver copper levels in ungulates at Whipsnade. *Erkrankungen der zootiere*. Berlin: Akademie-Verlag, 21, 35-144.

Austin, D.; Urness, P. and Fierro, L. 1983. Spring livestock grazing affects crested wheatgrass regrowth and winter use by mule deer. *Journal of Range Manangement*. 36:589-593.

Balbuena, O.; Mcdowell, LR.; Luciani, CA.; Conrad, JH.; Wilkinson, N. y Martin, FG. 1989. Estudios de la nutrición mineral de los bovinos para carne del este de las provincias de Chaco y Formosa (Argentina). 3. Cobre, molibdeno y azufre. *Vet Arg*; 6 (56): 365-374.

Bazán, R. 2018. Manual para el análisis químico. Fundación Perú. Universidad Nacional Agraria La Molina. Laboratorio de Análisis de Suelos de la Facultad de Agronomía. Pp 51-52.

Bennett, M. and Richards, N. 2015. Camelid Wellness. *Vet Clin Exot Anim*. 18: 255-280.

- Bento, I.; Peixoto, C.; Zaitsev, VN. and Lindley, PF. 2007. «Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites». *Acta Cryst. D63*: 240-248.
- Boila, RJ.; Devlin, TJ.; Drysdale, RA. and Lillie, LE. 1984. The severity of hypocupremia in selected herds of beef cattle in northwestern Manitoba. *Can J Anim Sci*; 64: 919-936.
- Boila, RJ.; Devlin, TJ. and Wittenberg, KM. 1987. Geographical variation of the total sulfur content of forages grown in northwestern Manitoba. *Can J Anim Sci*; 67: 867-872.
- Bonham M.; O'connor J.; Hannigan, B. and Strain J. 2002. The immune system as a physiological indicator of marginal copper status? *Br J Nutri*, 87, 393–403.
- Boyne, R. and Arthur, JR. 1979. Alterations of neutrophil function in selenium-deficient cattle. *J Comp Path*; 89: 151-158.
- Buckley, WT. 1991. A kinetic model of copper metabolism in lactating dairy cows. *Can J Anim Sci*; 71: 155- 166.
- Burton, S.; Robinson, TF.; Roeder, BL.; Johnston, NP.; Latorre, EV.; Reyes, SB. and Schaaajle, B. 2003. Body condition and blood metabolite characterization of alpaca (*Lama pacos*) three months prepartum and offspring three months postpartum. *Small Ruminant Research*. Vol. 48 (2): 69-76.
- Campbell, AG.; Coup, MR.; Bishop, WH. and Wright, DE. 1974. Effect of elevated iron on the copper status of grazing cattle. *N Z J Agric Res*; 17: 393-399.
- Carmalt, JL.; Baptiste, KE, and Blakley, B. 2001. Suspect copper toxicity in an alpaca, *Can Vet J* 42:554-556.
- Carrillo, BJ. and Bingley, JB. 1964. Técnica de biopsia de hígado y análisis de la muestra. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*; 1 (6): 103-118.
- Centre for tropical veterinary medicine (CTVM). 1992. Edimburgh University. British Geological Survey Technical Report WC/92/60.
- Cerone, SI.; Sansinanea AS.; Streitenberger SA.; Gracia MC. and Auza NJ. 1998. The effect of copper deficiency on the peripheral blood cells of cattle. *Vet Res Commun*; 22 (1): 47-57.

- Charmley LL.; Symonds HW. and Mallison CB. 1982. The clearance of copper from the plasma of cattle and its excretion in bile during the intravenous infusion of copper sulfate solution. *Proc Nutr Soc*, 41: 81A.
- Clauss M.; Lendl C.; Schramel P. and Streich J. 2004. Skin lesions in alpacas and llamas with low zinc and copper status – a preliminary report. *The Veterinary Journal* 167. 302–305.
- Claypool, D.; Adams F. and Pendell H. 1975. Relationship between the level of copper in the blood plasma and liver of cattle. *J Anim Sci* 41:911.
- Cousin, RJ. 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev*, 45 (2): 238-309.
- Descroix, L.; González, J.; Viramontes, D.; Poulenard, J.; Anaya, E.; Esteves, M. and Estrada, J. 2008. Gully and sheet erosion on subtropical mountain slopes: Their respective roles and the scale effect, *Catena* 325–339.
- Dick, AT. 1956. *Proceedings of the 7th International Grassland Congress*. 368 - 75.
- Echevarria, M.; Soikes, R.; Beeson, K. and Kalinowski, J. 1970. Interrelación suelo-plantanutrición-X. Composición química de los forrajes de Junín. *Anales Científicos*. VH VIII.179-194.
- Elchuri, S.; Oberley, TD.; Qi W.; Eisenstein, RS.; Roberts, J.; Van Remmen, H.; Epstein, CJ. and Huang, TT. 2005. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene*. 24(3):367-80.
- Ellison, RS. 2004. Trace Mineral Reference Ranges for alpaca. NZ alpaca association/MaF Sustainable Farming Fund/Gribbles veterinary Pathology unpublished report.
- Espinoza, JE.; Mcdowell, LR; Rodriguez, J; Loosli, JK.; Conrad, JH. and Martin, FG. 1982. Mineral status of llamas and sheep in the Bolivian Altipano. *Journal of Nutrition* 112, 2286–2292.
- Evans, GW. and Wiederanders, RE. 1967. Blood copper variation among species. *Am J Physiol*; 213 (5): 1183-1185.

Fattah, MM., Ibrahim, FK., Ramadan, MA. and Sammour, MB. 1976. Ceruloplasmin and copper levels in maternal and cord blood and in the placenta in normal pregnancy and preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*; 55:383-385.

Ferrer, CG.; Ramírez, CE. y Zaccardi, EM. 1989. Efectos de la suplementación parenteral de cobre sobre la ganancia diaria de peso en bovinos de diferentes edades. *Rev Arg Prod Anim*; 9 (3): 173-178.

Fleming, GA. 1973. Mineral composition of herbage. *Chemistry and biochemistry of herbage*. Ed. Academic Press. New York (USA); p. 529-566.

Fonkén, M. 2014. Introducción a los bofedales de la región Altoandina Peruana. *Mires and Peat*, Volume 15. Article 05, 1–13.

Fuentealba, YC. and Bratton, GR. 1994. The role of the liver, kidney and duodenum in tolerance in the copper-loaded rat. *Anal Cell Pathol*; 6: 345-358.

Gengelbach, GP. and Spears, JW. 1998. Effects of dietary copper and molybdenum on copper status, cytokine production, and humoral immune response of calves. *J Dairy Sci*; 81: 3286-92.

Gengelbach, GP.; Ward, JD.; Spears, JW and Brown, TT. 1997. Effects of copper deficiency and copper deficiency coupled with high dietary iron or molybdenum on phagocytic cell function and response of calves to a respiratory disease challenge. *J Anim Sci*; 75:1112-8.

Gengelbach, GP.; Ward, JD. and Spears, JW. 1994. Effect of dietary copper, iron, and molybdenum on growth and copper status of beef cows and calves. *J Anim Sci*; 72: 2722-2727.

Gómez, C.1984. Efecto de la suplementación con harina de pescado, urea y minerales sobre respuesta de ovinos en pasturas naturales altoandinas. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae. Universidad Nacional Agraria La Molina.

Gooneratne, R. and Christensen, D. 1989. Gestation age and maternal-fetal liver copper levels in the bovine. *Proc. 5th Int. Symp. Trace Elements in Man and Animal*, p: 334-336.

Gooneratne, SR.; Buckley, WT. and Christensen, DA. 1989. Review of copper deficiency and metabolism in ruminants. *Can J Anim Sci*; 69: 819-845.

- Gooneratne, SR.; Symonds, HW.; Bailey JV. and Christensen DA. 1994. Effects of dietary copper, molybdenum and sulfur on biliary copper and zinc excretion in Simmenthal and Angus cattle. *Can J Anim Sci*; 74: 315-325.
- Harris, ZL.; Durley AP.; Man, TK. and Gitlin, JD. 1999. Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 96(19):10812-10817.
- Hoffman, E. 2006. *The complete alpaca book*, 2nd edn. Bonny Doon Press, Santa Cruz, 620 p
- Hooper, J.; Wilson, J. and Crean, J. 2009. Exploring the link between microorganisms and oral cancer: A systematic review of the literature. *Head and Neck (en inglés)* 31 (9): 1228-1239.
- Humphries, WR.; Phillippo, M.; Yuong, BW. and Bremner, Y. 1983. The influence of dietary iron and molybdenum on copper metabolism in calves. *Br J Nutr*; 49: 7786.
- Igarza, L.; Agostini M., Becú-Villalobos D. and Auza, N. 1996. Effects of molibdenosis on luteinizing-hormone, folliclestimulating and estradiol hormones in rats. *Arch Med Vet*; 28: 101-106.
- Izco, J.; Pulgar, I.; Aguirre, Z. y Santin, F. 2007. Estudio Florístico De Los Páramos De Pajonal Meridionales De Ecuador. *Revista Peruana De Biología* 14 (2), 237-246.
- Johnson, MA.; Fischer, JG.; and Kays, SE. 1992. Is copper an antioxidant nutrient? *Crit Rev Food Sci Nutr*;32(1):1-31.
- Jones, GB. and Tracy, BF. 2013. Evaluating seasonal variation in mineral concentration of cool-season pasture herbage. *Grass and Forage Science*, 70, 94–101.
- Judson. GJ.; Mcgregor, BA. and Howse, AM. 2011. Blood mineral, trace-element and vitamin concentrations in Huacaya alpacas and Merino sheep grazing the same pasture. *Animal Production Science*, 51(10): 873.
- Judson, GJ. 1966. Survey of the mineral, trace element and vitamin status of alpacas. *Camelid Medicine and Surgery, Proceedings 278, Post Graduate Foundation in Veterinary Science, University of Sydney*, pages 311-317.
- Junge, RE. and Thornburg, L. 1989. Copper poisoning in four llamas, *J Am Vet Med Assoc* 195(7):987-989.

- Kalinowski, J. 1970. Interrelaciones-suelos-planta-nutrición composición química de algunas especies forrajeras nativas del altiplano del departamento de Puno. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Kamphues, J.; Schneider, D. and Leibetseder, J. 1999. *Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernahrung*. Schaper, Alfeld-Hannover, Germany.
- Karesh, WB.; Uhart, MM.; Dierenfeld, ES.; Braselton, WE.; Torres, A.; House, C.; Puche, H. and Cook, RA. 1998. Health evaluation of free-ranging guanaco. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 29, 134–141.
- Kegley, EB. and Spears, JW. 1994. Bioavailability of feed-grade copper sources (oxide, sulfate, or lysine) in growing cattle. *J Anim Sci*; 72: 2728-2734.
- Kincaid, RL. 1999. Assessment of trace mineral status of ruminants: A review. *Proceeding of the American Society of Animal Science*; p. 1-10. Koller, LD.; Mulhern, SA.; Frankel, NC., Steven, MG. and Williams, JR. 1987. Immune dysfunction in rats fed a diet deficient in copper. *American Journal of Clinical Nutrition* 45, 997–1006.
- Kono, S. 2012 Aceruloplasminemia. *Curr Drug Targets*. Vol 13 (9):1190-1199.
- Laven, R. and Livesey, C. 2005. The diagnosis of copper related disease, part 2: copper responsive disorders. *Cattle Pract* 13, 55–60.
- Leigh, LC. 1975. Changes in the ultrastructure of cardiac muscle in steers deprived of copper. *Res Vet Sci*; 18: 282-287.
- Levy, A.; Nissim, M.; Mendelman, N.; Chill, J. and Ruthstein, S. 2016. Ctr1 Intracellular Loop Is Involved in the Copper Transfer Mechanism to the Atox1 Metallochaperone. *J Phys Chem B*.; 120 (48):12334-12345.
- Levy, M. 2007. Anemia in 2 alpacas from the same herd. In *Proceedings of the International Camelid Health Conference*, Corvallis, Oregon, Oregon State University, (pp 121-122).
- Livacic, P.; Vallejo, G. and Fernández, P. 2006. Procedimientos estadísticos alternativos para evaluar la robustez mediante diseños de medidas. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 38(3), 579-598.

- Mattioli, GA.; Ramírez, CE.; Giuliadori, MJ.; Tittarelli, CM.; Yano, H. and Matsui, T. 1996. Characterization of cattle copper deficiency in the Magdalena District. *Livest Prod Sci*; 47: 7-10.
- Mcdowell, L. 2003. *Minerals in animals and human nutrition*. 2nd ed. Elsevier Science BV Amsterdam, Netherlands. 144 p.
- Meyer, LA.; Durley, AP.; Prohaska, JR. and Harris, ZL. 2001. Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice. *J Biol Chem*; 276(39):36857-36861
- Mills, CF.; Dalgarno, AC. and Wenham, G. 1976. Biochemical and pathological changes in tissues of Friesian cattle during the experimental induction of copper deficiency. *Br J Nutr*; 35: 309-331.
- Mills, CF. 1983. Trace elements in animals productions and veterinary practice. Occ. publication N° 7, Ed. Suttle, NF, Gunn RG, Allen WM, Linklater KA, Wiener G. London (Inglaterra); p.1-10.
- Mills, CF. 1987. Biochemical and physiological indicators of mineral status in animals: copper, cobalt and zinc. *J Anim Sci* 1987; 65:1702-11 Morgan, KL. 1992. Ataxia and head tremor in an alpaca. *The Veterinary Record* 131, 216– 217.
- Mullaney, TP.; Slanker, MR.; Fitzgerald, SD.; Elliott, MW.; Braselton, WE. and Main KE. 1996. Copper toxicosis in llamas. In: *Proc. Am. Assoc. Vet Lab. Diag.* p. 36.
- National Research Council. 1984. *Nutrient requirements of domestic animals, nutrient requirement of beef cattle*. 6 th. Ed. National Academic of Science-National Research Council, Washington (USA).
- Nederbragt, H.; Van Den Ingh, TSGAM. and Wensvoort P. 1984. Pathobiology of copper toxicity. *Vet Quat*; 6 (4):179-185.
- Oblitas, F.; Pedrozo, R.; Witwer, F.; Bohmwald, H. y Ludiwig, H. 1998. Valores sanguíneos en alpacas (lama pacos) reintroducidas en sur de Chile. *Vet. Mex*, 29 (4):411- 414.
- O'dell, BL. and Sunde, RA. 1997. *Handbook of nutritionally essential mineral elements*. Marcel Dekker Inc., New York.

Olkowski, AA.; Gooneratne, SR. and Christensen, DA. 1990. Effects of diets of high sulfur content and varied concentrations of copper, molybdenum and thiamine on in vitro phagocytic and candidacidal activity of neutrophils in sheep. *Res. Vet. Sci.* 48: 82-86.

Parker, KW. 1951. A method for measuring trend in range condition on National Forest ranges. USDA Forest Service, Washington, D.C. 26pp.

Pecina, P.; Houstkova, H.; Hansikova, H.; Zeman, J. and Houstek, J. 2004. Genetic Defects of Cytochrome c Oxidase Assembly. *Physiol. Res.* 53(Suppl. 1): S213-S223.

Phillippo, M.; Humphries, WR.; Atkinson, T.; Henderson, GD. and Garthwaite, PH. 1987. The effect of dietary molybdenum and iron on copper status, puberty, fertility and oestrus cycles in cattle. *J Agric Sci*; 109: 321-336.

Phillippo, M. 1983. Trace elements in animals productions and veterinary practice. Occ. publication N° 7, Ed. Suttle, NF, Gunn RG, Allen WM, Linklater KA, Wiener G. London (Inglaterra); p. 51-60.

Powell, L.; Subramaniam, V. and Yapp, T. 2000. Haemochromatosis in the new millennium. *J. Hepatol.* 32 (1):48-62.

Ramírez, CE.; Tittarelli, CM.; Mattioli, GA.; Giuliadori, MJ. and Puchuri, MC. 1997. Hipocupremia bovina en 5 partidos de la provincia de Buenos Aires. Argentina. *Vet Arg*; 14 (131): 12-17.

Ringler, DJ. 1996. Inflammation and repair. In: Jones TC, Hunt RD, King NW. *Veterinary pathology.* 6 th edition, Baltimore, USA. Williams & Wilkins,. Pp: 113-57.

Roberts, EA. and Schilsky, ML. 2008. Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology*; 47(6):2089-2111.

Rosa, D. y Mattioli, G. 2002. Metabolismo y deficiencia de cobre en los bovinos. *Nalecta veterinaria*; 22, 1: 7-16.

Rosadio, R; Yaya, K; Véliz, A; Rodríguez, A; Castillo, H y Wheeler, J. 2012. Análisis microbiológico, patológico y determinaciones de microelementos en vicuñas afectadas con “casha”. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.* 23: 357-368.

- Ryden, L. and Deutsch, HF. 1978 Preparation and properties of the mayor copper binding component in human fetal liver: its identification as metallothionein. *J Biol Chem*; 253:519-524.
- San Martín, F. 1991. Nutrición y alimentación. En Producción de rumiantes menores: Alpacas. Rerumen. Lima. Perú: 72-93.
- SAS Institute. 2002. SAS/STAT software: Version 9.0 (TS M0). Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Schenker, J.; Jungreis, E. and Polishuk, Z. 1972. Maternal and fetal serum copper levels at delivery. *Biol Neonate*; 20:189-195.
- SENAMHI. 2017. Ciclos horarios de precipitación en el Perú utilizando información satelital. Dirección de Hidrología. Lima- Perú. Pp 24.
- Shaw, JCL. 1980. Trace elements in the fetus and young infant. II. Copper, manganese, selenium and chromium. *Am J Dis Child*; 134: 74 - 81.
- Shils, ME.; Shike, M.; Ross, AC.; Caballero, B. and Cousins, RJ. 2006. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;286-299.
- Smith, BP.; Fisher, GL.; Poulos, PW. and Irwin, MR. 1975. Abnormal bone development and lameness associated with secondary copper deficiency in young cattle. *JAVMA*; 166 (5): 682-688.
- Soltero, D.; Palafox, D.; Herrera, I.; Dávila, A.; Cuéllar, J. and González, M. 2007. Determinación de niveles de cobre en una población estudiantil por espectrofotometría de absorción atómica en flama. *Synthesis*. (40):1-6.
- Steffan, PE.; Fiel, CA.; Odriosola, ER.; Acuña, CM. y Rojas, FM. 1982. Evaluación y comparación de dos productos de aplicación parenteral, en la terapéutica de la hipocuprosis de los novillos. *Rev Arg Prod Anim*,2: 1-10.
- Suttle, NF. and Jones, DG. 1989. Recent developments in trace element metabolism and function: trace elements, disease resistance and immune responsiveness in ruminant. *J Nutr*; 119:1055-1061.
- Suttle, NF. 1974. Effects of organic and inorganic sulphur on the availability of dietary copper to sheep. *Br J Nutr*; 32: 559-568.

- Suttle, NF. 1983. Trace elements in animals productions and veterinary practice. Occ. publication N° 7, Ed. Suttle, NF, Gunn RG, Allen WM, Linklater KA, Wiener G. London (Inglaterra); p. 19-25.
- Suttle, NF. 1986. Problems in the diagnosis and anticipation of trace element deficiencies in grazing livestock. *Vet Rec*; 119: 148-152.
- Tejada, R.; Mcdowell, LR.; Martin, FG. and Conrad, JH. 1985. Evaluation of cattle mineral status in specific regions of Guatemala. *Trop Agric*; 64 (1): 55-60.
- Thackeray, EW.; Sanderson, SO.; Fox, JC. and Kumar, N. 2011. Hepatic iron overload or cirrhosis may occur in acquired copper deficiency and is likely mediated by hypoceruloplasminemia. *J Clin Gastroenterol*;45(2):153-158.
- Thornton, I.; Atkinson, WJ. and Webb, JS. 1966. Geochemical reconnaissance and bovine hypocuprosis in CO. Limerick, Ireland. *Irish J Agric Res*; 5 (2): 280-283.
- Thornton, I.; Kershaw, GF. and Davies, MK. 1972. An investigation into copper deficiency in cattle in the Southern Pennines. II. Response to copper supplementation. *J Agric Sci*; 78: 165-171.
- Thornton, I. 1983. Trace elements in animals productions and veterinary practice. Occ. publication N° 7, Ed. Suttle, NF, Gunn RG, Allen WM, Linklater KA, Wiener G. London (Inglaterra); p. 39-49.
- Torre, PM.; Harmon, RJ.; Sordillo, LM.; Boissonneault, GA.; Hemken, RW.; Trammeu, DS. and Clark, TW. 1995. Modulation of bovine mononuclear cell proliferation and cytokine production by dietary copper insufficiency. *J Nutr Immunol*; 3: 3-20.
- Uauy, R.; Olivares, M. and Gonzalez, M. 1998. Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr*;67 (5 Suppl):952-959.
- Underwood, EJ. and Suttle, NF. 1999. *The Mineral Nutrition of Livestock*. CABI Publishing. London. UK.
- Underwood, EJ. 1981. Copper, molybdenum and sulfur. *The Mineral Nutrition of Livestock*, 2 ed, Ed. Commonwealth Agric Bureaux; p. 91-111.
- Van Saun, R. (a) 2009. Nutritional diseases of llamas and alpacas. *Vet Clin Food Anim*. 25: 797-810.

- Van Saun, R. (b) 2009. Nutritional requirements and assessing nutritional status in camelids. *Vet Clin Food Anim.* 25: 265-279.
- Van Saun, R. 2014. Nutritional Requirements. En *Llama and alpaca care: medicine, surgery, reproduction, nutrition, and heard health*. 1°Edi. Elsevier. 59-79.
- Van Saun, R. and Herdt, T. 2014. *Llama and Alpaca Care*. Chapter 12: Nutritional Assessment. ELSEVIER. St Louis - USA. Pp 100-123.
- Vashchenko, G. and Macgillivray, R. 2013. Multi-copper oxidases and human iron metabolism. *Nutrients*; 5(7):2289-2313.
- Videt-Giobou, D.; Belliard, S.; Bardou-Jacquet, E.; Troadec, MB.; Le Lan, C.; Jouanolle, AM.; Loréal, O.; Rivalan, J. and Brissot, P. 2009. Iron excess treatable by copper supplementation in acquired aceruloplasminemia: a new form of secondary human iron overload?. *Blood*.114(11):2360-2361.
- Viejo, RE. y Casaro, AP. 1993. Efectos de la suplementación con cobre sobre la ganancia de peso, cobre hepático y plasmático en terneros. *Rev Arg Prod Anim*; 13: 97-105.
- Ward, JD.; Spears, JW. and Gengelbach, GP. 1995. Differences in copper status and copper metabolism among Angus, Simmenthal, and Charolais cattle. *J Anim Sci*; 73: 571-577.
- Weaver, DM.; Tyler, JW.; Casteel, SW.; Loiacono, CM. and Turk, JR. 1999. Subclinical copper accumulation in llamas, *Can Vet J* 40:422-424.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Composición florística durante la época seca y lluviosa en tres localidades.

Especie	Sais Túpac Amaru		San Pedro de Racco		Chuquibambilla	
	Seca	Húmeda	Seca	Húmeda	Seca	Húmeda
<i>Muhlebergia fastigiata</i>	4	0	0	0	37	36
<i>Stipa ichu</i>	0	0	0	0	16	6
<i>Calamagrostis vicunarum</i>	21	3	7	10	9	0
<i>Stipa Brachyphylla</i>	0	0	0	5	0	0
<i>Hypochoeris taraxacoides</i>	0	0	0	0	6	0
<i>Scirpus rigidus</i>	7	0	6	0	5	2
<i>Poa pratensis</i>	0	20	0	0	3	0
<i>Alchemia pinnata</i>	3	8	2	11	1	0
<i>Festuca dolichophylla</i>	0	0	0	0	0	23
<i>Trifolium amabile</i>	0	5	0	0	0	13
<i>Paspalum pygmaeum</i>	0	0	0	0	0	9
<i>Liabum ovatum</i>	0	0	0	0	0	5
<i>Calamagrostis antoniana</i>	0	0	0	0	0	3
<i>Distichilis humilis</i>	0	0	0	0	0	2
<i>Geranium sessiliflorum</i>	0	0	0	0	0	1
<i>Festuca rigescens</i>	25	0	0	0	0	0
<i>Luzula peruviana</i>	5	15	0	0	0	0
<i>Lolium perenne</i>	11	0	10	9	0	0
<i>Aciachne pulvinata</i>	6	0	26	0	0	0
<i>Dactylis glomerata</i>	4	0	1	0	0	0
<i>Festuca rigescens</i>	0	34	14	9	0	0
<i>Carex bonplandii</i>	0	6	0	0	0	0
<i>Bromus catharticus</i>	0	0	1	0	0	0
<i>Stipa Brachyphylla</i>	0	0	7	0	0	0
<i>Plantago sericea</i>	0	0	3	0	0	0
<i>Plantago tubulosa</i>	0	0	8	3	0	0
<i>Plantago rigida</i>	0	0	8	0	0	0

<i>Distichia muscoides</i>	0	0	0	26	0	0
<i>Muhlenbergia ligularis</i>	0	0	0	12	0	0
Suelo desnudo	3	4	7	2	15	0
Roca	0	0	0	7	0	0
Musgo	0	3	2	0	0	0
Mantillo	11	2	0	6	8	0
TOTAL	100	100	100	100	100	100

Anexo 2: Valores de Cu y ANOVA en dietas seleccionadas por alpacas durante las épocas seca y húmeda.

MUESTRA	Cu (PPM)
Sais Túpac Amaru – Época Seca – Alpaca 1	9
Sais Túpac Amaru – Época Seca – Alpaca 2	7
Sais Túpac Amaru – Época Húmeda – Alpaca 1	10
Sais Túpac Amaru – Época Húmeda – Alpaca 2	9
San Pedro – Época Seca – Alpaca 1	7
San Pedro – Época Seca – Alpaca 2	9
San Pedro – Época Húmeda – Alpaca 1	14
San Pedro – Época Húmeda – Alpaca 2	8
Chuquibambilla – Época Seca – Alpaca 1	4
Chuquibambilla – Época Seca – Alpaca 2	4
Chuquibambilla – Época Húmeda – Alpaca 1	9
Chuquibambilla – Época Húmeda – Alpaca 2	8

*La muestra Sais Túpac Amaru – Época Seca – Alpaca 1 fue eliminada por presentar un posible error en el muestreo.

ANOVA

Fuente	DF	TIPO III S S	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Localización	2	23.167	11.583	3.02	0.124
Estación	1	27	27	7.04	0.038
Loc x Est	2	4.5	2.25	0.59	0.585

Anexo 3: Valores de Fe y ANOVA en dietas seleccionadas por alpacas durante las épocas seca y húmeda.

MUESTRA	Fe (PPM)
Sais Túpac Amaru – Época Seca – Alpaca 1	541
Sais Túpac Amaru – Época Seca – Alpaca 2	854
Sais Túpac Amaru – Época Húmeda – Alpaca 1	1425
Sais Túpac Amaru – Época Húmeda – Alpaca 2	386
San Pedro – Época Seca – Alpaca 1	328
San Pedro – Época Seca – Alpaca 2	214
San Pedro – Época Húmeda – Alpaca 1	329
San Pedro – Época Húmeda – Alpaca 2	250
Chuquibambilla – Época Seca – Alpaca 1	342
Chuquibambilla – Época Seca – Alpaca 2	657
Chuquibambilla – Época Húmeda – Alpaca 1	1692
Chuquibambilla – Época Húmeda – Alpaca 2	1573

*La muestra Sais Túpac Amaru – Época Seca – Alpaca 1 fue eliminada por presentar un posible error en el muestreo.

ANOVA

Fuente	DF	TIPO III S S	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Localización	2	1278753.167	639376.583	5.86	0.039
Estación	1	616080.083	616080.083	5.64	0.055
Loc x Est	2	711215.167	35567.583	3.26	0.11

Anexo 4: Valores de Mo y ANOVA en dietas seleccionadas por alpacas durante las épocas seca y húmeda

MUESTRA	Mo (PPM)
Sais Túpac Amaru – Época Seca – Alpaca 1	2.59
Sais Túpac Amaru – Época Seca – Alpaca 2	2.11
Sais Túpac Amaru – Época Húmeda – Alpaca 1	4.56
Sais Túpac Amaru – Época Húmeda – Alpaca 2	6.35
San Pedro – Época Seca – Alpaca 1	1.52
San Pedro – Época Seca – Alpaca 2	1.13
San Pedro – Época Húmeda – Alpaca 1	1.15
San Pedro – Época Húmeda – Alpaca 2	1.32
Chuquibambilla – Época Seca – Alpaca 1	1.21
Chuquibambilla – Época Seca – Alpaca 2	1.25
Chuquibambilla – Época Húmeda – Alpaca 1	4.1
Chuquibambilla – Época Húmeda – Alpaca 2	1.69

*La muestra Sais Túpac Amaru – Época Seca – Alpaca 1 fue eliminada por presentar un posible error en el muestreo.

ANOVA

Fuente	DF	TIPO III S S	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Localización	2	14.5	7.25	9.23	0.0148
Estación	1	7.3	7.3	9.3	0.023
Loc x Est	2	5.12	2.56	3.26	0.11

Anexo 5: Composición florística de la cancha de pastoreo durante el pre-parto

ESPECIE	PRE-PARTO										%	DESEABILIDAD
	TRANSECTA											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
<i>Alchemilla pinnata</i>	22	34	38	49	52	41	46	55	48	42.78	D	
<i>Festuca dolichophylla</i>	30	25	23	5	2	1	9	10	9	12.67	D	
<i>Calamagrostis vicunarum</i>	7	18	18	7	26	21	8	12	10	14.11	D	
<i>Trifolium amabile</i>	0	0	0	0	0	0	3	3	2	0.89	D	
<i>Stipa ichu</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.33	PD	
<i>Aciachne pulvinata</i>	0	0	0	0	3	0	4	6	9	2.44	I	
<i>Scirpus rigidus</i>	8	4	5	6	8	10	6	3	12	6.89	D	
<i>Belloa piptolepis</i>	5	1	13	2	1	11	0	3	1	4.11	PD	
<i>Azorella compacta</i>	2	0	0	1	0	0	3	0	0	0.67	I	
<i>Geranium sessiliflorum</i>	1	4	0	0	0	0	0	7	0	1.33	PD	
<i>Plantago tubulosa</i>	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0.44	PD	
<i>Plantago lamprophylla</i>	0	0	0	4	0	5	1	0	0	1.11	PD	
Suelo desnudo	23	13	1	16	4	10	7	0	4	8.67		
Roca	2	0	0	3	2	0	7	0	0	1.56		
Mantillo	0	1	2	1	0	1	0	1	2	0.89		
Musgo	0	0	0	2	2	0	6	0	0	1.11		
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
Índice de vigor promedio (cm)	2.32	2.1	2.63	2.42	1.91	2.26	2	2.95	3.44	40.80		

Anexo 6: Composición florística de la cancha de pastoreo durante la lactación temprana

LACTACIÓN TEMPRANA											
ESPECIE	TRANSECTA									%	DESEABILIDAD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
<i>Alchemilla pinnata</i>	1	2	14	2	0	2	2	37	6	7.33	D
<i>Festuca dolichophylla</i>	7	8	21	2	0	3	9	13	14	8.56	D
<i>Azorella compacta</i>	0	1	5	0	0	0	6	0	4	1.78	I
<i>Calamagrostis vicinarum</i>	42	55	47	25	17	22	35	31	50	36.00	D
<i>Plantago tubulosa</i>	0	0	0	56	76	56	0	9	0	21.89	PD
<i>Bidens andicola</i>	0	0	0	1	0	4	0	0	0	0.56	PD
<i>Geranium sessiliflorum</i>	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0.22	PD
Suelo	49	31	12	12	7	11	27	3	14	18.44	
Roca	1	3	0	0	0	0	18	2	6	3.33	
Mantillo	0	0	0	2	0	0	3	5	6	1.78	
Musgo	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.11	
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100.00	
Índice de vigor promedio (cm)	5.5	6.8	5.3	7	5.3	6.1	6	6.5	6.6	30.61	

Anexo 7: Composición florística de la cancha de pastoreo durante la lactación tardía

PARTO O LACTACIÓN TARDÍA											
ESPECIE	TRANSECTA									%	DESEABILIDAD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
<i>Alchemilla pinnata</i>	54	48	56	64	63	51	52	52	28	52.00	D
<i>Festuca dolichophylla</i>	13	19	16	15	17	18	7	3	15	13.67	D
<i>Muhlenbergia fastigiata</i>	0	0	9	3	0	0	0	0	0	1.33	D
<i>Calamagrostis vicunarum</i>	4	1	0	0	0	2	10	6	1	2.67	D
<i>Trifolium amabile</i>	8	19	8	1	1	16	9	17	36	12.78	D
<i>Stipa ichu</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0.11	PD
<i>Aciachne pulvinata</i>	4	0	0	0	4	0	0	0	0	0.89	I
<i>Scirpus rigidus</i>	5	4	1	4	0	2	4	0	0	2.22	D
<i>Belloa piptolepis</i>	3	8	3	0	0	0	0	1	1	1.78	PD
<i>Azorella compacta</i>	4	0	4	7	5	1	0	6	0	3.00	I
<i>Geranium sessiliflorum</i>	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0.33	PD
<i>Paraphelium ovatus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0.11	PD
<i>Bidens andicola</i>	0	0	0	0	0	0	10	9	17	4.00	PD
Suelo desnudo	2	1	1	0	1	0	1	0	0	0.67	
Roca	1	0	0	0	0	2	0	4	0	0.78	
Mantillo	2	0	0	2	8	6	7	2	2	3.22	
Musgo	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0.44	
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Índice de vigor promedio (cm)	1.72	2.43	3.14	2.77	3	3.26	4.19	2.61	3.46	49.22	

Anexo 8: Valores de Cu en suero sanguíneo de alpacas en tres estados fisiológicos diferentes

ESTADO FISIOLÓGICO		
PRE-PARTO	LACTACIÓN TEMPRANA	LACTACIÓN TARDÍA
0.593	0.407	0.378
0.366	0.318	0.444
0.282	0.323	0.366
0.258	0.342	0.474
0.288	0.336	0.324
0.282	0.528	0.312
0.402	0.405	0.414
0.288	0.414	0.42
0.51	0.486	0.378
0.378	0.366	0.468
0.336	0.492	0.324
0.437	0.366	0.354
0.354	0.42	0.516
0.45	0.312	0.468
0.27	0.548	0.33
0.463	0.345	0.492
0.33	0.36	0.414

Test de tipo 3 para factor estado fisiológico:

Tests de tipo 3 de efectos fijos				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Estado fisiológico	2	32	0.88	0.425

Anexo 9: Valores de Cu en suero sanguíneo de alpacas madre vs sus propias crías

Cu (ppm)		
LACTACIÓN	MADRE	CRÍA
Temprana	0.407	0.324
	0.318	0.228
	0.323	0.222
	0.342	0.468
	0.336	0.293
	0.528	0.528
	0.405	0.306
	0.414	0.18
	0.486	0.228
	0.366	0.308
	0.492	0.246
	0.366	0.324
	0.42	0.228
	0.312	0.252
	0.548	0.246
	0.345	0.264
0.36	0.227	
Tardía	0.378	0.306
	0.444	0.396
	0.366	0.336
	0.474	0.33
	0.324	0.306
	0.312	0.438
	0.414	0.366
	0.42	0.318
	0.378	0.318
	0.468	0.372
	0.324	0.372
	0.354	0.36
	0.516	0.372
	0.468	0.402
	0.33	0.414
0.492	0.402	
0.414	0.468	

Anexo 10: Test de mínimos cuadrados entre la interacción madre y cría en la concentración de cobre en suero sanguíneo

Interacción 1	Interacción 2	P-Valor
Madre-LTE	Cría-LTE	0
Madre-LTE	Cría-LTA	0.223
Madre-LTA	Cría-LTE	<.0001
Madre-LTA	Cría-LTA	0.071
Cría-LTE	Cría-LTA	0

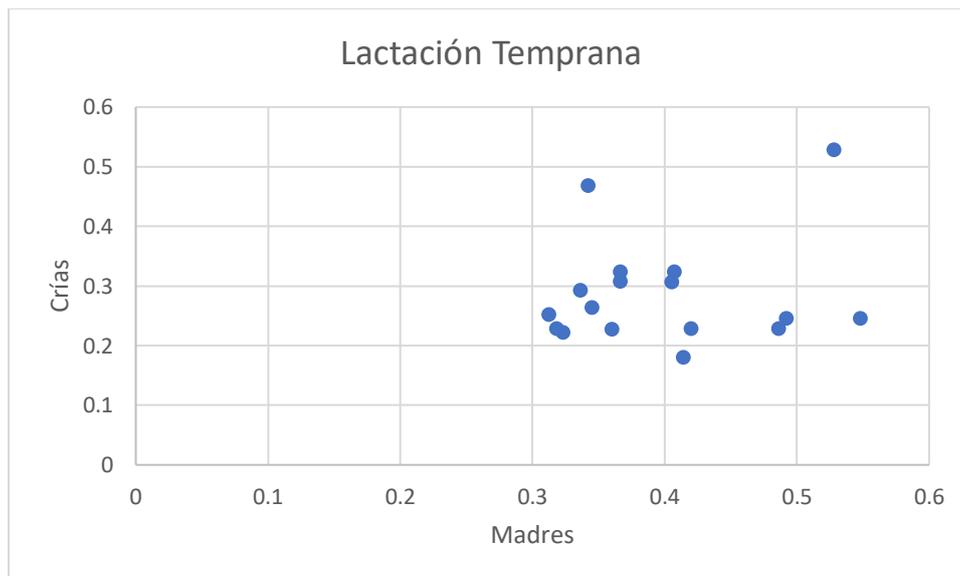
Las muestras provienen de las mismas 17 alpacas en cada etapa fisiológica con sus respectivas crías. LTE = Lactación temprana (10 días después del parto). LTA = Lactación tardía (167 días después del parto en promedio). Alpha = 0.05

Anexo 11: ANOVA entre la relación madre-cría en la concentración de cobre en suero sanguíneo durante la lactación temprana

Análisis de varianza					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	1	0.00335	0.00335	0.4	0.5368
Error	15	0.12589	0.00839		
Total corregido	16	0.12925			

Raiz MSE	0.09161	R-Cuadrado	0.026
Media dependiente	0.28659	R-Sq Ajust	-0.039
Coef var	31.97		

Estimadores de parámetros					
Variable	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr > t
Intercepto	1	0.20954	0.12389	1.69	0.1114
Madre	1	0.19353	0.30614	0.63	0.5368



Anexo 12: ANOVA entre la relación madre-cría en la concentración de cobre en suero sanguíneo durante la lactación temprana

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	1	0.00021703	0.00021703	0.09	0.765
Error	15	0.03514	0.00234		
Total corregido	16	0.03536			

Raiz MSE	0.0484	R-Cuadrado	0.0061
Media dependiente	0.03514	R-Sq Ajust	-0.0061
Coef var	0.03536		

Estimadores de parámetros					
Variable	DF	Estimador del parámetro	Error estándar	Valor t	Pr > t
Intercepto	1	0.34624	0.07628	4.54	0.0004
Madre	1	0.05672	0.18635	0.3	0.765

