

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Cortisol como Indicador Fiable del Estrés en Alpacas y Llamas

CORTISOL AS A RELIABLE INDICATOR OF STRESS IN ALPACAS AND LLAMAS

Nino Arias^{1,2,3}, Billie Velapatiño¹

RESUMEN

Se revisan investigaciones sobre medición de cortisol y sus metabolitos en alpacas y llamas. Las concentraciones de cortisol en muestras de plasma, suero y saliva, así como de metabolitos de cortisol en muestras de heces, se elevan luego de situaciones de estrés. La interpretación de estos resultados debe complementarse con otros signos fisiológicos y observaciones del comportamiento.

Palabras clave: bienestar animal; camélidos; comportamiento; cortisol; estrés

ABSTRACT

Research papers on the measurement of cortisol and its metabolites in alpacas and llamas were reviewed. Plasma, serum, saliva cortisol and fecal cortisol metabolites concentrations increase after stress events. The interpretation of these results should be complemented with additional physiological signs and behavioral observations.

Key words: animal welfare; behaviour; camelids; cortisol; stress

¹ Facultad de Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

² Animal Welfare Program, Faculty of Land and Food Systems, University of British Columbia, Canada

³ E-mail: nino.arias@upch.pe

Recibido: 22 de abril de 2014

Aceptado para publicación: 29 de setiembre de 2014

INTRODUCCIÓN

El criador de alpacas (*Vicugna pacos*) y llamas (*Lama glama*) pone énfasis en la adecuada alimentación y salud de sus animales para lograr el mayor rendimiento productivo. El manejo de los animales en un ambiente de confort, higiene y sin estrés ni dolor permite que puedan manifestar su esperada conducta social y maximizar su rendimiento productivo y reproductivo (von Keyserlingk *et al.*, 2009).

El estrés es la respuesta del organismo frente a los estímulos (estresores) que alteran su homeostasis. Como respuesta a estos estímulos, se dispara una cadena de respuestas fisiológicas dirigidas por el cerebro que comprenden cambios en la conducta, en la respuesta inmune, en la activación del sistema nervioso autónomo (incremento de la frecuencia cardíaca) y en la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA). El eje HPA libera la hormona cortisol en la sangre circulante. Una respuesta rápida de estrés es buena porque permite al animal superar cualquier adversidad de su medio ambiente (por ejemplo, escapar de un predador), pero se afecta la salud y bienestar del animal cuando el estímulo estresor es prolongado (para una revisión detallada, ver Dickens *et al.*, 2010).

Después del evento estresante, el sistema nervioso estimula un grupo de neuronas hipofisiotrópicas ubicadas en el hipotálamo, donde se liberan en la circulación portal las hormonas liberadoras de corticotropina (CRH) y arginina-vasopresina (AVP), que a su vez estimulan la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) en la circulación sanguínea. En respuesta, la corteza adrenal produce glucocorticoides (cortisol, corticosterona) (Herman *et al.*, 2003).

La respuesta al estrés incluye incrementos de la concentración de cortisol en sangre y aumento de la actividad cardiovascular y cognitiva, así como la movilización de gluco-

sa, y mientras tanto se suprime o minimiza la función reproductiva, inmune y digestiva (Dallman, 2003). El cortisol circulante en sangre es metabolizado por el hígado y excretado en la orina y heces. En el caso de los ovinos, las heces contienen diversos grupos de metabolitos del cortisol, pero solo trazas del cortisol en sí (Palme y Möstl, 1997).

Algunas actividades cotidianas de la crianza de alpacas y llamas son estresoras y sus consecuencias están asociadas a abortos y ocurrencia de enfermedades. Knight *et al.* (1995) reporta la pérdida de fetos asociada al estrés de dos horas de transporte y posterior reubicación a un nuevo ambiente de 16 alpacas con cerca de siete meses de gestación. Del mismo modo, la esquila o el transporte se asocia a casos de septicemia de la bacteria comensal *Streptococcus equi* subespecie *zooepidemicus*. Esta bacteria produce una peritonitis y pleuritis fibrinopurulenta, también llamada «fiebre de la alpaca» (Cebra *et al.*, 2000; Hewson y Cebra, 2001). Asimismo, en un grupo de alpacas en los Estados Unidos que estuvo expuesto a diversos estresores (parasitismo, lesiones o enfermedades), se demostró que aquellas que fueron esquiladas hasta 2 cm de la piel soportaban mejor el calor del verano (20 a 30 °C) en comparación con las alpacas que no fueron esquiladas (Navarre *et al.*, 2001).

La presente revisión se enfoca en el uso del cortisol como indicador de estrés en alpacas y llamas.

Cortisol en Sangre

En los estudios iniciales, al inyectarse ACTH a un grupo de alpacas para estimular la producción de glucocorticoides en la corteza adrenal, se identificó a la corticosterona como el principal glucocorticoide, encontrándose una gran variación entre individuos (Guerra-García *et al.*, 1975). Asimismo, Crossley *et al.* (1994) reportaron altos niveles de cortisol plasmático en alpacas del altiplano chileno antes y el día posterior al transporte

hacia una estación cercana al nivel del mar, indicando que los niveles altos de cortisol antes del viaje podrían deberse al ambiente hostil del altiplano desde donde fueron transportadas y que los niveles de cortisol disminuyeron cuando las alpacas se adaptaron a un ambiente con mejor calidad de alimento disponible.

En otro estudio, donde se evaluó el estrés causado por 30 minutos de transporte en alpacas, se encontró que la concentración de cortisol estaba elevada inmediatamente después del transporte, pero a las cuatro horas de reposo disminuyeron hasta niveles similares al momento previo al transporte. Asimismo, el ritmo cardíaco no cambió y el comportamiento no estuvo asociado al incremento de la concentración de cortisol (Anderson *et al.*, 1999b).

En el Perú, las crías de alpaca son separadas de sus madres al inicio de la primavera (setiembre a octubre), cuando tienen entre 7 y 8 meses de edad. En este contexto, Bravo *et al.* (2001) encontraron que las crías de alpaca tienen concentraciones elevadas de cortisol durante los tres días posteriores al destete y disminuyen al quinto día.

Cortisol en Saliva

La punción de la aguja para obtener la muestra de sangre es un estresor en la vaca (Hopster *et al.*, 1999), al igual que en otras especies. No obstante, en la alpaca y la llama se ha podido observar que repetidas punciones a la vena no llegaron a influir en los niveles de cortisol (Anderson *et al.*, 1999a). De todas formas, el estrés de la punción puede ser evitado mediante la recolección de muestras de saliva, especialmente si el animal ha sido entrenado para aceptar abrir la boca y tolerar por unos segundos el material absorbente que recogerá la saliva. Esta metodología permitió la evaluación del estrés de transporte en caballos (Schmidt *et al.*, 2010).

El cortisol circulante en la sangre se une a las globulinas fijadoras de corticoesteroides (transcortina, albúmina). Los cambios de concentración de estas proteínas influyen en la concentración de cortisol en la sangre (El-Bahr *et al.*, 2006). El cortisol pasa a la saliva en la glándula parótida por difusión simple (Umeda *et al.*, 1981) y, de este modo, se puede medir el cortisol libre (no unido a proteínas) en muestras de saliva. La muestra se obtiene fácilmente introduciendo un algodón en la boca de alpacas y llamas por un lapso de 3 a 5 minutos, tiempo suficiente para que ocurra la saturación del algodón con saliva (Anderson *et al.*, 1999a).

La concentración de cortisol se eleva significativamente en el suero a consecuencia de 30 minutos de transporte (Anderson *et al.*, 1999b). Sin embargo, en el caso de las muestras de saliva y bajo condiciones experimentales similares, la concentración de cortisol en saliva se elevó solamente en la muestra tomada cuatro horas posteriores al transporte (Anderson *et al.*, 1999a).

Metabolitos de Cortisol en Heces

Palme y Möstl (1997) desarrollaron el inmunoanálisis enzimático (EIA) 11-oxoetiocolanolona con anticuerpos que reaccionan contra los metabolitos de cortisol que tienen la estructura 11,17-dioxoandrostando. Este EIA se validó en camélidos sudamericanos, a la vez que se evaluó el estrés debido al transporte en llamas y al «chaccu» en vicuñas (Arias *et al.*, 2013). Esta metodología es adecuada para la evaluación del estrés en varias especies rumiantes (Palme, 2012).

En la Figura 1 se muestra el pico en la concentración de cortisol en plasma luego de la estimulación con ACTH. A continuación se observa su reflejo con otro pico en la concentración de metabolitos de cortisol en heces. El tiempo que separa ambos picos está determinado por el tiempo de pasaje intesti-

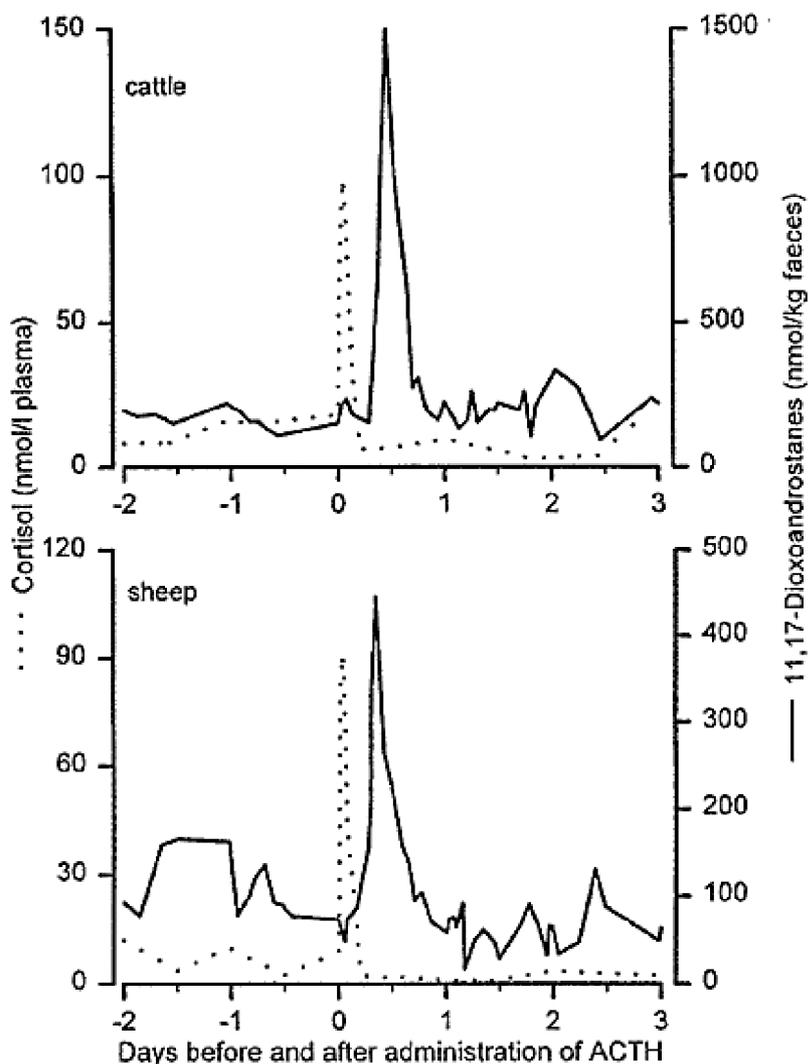


Figura 1. Cinética de las concentraciones de cortisol en sangre (nmol/l) y metabolitos de cortisol (11,17-dioxoandrostano) en heces (nmol/kg) dos días antes y tres días después de la administración de ACTH en una vaca (panel superior) y una oveja (panel inferior). Tomado de: *Palme et al. (1999). Vet Med Austria 86: 237-241. Con permiso de ÖGT.*

nal del duodeno al recto (Palme *et al.*, 1996), donde el tiempo medio de pasaje intestinal del duodeno al recto en alpacas y llamas es de 28 y 33 horas, respectivamente (Arias *et al.*, 2013).

En el caso de muestras fecales, es importante tomar en cuenta que las muestras deben ser recolectadas tan pronto como ocu-

rra la defecación y homogeneizarse en la misma bolsa que fueron recogidas para prevenir variación de concentraciones de metabolitos dentro de la muestra. Asimismo, las muestras deben ser congeladas de inmediato a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para prevenir la degradación de los esteroides por la actividad enzimática de las bacterias presentes en las heces (Bokkenheuser *et al.*, 1978; Möstl *et al.*, 1999; Arias *et al.*, 2013).

Otros factores que podrían influir en la medición de metabolitos fecales de cortisol son el estado reproductivo y sexo del animal, así como la estación del año (Palme, 2012). Además, es posible que la hipoxia afecte la producción de cortisol, lo cual podría ser medido mediante estimulación de la corteza adrenal de un mismo grupo de animales en la altitud y al nivel del mar (Panesar, 2004).

Inmunoanálisis de Cortisol

Al momento, no ha sido validado un kit comercial para medir concentraciones de cortisol en muestras de suero o plasma provenientes de alpacas y llamas. En este sentido, la validación técnica de un kit de diagnóstico usado para otras especies incluye determinar su sensibilidad y su especificidad. Se deberán usar como referencia una muestra control positiva (estándar analítico de cortisol, CAS 50-23-7) y otra muestra control negativa (sin cortisol). Asimismo, se deberá ensayar un control externo, agregando estándar analítico de cortisol en diluciones seriadas a muestras de suero, plasma o saliva de camélido saludable y sin estrés, y procesarlas de acuerdo con las instrucciones del kit. Este procedimiento permitirá detectar inhibidores en la muestra, así como la capacidad de detección de cortisol de la prueba (sensibilidad técnica). También es importante evaluar posibles reacciones cruzadas a fin de investigar la capacidad de la prueba para distinguir entre estructuras parecidas al cortisol (hormonas esteroideas como estradiol, testosterona, etc.) (Ver metodología de laboratorio en Scheel *et al.*, 2006).

Además de la validación analítica del kit, es necesario realizar la validación fisiológica, lo que se hace mediante la inyección de ACTH. Se espera medir un súbito incremento y luego la disminución de cortisol a los valores iniciales. Esto debe realizarse para cada especie a ser investigada. Las comparaciones de valores esperados bajo diferentes situaciones de estrés, edades, sexo o especie solamente son posibles si se utiliza la misma metodolo-

gía de laboratorio o el mismo kit comercial de inmunoanálisis. En consecuencia, no es posible obtener valores referenciales y el punto de corte para discriminar situaciones de estrés y sin estrés; sin embargo, las situaciones estresantes pueden compararse, siempre y cuando se midan por el mismo método (Palme, 2012).

Morrow *et al.* (2002) validaron un kit comercial de radioinmunoanálisis (RIA Corticosterona ¹²⁵I, MP Biomedicals, EEUU) para bovinos. Este kit está diseñado por el fabricante para su uso en ratas y ratones. La reacción cruzada de anticuerpos favorece en este caso la medición de algunos metabolitos (Palme, 2012).

Monitoreo del Comportamiento

El animal enfermo deja de comer, se aparta del grupo y pasa más tiempo en reposo. Este sufrimiento indeseado está asociado a las citoquinas que se producen durante la respuesta a la enfermedad y contribuyen a la supervivencia del animal (Gregory, 1998). Por ejemplo, las vacas con metritis severa comen con menos frecuencia que sus compañeras saludables; pero además se determinó que estas vacas reducían el tiempo empleado en su alimentación una semana antes del parto en comparación con las vacas saludables (Huzzey *et al.*, 2007). Un cambio en la conducta de alimentación es un potencial indicador para la detección temprana de esta enfermedad.

Respecto a la observación de la conducta de pastoreo, se observó menor consumo de alimento en alpacas confinadas en soledad (Pollard y Littlejohn, 1995). Del mismo modo, se observó que las alpacas pasan más tiempo pastoreando en la pradera alto andina en comparación con las zonas bajas (Raggi *et al.*, 1994).

En la Figura 2 se muestra un caso donde a mayor tiempo de duración del estrés debido al confinamiento de guanacos, mayor

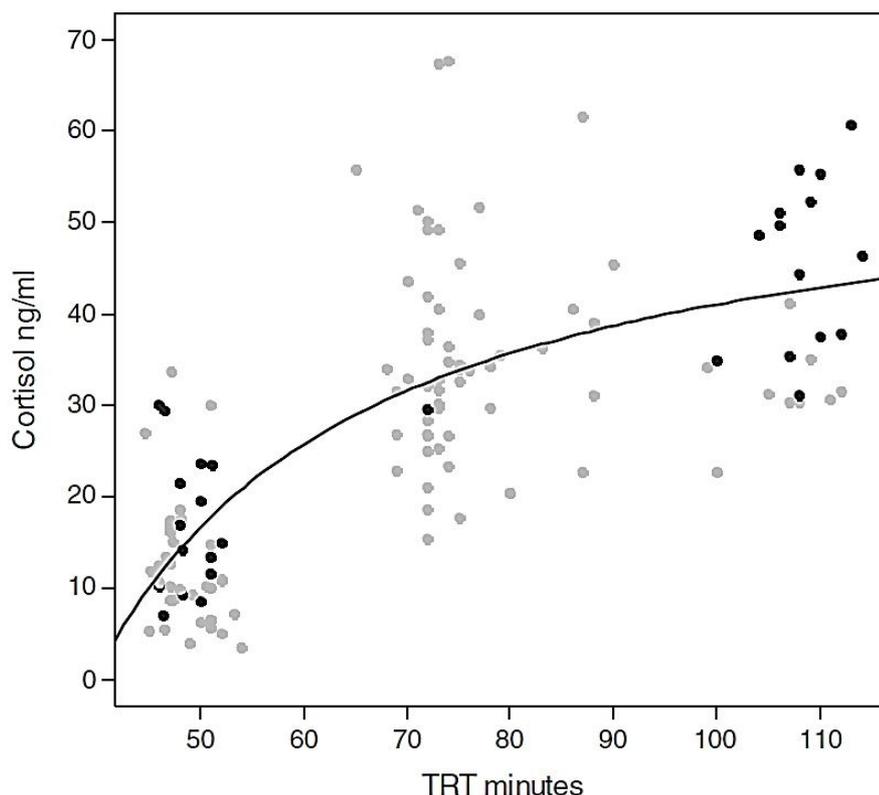


Figura 2. Correlación entre el tiempo total de retención de guanacos (TRT, en minutos) y la concentración de cortisol en la sangre de los mismos guanacos (ng/ml). Círculos negros: representan guanacos hembras; círculos grises: representan guanacos machos. Tomado de Carmanchahi *et al.* (2011). *Wildlife Research* 38: 61-68. Con permiso de CSIRO Publishing. Ver <http://www.publish.csiro.au/nid/144/paper/WR10170.htm>

será la concentración de cortisol en su sangre. Carmanchahi *et al.* (2008) observaron una correlación positiva entre el tiempo de manipulación de guanacos y la concentración de cortisol en sangre. El tiempo de retención de cada animal incluyó su captura, su esquila, la extracción de sangre y su liberación.

CONCLUSIONES

Se concluye que la medición de cortisol en sangre y metabolitos de cortisol (11,17-dioxoandrostano) en heces son indicadores fiables para detectar si la alpaca o llama ha estado expuesta a un evento estresante.

Agradecimiento

El estudio fue financiado por la Beca de Investigación Post Doctoral del Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica del Perú.

LITERATURA CITADA

1. Anderson DE, Silveira F, Grubb T. 1999a. Effects of venipuncture and correlation of plasma, serum and saliva cortisol concentration with transportation stress in camelids. *J Camel Pract Res* 6: 249-254.

2. **Anderson DE, Grubb T, Silveira F. 1999b.** The effect of short duration transportation on serum cortisol in alpacas (*Lama pacos*). *Vet J* 157: 189-191.
3. **Arias N, Requena M, Palme R. 2013.** Measuring faecal glucocorticoid metabolites as a non-invasive tool for monitoring adrenocortical activity in South American camelids. *Anim Welfare* 22: 25-31. doi: 10.7120/09627286.22.1.025
4. **Bravo PW, Garnica J, Aviles E. 2001.** Cortisol concentrations in the perinatal and weaning periods of alpacas. *Anim Reprod Sci* 67: 125-129. doi: 10.1016/S0378-4320(01)00112-9
5. **Bokkenheuser VD, Winter J, Kelly WG. 1978.** Metabolism of biliary steroids by human fecal flora. *Am J Clin Nutr* 31: S221-S226.
6. **Carmanchahi PD, Ovejero R, Marull C, López GC, Schroeder N, Jahn GA, et al. 2011.** Physiological response of wild guanacos to capture for live shearing. *Wildlife Res* 38: 61-68. doi: 10.1071/WR10170
7. **Cebra CK, Heidel JR, Cebra ML, Tornquist SJ, Smith BB. 2000.** Pathogenesis of *Streptococcus zooepidemicus* infection after intratracheal inoculation in llamas. *Am J Vet Res* 61: 1525-1529. doi: 10.2460/ajvr.2000.61.1525
8. **Crossley JC, Marín MP, Ferrando G, Raggi LA. 1994.** Modificaciones adaptativas de algunas constantes fisiológicas de alpaca (*Lama pacos*) sometidas a cambios de ambiente. *Arch Zootec* 43: 215-223.
9. **Dallman MF. 2003.** Stress by any other name...?. *Horm Behav* 43: 18-20. doi: 10.1016/S0018-506X(02)00034-X
10. **Dickens MJ, Delehanty DJ, Romero LM. 2010.** Stress: an inevitable component of animal translocation. *Biol Conserv* 143: 1329-1341. doi: 10.1016/j.biocon.2010.02.032
11. **El-Bahr SM, Kahlbacher H, Patzl M, Palme RG. 2006.** Binding and clearance of radioactive adrenaline and noradrenaline in sheep blood. *Vet Res Commun* 30: 423-432. doi: 10.1007/s11259-006-3244-1
12. **Gregory NG. 1998.** Physiological mechanisms causing sickness behaviour and suffering in diseased animals. *Anim Welfare* 7: 293-305.
13. **Guerra-García R, Coyotupa J, Losno W, Sumar J. 1975.** Estudios de la función adrenal en la alpaca. En: VI Congreso Peruano de Endocrinología. Cajamarca: Sociedad Peruana de Endocrinología.
14. **Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. 2003.** Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 24: 151-180. doi: 10.1016/j.yfrne.2003.07.001
15. **Hewson J, Cebra CK. 2001.** Peritonitis in a llama caused by *Streptococcus equi* subspecies zooepidemicus. *Can Vet J* 42: 465-467.
16. **Hopster H, van der Werf JTN, Erkens JH, Blokhuis HJ. 1999.** Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. *J Anim Sci* 77: 708-714.
17. **Huzzey JM, Veira DM, Weary DM, von Keyserlingk MA. 2007.** Parturition behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. *J Dairy Sci* 90: 3220-3233. doi: 10.3168/jds.2006-807
18. **Knight TW, Ridland M, Scott I, Death AF, Wyeth TK. 1995.** Foetal mortality at different stages of gestation in alpacas (*Lama pacos*) and the associated changes in progesterone concentrations. *Anim Reprod Sci* 40: 89-97. doi: 10.1016/0378-4320(95)01415-V
19. **Morrow CJ, Kolver ES, Verkerk GA, Matthews LR. 2002.** Faecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenal activity in dairy cattle. *Gen Comp Endocrinol* 126: 229-241. doi: 10.1006/gcen.2002.7797
20. **Möstl E, Messmann S, Bagu E, Robia C, Palme R. 1999.** Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations

- in faeces of domestic livestock. *J Vet Med A* 46: 621-631. doi: 10.1046/j.1439-0442.1999.00256.x
21. **Navarre CB, Heath AM, Wenzel J, Simpkins A, Blair E, Belknap E, Pugh DG. 2001.** A comparison of physical examination and clinicopathologic parameters between sheared and nonshaired alpacas (*Lama pacos*). *Small Ruminant Res* 39: 11-17. doi: 10.1016/S0921-4488(00)00176-0
 22. **Palme R, Fischer P, Schildorfer H, Ismail MN. 1996.** Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Anim Reprod Sci* 43: 43-63. doi: 10.1016/0378-4320(95)01458-6
 23. **Palme R, Möstl E. 1997.** Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *Z Säugetierkd* 62(Suppl 2): 192-197.
 24. **Palme R, Robia C, Messmann S, Hofer J, Möstl E. 1999.** Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: a non-invasive parameter of adrenocortical function. *Wien Tierarztl Monatsschr* 86: 237-241.
 25. **Palme R. 2012.** Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Anim Welfare* 21: 331-337. doi: 10.7120/09627286.21.3.331
 26. **Panesar N. 2004.** High altitude sickness. Is acute cortisol deficiency involved in its pathophysiology? *Med Hypotheses* 63: 507-510. doi: 10.1016/j.mehy.2003.11.039
 27. **Pollard JC, Littlejohn RP. 1995.** Effects of social isolation and restraint on heart rate and behaviour of alpacas. *Appl Anim Behav Sci* 45: 165-174. doi: 10.1016/0168-1591(95)00588-J
 28. **Raggi LA, Jiliberto E, Urquieta B. 1994.** Feeding and foraging behaviour of alpaca in northern Chile. *J Arid Environ* 26: 73-77. doi: 10.1006/jare.1994.1011
 29. **Scheel CM, Handali S, Bueno EC, Khan A, Hancock K, Gonzalez AE, Garcia HH, et al. 2006.** Development of a normal human immunoglobulin G standard curve for enzyme-linked immunosorbent assay: use for comparison of antigen efficacy. *J Immunoassay Immunochem* 27: 173-81. doi: 10.1080/15321810600573028
 30. **Schmidt A, Möstl E, Wehnert C, Aurich J, Müller J, Aurich C. 2010.** Cortisol release and heart rate variability in horses during road transport. *Horm Behav* 57: 209-215. doi: 10.1016/j.yhbeh.2009.11.003
 31. **von Keyserlingk MAG, Rushen J, de Passillé AM, Weary DM. 2009.** The welfare of dairy cattle – Key concepts and the role of science. *J Dairy Sci* 92: 4101-4111. doi: 10.3168/jds.2009-2326
 32. **Umeda T, Hiramatsu R, Iwaoka T, Shimada T, Miura F, Sato T. 1981.** Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum. *Clin Chim Acta* 110: 245-253. doi: 10.1016/0009-8981(81)90353-3