

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESINA
SEDE CUENCA

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

*Trabajo de titulación previo
a la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**“VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTISOL EN POLLOS
PARRILLEROS APARENTEMENTE SANOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE
ELISA CUANTITATIVA”**

AUTOR:

ORLANDO DAYAN ROMERO ROMERO

TUTOR:

DR. JUAN LEONARDO MASACHE MASACHE

CUENCA - ECUADOR

2021

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Orlando Dayan Romero Romero con documento de identificación N° 0705842045, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana, la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación: **“VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTISOL EN POLLOS PARRILLEROS APARENTEMENTE SANOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA CUANTITATIVA”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Médico Veterinario Zootecnista*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribió este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, noviembre de 2021.



Orlando Dayan Romero Romero

C.I. 0705842045

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTISOL EN POLLOS PARRILLEROS APARENTEMENTE SANOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA CUANTITATIVA”**, realizado por Orlando Dayan Romero Romero, obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, noviembre de 2021.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'J. L. Masache Masache', with a large circular flourish at the end.

Dr. Juan Leonardo Masache Masache

C.I. 1103109003

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Orlando Dayan Romero Romero con documento de identificación N° 0705842045, autor del trabajo de titulación: **“VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTISOL EN POLLOS PARRILLEROS APARENTEMENTE SANOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA CUANTITATIVA”**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental*, es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, noviembre de 2021.

A handwritten signature in blue ink that reads "Dayan Romero". The signature is written in a cursive style with a horizontal line under the name.

Orlando Dayan Romero Romero

C.I. 0705842045

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres Orlando Romero, Gloria Romero y a mis hermanos Rickie, Nadia, Ronny Romero, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor incondicional.

También lo dedico a mi esposa Belén Gallardo y a mi querida hija Sofía Romero quienes fueron un pilar muy importante de fortaleza, esperanza y amor para culminar mis estudios.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi Dios, quien con su bendición llena y fortalece mi vida y a toda mi familia por estar siempre presentes.

Mi profundo agradecimiento a todas las autoridades y personal que hacen la Carrera de Medicina Veterinaria Zootecnia, por confiar en mí y enriquecerme en conocimiento.

De manera especial a mi tutor de tesis Mag. Juan Masache, por haberme guiado, no solo en la elaboración de este trabajo de titulación, sino a lo largo de mi carrera universitaria y haberme brindado el apoyo para desarrollarme profesionalmente y seguir cultivando mis valores.

ÍNDICE

RESUMEN	13
ABSTRACT.....	14
1. INTRODUCCION	15
1.1. PROBLEMA.....	16
1.2. DELIMITACIÓN	16
1.2.1. Temporal.....	16
1.2.2. Espacial.....	16
1.2.3. Académica.....	16
1.3. EXPLICACIÓN DEL PROBLEMA	16
1.3.1. Objetivo general.....	17
1.3.2. Objetivo específico	17
1.4. HIPÓTESIS.....	17
1.4.1. Hipótesis nula.....	17
1.5. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	17
2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRAFICO Y DOCUMENTAL.....	18
2.1. POLLOS (<i>Gallus gallus domesticus</i>).....	18
2.1.1. Origen e Historia.....	18
2.1.2. Clasificación taxonómica.....	18
2.1.3. La avicultura	19
2.1.4. Producción de pollos parrilleros	19
2.2. EL BIENESTAR ANIMAL.....	19
2.3. FATORES DE ESTRÉS	20
2.4. CORTICOIDES SUPRARENALES	21

2.4.1.	Conceptos generales.....	21
2.4.2.	Capas de la corteza renal:	21
2.4.2.1.	Glucocorticoides: cortisol	22
2.4.2.2.	El cortisol	22
2.4.2.3.	Estructura del cortisol	23
2.4.2.4.	Valores de cortisol en pollos.....	24
2.4.2.5.	Importancia del corticoides.....	24
2.4.2.6.	Usos clínicos importantes del corticoides.....	24
2.4.2.7.	Causas de aumento o disminución de cortisol	25
2.4.2.7.1.	Síndrome de Cushing (hiperadrenocortisismo)	25
2.4.2.7.2.	Síndrome de Addison (hipoadrenocortisismo)	26
2.4.2.8.	Técnicas para determinar el cortisol	26
2.4.2.8.1.	Determinación de cortisol con la técnica de ELISA	26
2.4.2.8.2.	Determinación de cortisol por radioinmunoensayo (RIA).....	27
3.	MATERIALES Y METODOS	28
3.1.	MATERIALES	28
3.1.1.	Físicos	28
3.1.2.	Biológicos	29
3.1.3.	Químicos	29
3.2.	MÉTODOS	30
3.2.1.	Diseño estadístico	30
3.2.2.	Selección y tamaño de la muestra	30
3.2.3.	Obtención de muestras sanguíneas	30
3.2.4.	Procedimiento para realizar la técnica de ELISA indirecto.....	31
3.3.	CONSIDERACIONES ÉTICAS	32

4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	34
4.1.	Valores referenciales de la bibliografía.	34
4.2.	Unidades utilizadas para el cálculo de resultados.....	34
4.3.	Discusión.....	34
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
5.1.	CONCLUSIONES	40
5.2.	RECOMENDACIONES.....	40
6.	BIBLIOGRAFIA	41
7.	ANEXOS	46

Índice de tablas

Tabla 1. Materiales Físicos	28
Tabla 2. Materiales Biológicos	29
Tabla 3. Materiales Químicos	29
Tabla 4. Variables dependientes: suero	32
Tabla 5. Variables independientes: Animales.....	32
Tabla 7 Valores atipicos obtenidos de la concentración de cortisol.	38
Tabla 8 Concentración de cortisol de 100 aves machos	46
Tabla 9 Concentración de cortisol de 100 aves hembras	47

Índice de figuras

<i>Figura I:</i> cortisol plasmático total y libre.	23
<i>Figura II:</i> Estructura bioquímica del cortisol	23
<i>Figura III.</i> Ilustración de la curva estándar (ejemplo).	34
<i>Figura IV.</i> Curva estándar de los datos de absorbancia y valores de cortisol en $\mu\text{g/dl}$	35
<i>Figura V.</i> Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 100 aves machos.	36
<i>Figura VI.</i> Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 99 aves hembras.	37
<i>Figura VIII.</i> Dispersión de líneas rectas y marcadores.	46
<i>Figura IX.</i> Animales de estudio.....	47
<i>Figura X.</i> Toma de muestras	48
<i>Figura XI.</i> Muestras sanguíneas	48
<i>Figura XII.</i> Sueros sanguíneos.....	49
<i>Figura XIII.</i> Kit de ELISA de cortisol	49
<i>Figura XIV.</i> Equipo de ELISA	50

RESUMEN

El presente trabajo de investigación de la Valoración de los niveles de cortisol en pollos parrilleros, se realizó la toma de muestras en la granja de la Universidad Politécnica Salesiana. Para posteriormente ser procesadas en el laboratorio de la Universidad y ser conservadas en congelación a una temperatura de -4°C . Después de la recolecta de todas las muestras de 200 animales a ser estudiadas, que se encuentran distribuidas entre hembras y machos, se procedió a realizar la técnica de ELISA indirecta para cortisol en el laboratorio de institución; la técnica de ELISA en cortisol es un inmunoensayo competitivo para el diagnóstico cuantitativo in vitro con medición de cortisol en suero; para la interpretación de los datos obtenidos en el equipo de ELISA se consideró la ayuda del Tutorial de ELISA competitivo 3: Análisis de datos típicos de ELISA competitivo en Excel. Los resultados obtenidos fueron de 99 hembras los niveles de cortisol se encuentra con una media de $1,007\text{ug/dl}$. Y en los valores obtenidos en los 94 machos los niveles de cortisol se encuentran en una media de $0,674\text{ug/dl}$, y con 6 animales con valores atípicos que son $1,756$; $2,476$; $2,097$; $1,623$; $1,688$ y $4,066$ y en la hembra con un valor atípico de $22,043\text{ug/dl}$ como posibles resultados de estrés presentes en los animales.

ABSTRAC

The present work of investigation of the Valuation of the levels of cortisol in broiler chickens, was carried out the taking of samples in the farm of the Salesian Polytechnic University. To later be processed in the University laboratory and kept frozen at a temperature of -4°C . After collecting all the samples from 200 animals to be studied, which are distributed between females and males, the indirect ELISA technique for cortisol was carried out in the institution laboratory; the Cortisol ELISA is a competitive immunoassay for the quantitative in vitro diagnostic measurement of cortisol in serum ; for the interpretation of the data obtained in the ELISA equipment, the help of the Competitive ELISA Tutorial 3: analysis of typical competitive ELISA data in Excel was considered. The results obtained were 99 female cortisol levels found with a mean of $1.007\text{ug} / \text{dl}$. And in the values obtained in the 94 males, the cortisol levels are in an average of $0.674\text{ug} / \text{dl}$, and with 6 animals with atypical values that are 1,756; 2,476; 2,097; 1,623; 1,688 and 4,066 and in the female with an outlier of $22,043\text{ug} / \text{dl}$ as possible results of stress present in the animals.

1. INTRODUCCION

La importancia del cortisol en el organismo, es porque este ayuda a controlar el estrés, reduce la inflamación, contribuye con el funcionamiento del sistema inmune, a metabolizar proteínas, grasas y carbohidratos, como a mantener los niveles de azúcar en la sangre. Los niveles de cortisol están relacionados con la actividad diaria y los niveles de serotonina; por lo tanto, los niveles de cortisol son mayores en la mañana y estos van disminuyendo a lo largo del día.

En la industria avícola ecuatoriana, principalmente, se fundamenta en dos actividades: la producción de carne de pollo y la del huevo comercial; entre estas dos actividades pecuarias, sobresale muy por encima la crianza de pollos de carne; CONAVE², estima que en el año 2005 se produjeron 155 millones de pollos y 2.500 millones de huevos, los cuales apenas representaron el 12% de la producción pecuaria total del país, por otra parte el consumo per cápita de estos productos avícolas ha experimentado una tasa de crecimiento muy marcada en la última década (Rodríguez, 2009).

Actualmente en nuestro país la avicultura es una fuente de trabajo e ingresos económicos para sus habitantes en especialmente en las regiones Costa y Sierra. Esta actividad productiva se ha visto afectada últimamente por el incremento en los costos de producción, elevado precio de los insumos agropecuarios y además por problemas en el precio final de venta de la carne de pollo; que muchas veces genera pérdidas a los pequeños productores (ZAMBRANO, 2017)-

“El total de aves de corral existentes en el país, el 21.83% son criadas en campo y el 78.17% en planteles avícolas. Aproximadamente existen 32.067.865 (pollitos, pollitas, pollos, pollas) a nivel del país. En la región Sierra se encuentra la mayor producción de pollitos (as), pollos (as) con el 62.33%” (ESPAC, 2013).

1.1.PROBLEMA

En la zona existe una escasa disponibilidad de valores referenciales para la especie, lo que ha lleva a que los médicos veterinarios utilicen valores referenciales de otros países, los mismos que pueden variar debido a varias condiciones como la altitud, clima, edad, entre otros factores, siendo esto un problema ya que en estas condiciones puede hacer que varíe los resultados obtenidos a nivel de laboratorio.

1.2.DELIMITACIÓN

1.2.1. Temporal

El proceso investigativo abarco una duración de 400 horas, distribuidas en el trabajo experimental y la redacción final del documento final.

1.2.2. Espacial

El trabajo de investigación para determinar los niveles de cortisol, se realizó en el cantón Paute

1.2.3. Académica

1.3.EXPLICACIÓN DEL PROBLEMA

En el presente trabajo está enfocado en generar valores referenciales de los niveles de cortisol presentes en el pollos parrilleros aparentemente sanos mediante la técnica de ELISA, donde un médico veterinario toma como valore referenciales de otros países; siendo esto un problema ya que manejan distintos rangos de referencia, teniendo como variación las condiciones de altitud y otros valores, por lo que se ha considerado la importancia de realizar este trabajo de investigación, así mismo contribuye al veterinarios para que puede mejorar su comprensión de resultados obtenidos de valores hematológicos de granjas de pollos parrilleros, para de esta manera llegar a una diagnóstico y posibles alteraciones.

OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

Valoración de los niveles de cortisol en pollos parrilleros aparentemente sanos mediante la técnica de ELISA.

1.3.2. Objetivo específico

Determinar la concentración de cortisol sanguíneo por el método de ELISA.

Evaluar la relación de los niveles de cortisol y estrés en los pollos parrilleros.

Obtener promedios de valores referenciales de cortisol sanguíneo en pollos.

1.4.HIPÓTESIS

1.4.1. Hipótesis nula

H0: No existen diferencias significativas entre las medidas de valor de cortisol obtenidos en el laboratorio.

1.4.2. Hipótesis alternativa

H1: Existen diferencias significativas entre las medidas de valor de cortisol obtenidos en el laboratorio.

1.5. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

En este trabajo de investigación está enfocado en generar valores de referencia de los niveles de cortisol en pollos parrilleros aparentemente sanos mediante la técnica de ELISA, debía a que, al contar con estos valores de referencia, permitirá identificar casos de enfermedades presentes en los animales, sin embargo, no debemos descartar que la especie estudiada es de carácter nerviosa, por lo que los niveles se podrán encontrarán ligeramente elevados en el presente trabajo.

2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL

2.1. POLLOS (*Gallus gallus domesticus*)

2.1.1. Origen e Historia

El origen de la relación de esta especie con el ser humano se remonta al Neolítico, concretamente en el marco del cambio de sociedades cazadoras-recolectoras a agricultoras-ganaderas. Algunos estudios revelan que las primeras gallinas y pollos domesticados pueden provenir de la India, hace más de 4.000 años. Sin embargo, diferenciación y selección de razas comenzó durante la Edad Media, tomando suma importancia en la alimentación la carne y los huevos que proporcionaban estas aves.

Desde el inicio de la domesticación de las aves, el hombre vino seleccionando y dejando para la reproducción a aquellas ejemplares que destacaban las características más deseables. Estas características de selección dependían del objetivo del productor. (Zambrano, 2017)

2.1.2. Clasificación taxonómica

El pollo de engorde es un ave de producción pecuaria, el cual presenta la siguiente taxonomía.

Reino	Animal
Phylum	Cordados
Subphylum	Vertebrados
Clase	Aves
Orden	Galliformes
Familia	Phasianidae
Género	Gallus
Especie (nombre científico)	Gallus gallus domesticus
Línea genética	Boiler, INCA, entre otras.

(Chicaiza, 2009)

2.1.3. La avicultura

La avicultura a nivel mundial y nacional es una de las actividades agropecuarias más dinámicas y de mayor desarrollo de investigación, en el campo nutricional en el desarrollo genético y producción; la carne de pollo es considerada un alimento de alto en proteína y de bajo costo, y de fácil acceso para cualquier persona, considerándola como fuente permanente de alimento para la población (Guerra, Espinosa, Arteaga y Andrade, 2018)

2.1.4. Producción de pollos parrilleros

En la producción de esta especie se ha logrado grandes mejoras tanto en el crecimiento como en la conversión alimenticia mediante el ajuste de las técnicas de producción, en lo que ha tenido un gran importancia en el mejoramiento genético; pero sin embargo con un efecto negativo de este mejoramiento es que los animales han perdido su rusticidad y la capacidad de adaptación en el medio ambiente, lo que ha provocado pérdidas económicas por la presencia de agentes patógenos (Sandoval, Revidatti, Terraes, Fernández, Esquivel de Luchi, 1999-2000).

El pollo de engorde actual es un animal mejorado genéticamente para producir carne en poco tiempo; si se mantiene en condiciones óptimas se puede alcanzar de 2 a 2.5 kg en 42 días de edad, para lograr estos objetivos es necesario proveer un alojamiento adecuado, buena alimentación, agua y buena sanidad (Barros, 2018).

2.2. El bienestar animal

El bienestar animal es la forma en la que el animal confronta las condiciones en el entorno, en la que el animal se encuentra en buenas condiciones de bienestar si este está sano, cómodo, bien alimentado, seguro, que este puede expresar su comportamiento innato y que este esté libre de dolor, miedo o desasosiego (Mantexa, Mainau, y Temple, 2012).

Lo fundamental para el bienestar animal es:

Acatar con las 5 libertades: 1) libre de hambre, de sed y mal nutrición, 2) libres de miedo y de estrés, 3) libres de incomodidad, 4) libres de dolor, lesiones o enfermedades, y 5) libres de expresar su comportamiento innato.

Allí una relación estrecha entre la salud y el bienestar animal, siendo importante en una adopción de planes sanitarios preventivos, con la oportunidad de atención médica (Veterinario) cuando se requiera.

El uso de los animales de trabajo, producción, deportes, investigación y educación, que estos contribuyan en el bienestar del hombre, por lo que la crianza y manejo se debe dar con responsabilidad ética.

Procurar el mínimo sufrimiento y agonía de un animal convaleciente, practicando la eutanasia de manera inmediata cuando sea necesario (Ponce de Valle, Vicari, Faravelli, Glauber y Vinter, 2015).

Al garantizar el bienestar animal y prevenir el estrés en aves en procedimiento antemorten de los animales, pues hasta el momento han prestado poca atención al estrés potenciado ligado con el encadenamiento (Bedanova et al., 2007)

2.3. Factores de estrés

“El término “estrés” se ha utilizado ampliamente en biología para describir un conjunto de cambios fisiológicos y de conducta desencadenados por un estímulo aversivo” (Temple, Mainau, y Manteca, 2013). Además, el mismo autor da a conocer, que Selye investigó sobre la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) frente a impulsos dañinos, dando a entender que el organismo reacciona de manera inespecífica frente a varios impulsos realizados, donde principalmente había un incremento de la actividad del eje HHA.

Los animales pueden padecer estrés psicológico debido a: restricción en movimientos, manejo y novedades; o tener estrés físico debido a: hambre, sed, fatiga, lesiones y extremos

térmicos. En la restricción de movimientos no causan dolor, pero lo que si causan es estrés psicológico porque los animales son criados bajo métodos extensivos; una respuesta de miedo en los animales depende de la experiencia del manejo o de transporte (Grandi, 1997).

Según Álvarez (2007) cuando un animal está sometido al estrés, este provoca el incremento de ciertas sustancias tales como: el cortisol, aldosterona y colesterol. “En el medio interno se producirá una hiperglucemia, que, junto a las alteraciones, hematológicas son los cambios más típicos del estrés: leucocitos, neutrofilia, linfopenia y eosinopenia (leucograma del estrés). Por tanto, los estresores pueden afectar la salud del individuo aumentando la susceptibilidad a las infecciones.”

Al garantizar el bienestar animal y prevenir el estrés en aves en procedimiento antemorten de los animales, pues hasta el momento han prestado poca atención al estrés potenciado ligado con el encadenamiento (Bedanova et al., 2007)

2.4.CORTICOIDES SUPRARENALES

2.4.1. Conceptos generales

Las glándulas suprarrenales están ubicadas en la parte craneal de los riñones, donde cada una de ellas están divididas por dos partes: la médula suprarrenal y corteza renal. El origen de las partes de las glándulas suprarrenales es de diferentes orígenes embrionarios; la corteza se desarrolla a partir del mesodermo y secreta hormonas esteroides (semejantes al colesterol), y la médula el origen es a partir del ectodermo donde secreta adrenalina y noradrenalina, conocidas también como catecolaminas (Sumano H. Y Ocampo L., 1997).

2.4.2. Capas de la corteza renal:

Zona glomerular: esta secreta mineralocorticoides, tales como la aldosterona y vasopresina, con la función de controlar el volumen plasmático del organismo y el control de retención de Na y agua regulando la presión sanguínea (Koolman, 2012).

Zona fascicular: formada por células voluminosas, llamadas espongocitos, en esta capa produce glucocorticoides, de lo cual el cortisol constituye el 95% (Koolman, 2012). La principal función de esta capa es la producción de glucocorticoides, como: el cortisol y la cortisona (Hullinger y Andrisani 2006)

Zona reticular: fuente secundaria de esteroides sexuales como estrógenos y andrógenos (Koolman, 2012).

2.4.2.1. Glucocorticoides: cortisol

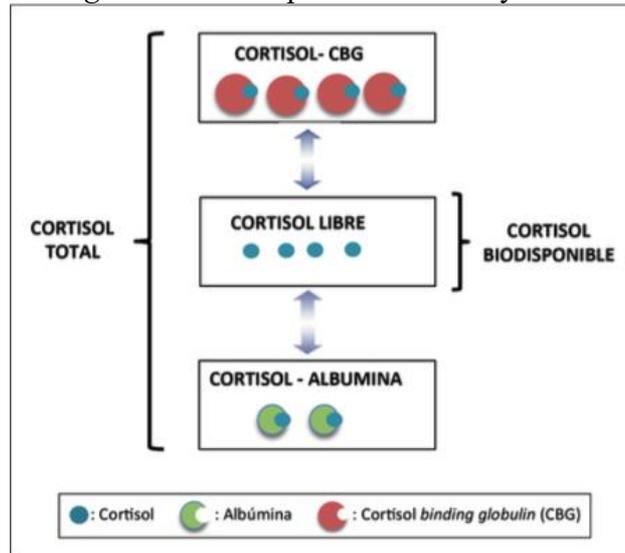
Los glucocorticoides son sustancias químicas liberadas por la corteza de las glándulas suprarrenales, específicamente de la zona fascicular; el organismo es capaz de secretar 3 tipos de glucocorticoides: el cortisol, la cortisona y corticosterona (Marenzi A.D., 2011).

2.4.2.2. El cortisol

El cortisol es una molécula lipídica; su paso por el torrente sanguíneo requiere de una proteína transportadora, en este caso es la globulina transportadora (GBP-globulin binding protein), también conocida con transcortina. El 15% del cortisol utiliza la albumina como transportadora y una pequeña fracción del cortisol se encuentra libre en la sangre sin estar unida a una proteína, y se conoce como fracción libre de cortisol (Guerrero J., 2017).

El esteroide más conocido es el cortisol, es el glucocorticoide natural más potente; la biosíntesis tiene lugar en la capa fascicular por la acción de ciertas enzimas, con una producción diaria de 10-20mg, la vida media del cortisol es de 90 minutos, con una concentración en el plasma de 10-20 ug/dl. El cortisol circula en su mayoría unido a una proteína transportadora (CBG) y solo una 5% circula libre (0,2-0,5ug/dL), y su concentración es alta esta se une a la albúmina (Brandan, Llanos , Horak F., Tannuri H., y Rodríguez , 2014).

Figura I: cortisol plasmático total y libre.

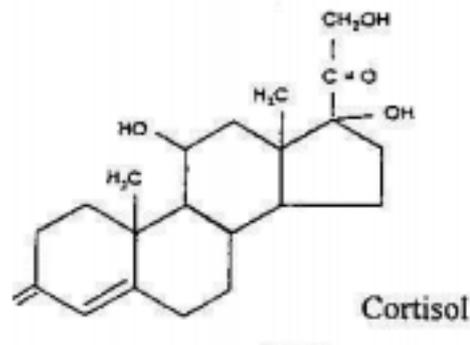


Fuente: (Guerrero J.,2017)

“La concentración sérica de cortisol es variable y presenta un valor máximo en las primeras horas del día y un punto más bajo hacia la medianoche. La liberación de cortisol puede darse ante una respuesta a una desestabilización física o emocional” (Santo, 2017)

2.4.2.3. Estructura del cortisol

Figura II: Estructura bioquímica del cortisol



Fuente: Gil, Arozarena y Rubio (2011)

La estructura básica de un glucocorticoide es de 21 átomos de carbono en distribución pregnano, con doble enlace en C4=C5 y un oxígeno en los carbonos C3, C11 y C20 (Gil, Arozarena y Rubio, 2011).

2.4.2.4. Valores de cortisol en pollos

Según Guerra D.F., Espinosa M.E., Arteaga V., y Andrade M., (2018), al evaluar el nivel de cortisol incremento con el consumo de apitoxina, determinaron que los machos tienen un nivel de 1,49 ug/dl y las hembras un nivel de 2,27 ug/dl.

Los niveles basales de cortisol proveen información limitada sobre la función de la corteza adrenal, aun así, el cortisol es medido como parte de test de estimulación y supresión que dan información más específica en cuanto al funcionamiento adrenal en casos en los que se sospecha de hiperadrenocorticismos e hipoadrenocorticismos. (Suiza Vet, 2013)

2.4.2.5. Importancia del corticoides

El cortisol es un glucocorticoide que juega un papel clave en la respuesta fisiológica al estrés y en la alostasis, el proceso activo de mantenimiento y restablecimiento de la homeostasis, lo que ayuda a un animal a adaptarse a una nueva situación o reto ambiental. Existen muchos factores que pueden hacer que la parametrización de la respuesta de estrés, como la medición del cortisol en sangre sea difícil (por ejemplo, la restricción durante la punción venosa, la capacidad para probar la respuesta por sólo un breve momento en el tiempo), por lo que es complejo estudiar el efecto de los factores medioambientales prolongados en la producción de cortisol en sangre (Sánchez, S., Benito, L., Sevilla, R. y Vega-Pla. 2016).

Una de las varias funciones del corticoides es: estimular la gluco-corticoides y eritropoyesis, mantener la integridad de la mucosa gastrointestinal, inhibición de la respuesta inflamatoria. La necesidad de cortisol incrementa en situaciones de estrés (Lathan 2013).

2.4.2.6. Usos clínicos importantes del corticoides

Los glucocorticoides ejercen efectos clínicos que son de gran valor, principalmente los relacionados con la inhibición de la respuesta inflamatoria, incluyendo la prevención de la dilatación capilar, la extravasación de los líquidos hacia los espacios tisulares, la migración de los leucocitos, el depósito de fibrina y la síntesis de tejido conectivo. “Mientras que el proceso

de inflamación es importante para retener y destruir a los agentes perniciosos sistémicos, la respuesta terminal con frecuencia es el reemplazo de tejido funcional por tejido conectivo fibroso, lo cual da lugar a una pérdida de función.” (Cunningham, 2009, p.535)

2.4.2.7. Causas de aumento o disminución de cortisol

Según (Thompson, 2015,) “no es un indicador fiable de que exista una patología, con mucha frecuencia coincide en los pacientes normales y en los que tienen enfermedad adrenal”.

- Aumento en: estrés (entorno, enfermedad), fármacos, anticonvulsivantes, hiperadrenocortisismo adrenal y dependientes de la hipófisis.
- Disminución en: fármacos e hiperadrenocortisismo.

2.4.2.7.1. Síndrome de Cushing (hiperadrenocortisismo)

“La hormona liberadora de corticotropina (CRH) esta neurohormona peptídica estimula la secreción de corticotropina en la hipófisis y se sintetiza en las células corticotropas. Esta hormona realiza una función muy importante la cual es regula las acciones del cortisol, mediante la retroalimentación negativa o feed-back negativa; esta también estimula la vasopresina la cual regula la secreción de agua” (García, 1995 como lo citó Moscoso, 2018). El incremento de la CRH causa el incremento del tamaño y número de células corticotropicas de la hipófisis, lo que puede dar como resultado en varios casos un tumor hipofisario, también el incremento de la estimulación en la corteza adrenal, teniendo como resultados altos niveles de hormonas corticoadrenales, pudiendo llevar a un síndrome de Cushing (el mismo autor).

El hiperadrenocortisismo puede ser de origen espontaneo o iatrogénica, de la forma espontánea puede se asocia por la secreción inoportuna de la hormona adrenocorticotropa hipofisiaria (ACTH) por parte de pituitaria (hiperadrenocortisismo pituitaria dependientes de PDH) o con un desorden adrenal primario (hiperadrenocortisismo adrenal dependiente) (Nelson y Couto, 2003).

La de origen iatrogénica es debido a que los animales a recibido por un periodo prolongado glucocorticoides (Melián y Pérez, 2008)

2.4.2.7.2. Síndrome de Addison (hipoadrenocorticismo)

La enfermedad de Addison, es la menor frecuencia se genera una secreción deficiente de ACTH, lo que le lleva a una disminución en la producción de glucocorticoides (hipoadrenocorticismo secundario) (Picazo, 2003).

“El hipoadrenocorticismo primario es un desorden endocrino poco común que afecta principalmente pacientes caninos, lo que conduce a una deficiencia de glucocorticoides, mineralocorticoides y hormonas sexuales adrenales” (Granados, Martínez y Galindo, 2010).

2.4.2.8. Técnicas para determinar el cortisol

Hay diferentes opciones para medir los niveles de cortisol tales son como: radioinmunoanálisis (RIA), enzimoimmunoanálisis (ELISA), electroquimioluminiscencia (ECQLIA), automatizado y cromatografía líquida/espectrometría de masa en tándem (LC/TMS) (Maidana, Bruno, y Mesh, 2013).

2.4.2.8.1. Determinación de cortisol con la técnica de ELISA

“El inmunoensayo enzimático sobre fase sólida (ELISA) está basado en el principio de la competencia. Una cantidad desconocida de antígeno presente en la muestra y una cantidad fija de antígeno marcado enzimáticamente compiten por los sitios de unión de los anticuerpos que recubren los pozos. Tras la reacción del sustrato los pozos se lavan para detener la reacción de competencia. Después de la reacción del sustrato la intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno de la muestra. Los resultados de las muestras se pueden determinar directamente usando la curva estándar.”(IBL International, 2015)

“Los valores de concentración de muestras desconocidas se determinan mediante una curva de calibración obtenida con ayuda de calibradores de concentraciones conocidas de cortisol.” (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, 2015, p. 1)

2.4.2.8.2. Determinación de cortisol por radioinmunoensayo (RIA)

El RIA “está basado en la reacción competitiva entre el cortisol no marcado en muestras y calibradores con una cantidad fija de cortisol marcada con yodo radioactivo (125), por un número limitado de sitios de unión al anticuerpo anticortisol. La cantidad de cortisol marcado con este yodo que se une al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de cortisol no marcado presente en la muestra” (Isotopes, 2010 como lo cito Calle y Rodriguez 2014-2015)

3. MATERIALES Y METODOS

3.1.MATERIALES

3.1.1. Físicos

Tabla 1. *Materiales Físicos*

Descripción	Unidad	Cantidad
Hojas de papel bond	Unidad	50
Esferos	Unidad	1
Mandil	Unidad	1
Laptop	Unidad	1
Hojas guías para la técnica de ELISA	Unidad	5
Marcadores	Unidad	1
Gorra desechable	Unidad	20
Guantes	Unidad	100
Puntas azules	Unidad	100
Puntas amarillas	Unidad	400
Puntas blancas	Unidad	100
Multicanal de 12 puntas de 300 ul	Unidad	1
Pipeta de 1000ul	Unidad	1
Pipeta de 10 ul	Unidad	1
Tubos tapa roja de 10cc	Unidad	80
Equipo de ELISA	Unidad	1

3.1.2. Biológicos

Tabla 2. *Materiales Biológicos*

Descripción	Cantidad
Animales	200
Sangre	8ml
Suero	1.5ml
Estudiantes	1

3.1.3. Químicos

Tabla 3. *Materiales Químicos*

Descripción	Unidad	Cantidad
Suero de referencia de cortisol A (0 ug/dl)	ul	25
Suero de referencia de cortisol B (1.0 ug/dl)	ul	25
Suero de referencia de cortisol C (4.0 ug/dl)	ul	25
Suero de referencia de cortisol D (10.0 ug/dl)	ul	25
Suero de referencia de cortisol E (20.0 ug/dl)	ul	25
Suero de referencia de cortisol F (50.0 ug/dl)	ul	25
Reactivo enzima de cortisol	ml	10,3
Reactivo biotina de cortisol	ml	10,3
Agua destilada	ml	73,5
Solución de lavado	ml	1,5
Sustrato A	ml	10,3
Sustrato B	ml	10,3
Microplaca sensibilizada (1*8)	tira	14

3.2.MÉTODOS

3.2.1. Diseño estadístico

El enfoque de la vigente del presente trabajo de investigación es de perfil experimental, y comparativo. Se denominan experimentales ya que el investigador interviene o manipula las condiciones de la investigación. (Zavaleta, 2010). Se considera descriptivo cuando no busca evaluar una presunta relación causa-efecto, sino que sus datos son utilizados con finalidades puramente descriptivas. (Argimon, y Jiménez, 2013, p.29).

3.2.2. Selección y tamaño de la muestra

Para esta investigación se utilizó un galpón de pollos de la granja avícola de “Medicina Veterinaria y Zootecnia”, que serán pollos de engorde. De acuerdo a esto se trabajó con un total de 200 animales, entre ellos 100 hembras y 100 machos aparentemente sanos.

3.2.3. Obtención de muestras sanguíneas

La toma de muestra se realizó entre la semana 6 – 7 de vida de los pollos, para cuantificar los niveles de cortisol.

El ave fue sujetado suavemente sujetado por una persona con experiencia.

Se utilizó jeringas estériles desechables 5 cc.

La muestra sanguínea se tomó de la vena branquial del ala, utilizando agujas de calibre 22, de ½ pulgada.

La penetración de la aguja fue cabal, es decir entre el codo y las coyunturas del hombro, con el fin de que esta se alinee con la vena branquial.

Las muestras fueron tomadas en los tubos de tapa roja sin anticoagulante. Esto tubos fueron rotulados con los siguientes datos: nombre, numero de muestra, fecha de la toma y edad de los animales.

Las muestras fueron transportadas a los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana de Cuenca, donde se las centrifugo durante 10 minutos a 3500 revoluciones por minuto.

Se pipeteo el suero sanguíneo, para ser colocados en tubos eppendorf de 1.5 ml siendo estos rotulados nuevamente, para ser congelados a -4°C hasta completar la toma total de muestras a ser estudiadas

3.2.4. Procedimiento para realizar la técnica de ELISA indirecto

Primer paso: antes de realizar la técnica de ELISA, se tuvo que dejar todos los reactivos, los pocillos y los sueros de referencia, hasta que lleguen a temperatura ambiente ($20-27^{\circ}\text{C}$).

Segundo paso: se pipeteo 25ul de los sueros de referencia de cortisol desde el pocillo A1 al F1.

Sueros de referencia de cortisol: A(0), B(1.0), C(4.0), D(10.0), E(20,0) y F (50.0).

Tercer paso: se pipeteo 25ul de los sueros de referencia de los animales a ser estudiados.

Cuarto paso: se colocó 50ul del reactivo de la Enzima de cortisol en todos los pocillos.

Quinto paso: agitó suavemente la microplaca por 30 segundo

Sexto paso: colocó 50ul del reactivo de Biotina de cortisol en todos los pocillos.

Séptimo paso: agitó suavemente la microplaca por 30 segundos, cubrió la microplaca y se incubó por 60 minutos.

Octavo paso: se votó el contenido de los pocillos, y se los seco con papel absorbente, y después se lavó los pocillos con 350ul de la solución de lavado, este procedimiento se realizó 3 veces.

Noveno paso: se agregó el contenido del sustrato A al sustrato B (sustrato de trabajo).

Decimo paso: colocó 100ul del sustrato de trabajo en cada pocillo.

Décimo primer paso: se incubo por 15 minutos la microplaca.

Duodécimo paso: se llevó al equipo de ELISA, donde se leyó con un nivel de absorbancia de 450nmn.

3.2.5. Variables del estudio

3.2.5.1. Variables dependientes

Tabla 4. *Variables dependientes: suero*

Concepto	Categoría	Indicadores	Índice
Valores de cortisol que se medirán por medio de pruebas de laboratorio.	Química Sanguínea	Cortisol	ng/ml

3.2.5.2. Variables independientes

Tabla 5. *Variables independientes: Animales*

Concepto	Categorías	Indicadores	Índice
Aves (pollos) que se encuentren aparentemente sanos	Aves (pollos)	Número de hembras Número de machos	Número Número

3.3. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los aspectos más importantes que se deben tomar en cuenta en esta investigación son: Instrucción y capacitación para realizar la extracción de sangre de la manera menos dolorosa.

Estado sanitario de los implementos tales como jeringuillas, tubos vacutainer, porta objetos, deben estar en las condiciones más óptimas y siempre estériles para evitar cualquier contagio o enfermedad al paciente.

Las Prácticas de sujeción, ya que estamos tratando con seres vivos por lo tanto es sensible a cualquier procedimiento capaz de causar dolor.

Algunos de estos puntos están basados en la ley utilitarista y deontológica que son las principales en el bienestar animal. (Cardoso y Tessari. 2003, pp. 419-424)

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Valores referenciales de la bibliografía.

Según Guerra, Espinosa, Arteaga, y Andrade, (2018), al evaluar el nivel de cortisol incremento con el consumo de apitoxina, determinaron que los machos tienen un nivel de 1,49 ug/dl y las hembras un nivel de 2,27 ug/dl.

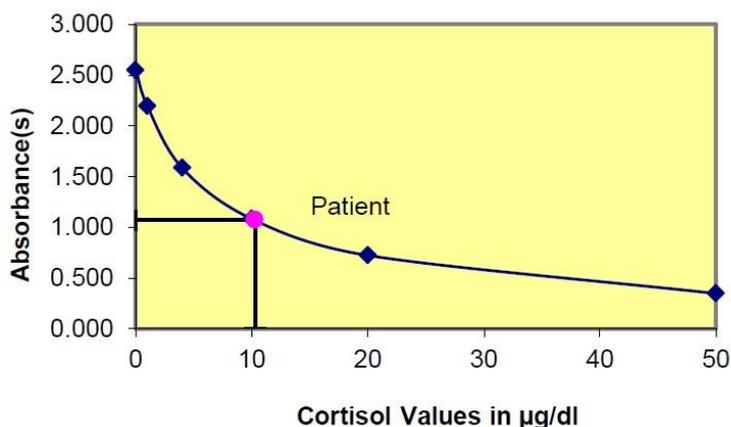
4.2. Unidades utilizadas para el cálculo de resultados

Según IBL INTERNATIONAL GMBH (2012). Ejemplariza que la conversión se realiza de la siguiente manera: cortisol (ng/mL) x 2.76 = nmol/L; cortisol (µg/dl) x 27.6 = nmol/L. lo que en la práctica masa/volumen equivale a 1 µg/dl es igual 10 ng/mL.

4.3. Discusión.

En la presente investigación se empleó el análisis de los niveles de cortisol en plasma de 200 aves 100 machos, 100 hembras posteriormente, luego de realizar todo el proceso recomendado por el fabricante del kit de cortisol, el lector de microplacas nos dio unos datos que deben ser calculados según curva de suero referencial.

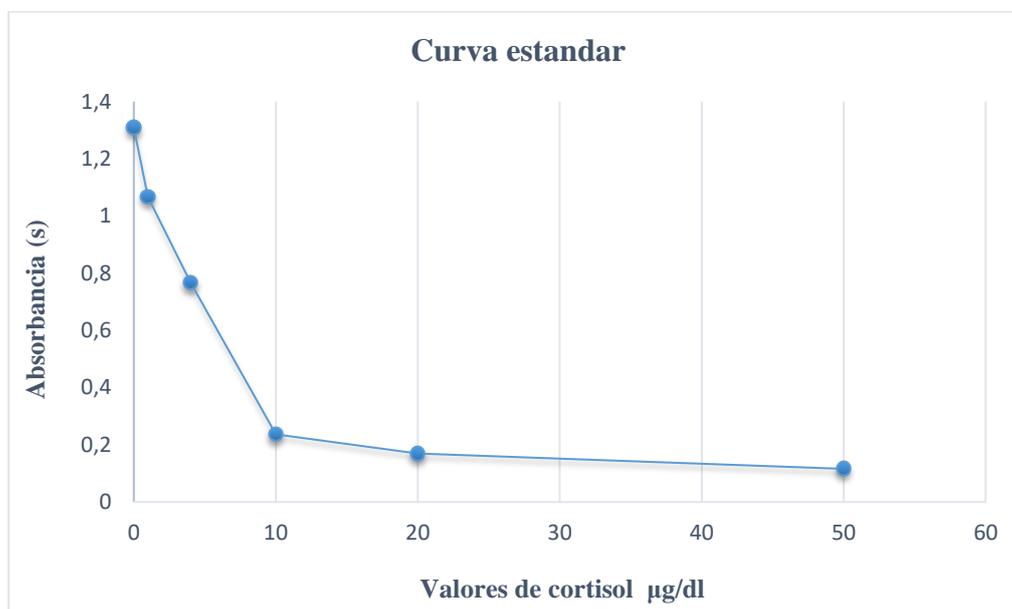
Figura III. Ilustración de la curva estándar (ejemplo).



Fuente: Monobind Inc. 2019

Los datos obtenidos de la absorbancia para la curva de referencia de esta investigación son representados en la siguiente figura:

Figura IV. Curva estándar de los datos de absorbancia y valores de cortisol en $\mu\text{g/dl}$



Los datos obtenidos en el equipo lector de microplacas nos da los resultados en el eje-y (lineal) se refleja contra su concentración en el eje-x (logarítmico) logrando un ajuste con cúbico spline, logrando obtener el dato en $\mu\text{g/dl}$.

Para analizar los datos de un ELISA competitivo se utilizó un software de hoja de cálculo común, como Microsoft Excel, siendo muy beneficioso para realizar el análisis de datos utilizando solo este programa (Protocol Place, 2014).

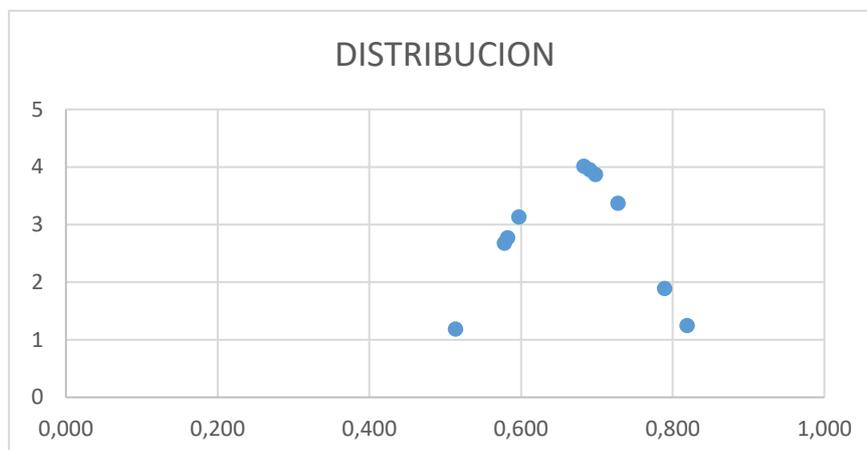
Para obtener los resultados de la absorbancia 450nm a $\mu\text{g/dl}$ en una hoja de cálculo de Microsoft Excel se obtuvo la ecuación de la siguiente gráfica de dispersión de líneas rectas y marcadores.

Tabla 6. *Medias obtenidas de la concentración de cortisol.*

Descripción	Niveles de cortisol en $\mu\text{g/dl}$
Machos	0.674
Hembras	1.007

Distribución normal de datos.

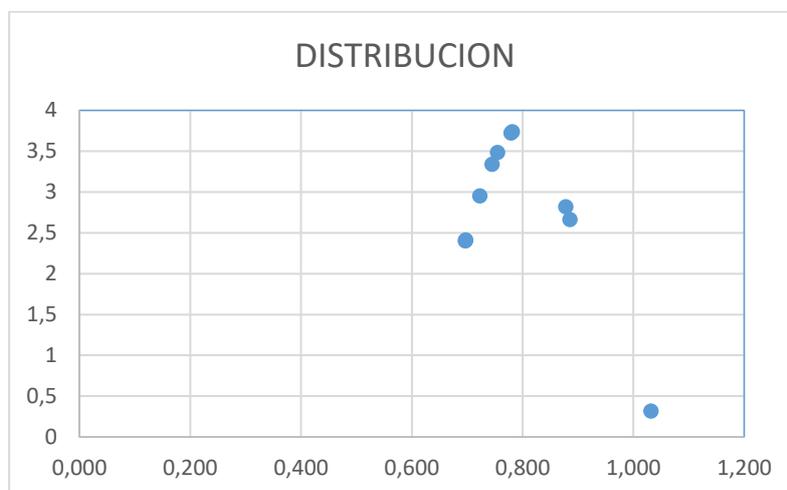
Figura V. Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 100 aves machos.



La figura se encuentra constituida en torno a la media de los niveles de cortisol 0,674 y la desviación estándar 0,286 referente de datos obtenidos por 94 aves machos, indica que la densidad está concentrada en torno a la media y se hace muy pequeña conforme nos alejamos del centro por la derecha o la izquierda. Indicando que el eje de las abscisas corresponde a los niveles de cortisol $\mu\text{g}/\text{dl}$. Este hecho, se debe a la forma acampanada y simétrica que posee su función de densidad, que hace que los elementos más comunes son los que están centrados, mientras que los raros se sitúan en los extremos.

El valor obtenido en el trabajo de investigación en relación a los niveles de cortisol presentes en torrente sanguíneo en machos es de 0,674 $\mu\text{g}/\text{dl}$ siendo un valor más bajo que el de las hembras en relación a valores de referencia que es de 1,49 $\mu\text{g}/\text{dl}$ de acuerdo a Guerra, Espinosa, Arteaga, y Andrade, (2018).

Figura VI. Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 99 aves hembras.



La figura se encuentra constituida en torno a la media de los niveles de cortisol 1,007 y la desviación estándar 0,371 referente de datos obtenidos por 99 aves hembras, indica que la densidad está concentrada en torno a la media y se hace muy pequeña conforme nos alejamos del centro por la derecha o la izquierda. Indicando que el eje de las abscisas corresponde a los niveles de cortisol $\mu\text{g/dl}$. Este hecho, se debe a la forma acampanada y simétrica que posee su función de densidad, que hace que los elementos más comunes son los que están centrados, mientras que los raros se sitúan en los extremos.

El valor obtenido en el trabajo de investigación en relación a los niveles de cortisol presentes en torrente sanguíneo en hembras es de 1,007 $\mu\text{g/dl}$ siendo un valor más elevado que el de los machos en relación a valores de referencia que es de 2,27 $\mu\text{g/dl}$ de acuerdo a Guerra, Espinosa, Arteaga, y Andrade, (2018).

Tabla VII. *Valores atípicos obtenidos de la concentración de cortisol.*

Descripción	Niveles de cortisol en ug/dl
Machos	- 1,756
	- 2,476
	- 2,097
	- 1,623
	- 1,688
	- 4,066
Hembras	22,043

En los análisis de cortisol se obtuvieron varios valores atípicos que se encuentran descritos en la tabla 7, datos que se atribuye a la posibilidad de una patología por estrés provocando que el ave tenga muy elevado nivel de cortisol en la sangre.

El dato obtenido como atípico debe a varios factores, de acuerdo a Romero, Uribe y Sánchez (2011) el factor estrés es un factor que provoca la liberación de varias hormonas tales como las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), CRH, ACTH y corticosteroides, principalmente el cortisol. “Las concentraciones de cortisol plasmático se aumentan cuando los animales son expuestos a condiciones adversas como el aislamiento, la restricción de movimiento, reagrupamiento y transporte, pobres condiciones de rodamiento y transporte intermitente”.

Los niveles de cortisol se pueden encontrar elevado debido al uso prolongado de glucocorticoides, la segunda causa de hiperadrenocortisismo depende la hipófisis, donde existe una liberación excesiva de ACTH, que se produce la hiperplasia adrenal bilateral con un exceso de producción de cortisol. La tercera causa esta debida a un tumor adrenocortical funcional

(TAF) que secreta cortisol independientemente de la acción de ACTH (Matamoros, Gómez y Andaur, 2002).

De acuerdo con Guerra, Espinosa, Arteaga, y Andrade, (2018), en el trabajo de investigación realizada los niveles de cortisol de aves entre hembras y machos, los valores más elevados se presentaron en la hembras que en los machos, pero cabe considerar que los niveles de cortisol comparado con este trabajo de investigación son menores, se puede deber a medio en el que se han sido criados, como también la alimentación y los factores de estrés a los que han sido sometido los animales, al momento de la toma de muestra se produce un factor estrés donde los animales liberan altos niveles de cortisol, y otras hormonas según la literatura investigada.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Según la tabla 6, los niveles de cortisol presente en la sangre de los pollos parrilleros mediante la técnica de ELISA indirecta, donde 99 hembras y 94 machos estudiados, presentaron niveles de cortisol dentro de los rangos establecidos, de acuerdo a los valores de referencia tomados en cuenta.

En la tabla 7, se observa a 7 individuos estudios entre hembra y machos con valores atípicos, que pueden ser resultados de un alto nivel de estrés presente al momento de la toma de muestra.

El 96,5% de población se considera que se encuentran dentro de los niveles de cortisol estándar, y el 3,5% que fuera de los valores establecidos por razones de estrés, enfermedad o el uso indebido de medicamentos.

5.2.RECOMENDACIONES

Recomiendo clasificar en variables como edad, peso, alimentación, hora del día, y la manipulación para corroborar alguna alteración en los niveles de cortisol.

Tomar en cuenta al momento de la manipulación de los animales debido a que son propensos al estrés, para la toma de muestras.

Realizar más estudios para evaluar los niveles de cortisol presente en los animales, pero no únicamente con la técnica de ELISA indirecta, sino que con otras técnicas más, para de tal manera tener más información disponible.

6. BIBLIOGRAFIA

- Álvarez R. (2007) Manifestaciones del estrés. Disponible en <http://www.etologiveterinaria.net/Articulos.htm#inicio>
- Argimon, J. y Jimenez, J. (2013). Métodos de investigación Clínica y Epidemiología. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=1I83AgAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=tipos+de+estudio+de+investigacion&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiT46ppr3bAhVDy1MKHbenBk0Q6AEIJjAA#v=onepage&q&f=false>
- Barros, M. (2018). Uso de probióticos en la alimentación de pollos boiler con diferente porcentaje de inclusión. (Tesis de pregrado), Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca. Recuperado de: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16316/1/UPS-CT007940.pdf>
- Bedanova I., Voslaroca E., Chloupek P., Pistekova V., Suchy p., Blahova J., Dobsikova R., y Vecerek V. (2007) Estrés en pollos de engorde como resultado del grillete. *Poultry Science*. 86(1) 1065-1069 Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032579119398967>
- Brandan N., Llanos I., Horak F., Tannuri H., y Rodríguez A. (2014) Hormonas de la corteza adrenal. Universidad Nacional del Nordeste-Facultad de Medicina.
- Calle V.V. y Rodríguez G.G. (2014-2015) Determinación de los niveles de cortisol durante y posterior al periodo de evaluación académica en los alumnos de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca(Tesis pregrado). Universidad de Cuenca. Cuenca-Ecuador. Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/22168/1/TESIS.pdf>
- Cardoso, A., Y Tessari, E. (2003). Estudio dos parámetros hematológicos en frangos de corte. *Arquivos do Instituto Biológico*.

- Chicaiza, O. (2009). Evaluación de la alimentación de los pollos de engorde con subproductos de la industria panadera y galletera (Tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Quito. Recuperado de: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/1865/1/CD-2440.pdf>
- Cunningham, J. (2009). Fisiología Veterinaria. México distrito federal: Litografica.
- Gil I., Arozarena O. Y Rubio J. (2011) Farmacología de los corticoides. Pamplona-España: Clínica Universitaria.
- Guerra D.F., Espinosa M.E., Arteaga V., y Andrade M. (2018) Acción de la apitoxina en la biosíntesis de cortisol y su efecto en el comportamiento productivo de pollos boiler. Revista Electrónica de Veterinaria. 19(1)
- Guerrero J. (2017) Para entender la acción del cortisol en inflamación aguda: una mirada desde la glándula suprarrenal hasta la célula blanco. Revista médica de Chile. 145(2). 230-239 Recuperado de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872017000200011
- Granados J.L., Martínez L.M. y GalindoV. (2010) Hipoadrenocortisismo primario canino: Reporte de caso. Revista Medicina Veterinaria Zootecnia. 58 (1). 34-44
- Grandi T., (1997) Evaluación del estrés durante el manejo y transporte. Journal of Animal Science. 75: 249-257 Recuperado de <https://www.grandin.com/spanish/evaluacion.estres.html>
- Hullinger R., Andrisani O. (2006) Endocrine system. In: Eureli J, Frappier B (eds). Dellmann's Textbook of Veterinary Histology. 6° ed. Blacwell Publishing, Oxford, UK. 298-319.

- Human Gesellschaft für Biochemie und Diagnostik mbH. (2015, p. 1). Análisis Elisa para la determinación cuantitativa de Cortisol o plasma humano. Germany: Human. Recuperado de <http://www.ralsa.com/files/hu55050.pdf>
- IBL International (2015) Cortisol ELISA. 1-10 Recuperado de https://www.ibl-international.com/media/catalog/product/R/E/RE52611_IFU_es_Cortisol_ELISA_2015-01_sym3.pdf
- Koolman J. (2012) Bioquímica humana. Texto y Atlas. Bogotá. Editorial Médica Panamericana.
- Lathan P. (2013) Hypoadrenocorticism in Dog. In Rand, J (ed) Clinical Endocrinology of Companion Animals. 1º ed. Wiley- Blackwell, Iowa, USA. 1-21.
- Maidana P., Bruno O., y Mesh V. (2013) Medición de cortisol y sus fracciones una puesta al día. MEDICINA (Buenos Aires). 579-584
- Mantexa X., Mainau E., y Temple D. (2012) ¿Qué es el bienestar animal?. Farm animal welfare education centre. 1 Recuperado de https://www.fawec.org/media/com_lazypdf/pdf/fs1-es.pdf
- Marenzi A.D. (2011) Curso de química biológicas. Argentina: El Ateneo.
- Matamoros R., Gómez C. y Andaur M. (2002) Hormonas de utilidad diagnóstica en Medicina Veterinaria. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 34(2). 167-182. <http://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2002000200003>
- Melián C. y Pérez M.D. (2008) Manual de endocrinología de pequeños animales. Barcelona: Multimédica Ediciones Veterinarias.
- Moscoso M.M. (2018) Síndrome de Cushing en canino (Tesis de pregrado). Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias. Medicina Veterinaria. Caldas, Antioquia. Recuperado de

http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/2227/1/Sindrome_cushing_canino.pdf

Nelson R.W., Couto C.G. (2003) Small animal internal medicine. Pensilvania: Mosby.

Picazo R. (2003) Hipoadrenocorticismo: Enfermedad de Addison. Revista AVEPA. 23(3). 155-161. Recuperado de <https://ddd.uab.cat/pub/clivetpeqani/11307064v23n3/11307064v23n3p155.pdf>

Ponce de Valle M., Vicari C., Faravelli M.F., Glauber C. y Vinter N. (2015) Manual de Bienestar Animal. Recuperado de http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/ANIMAL/BOVINOS_BUBALINOS/INDUSTRIA/ESTABL_IND/BIENESTAR/manual_de_bienestar_animal_especies_domesticas_-_senasa_-_version_1-2015.pdf

Protocol Place. (productor). (2014). Competitive ELISA Tutorial 3: Analyzing Typical Competitive ELISA Data in Excel. YouTube. De <https://www.youtube.com/watch?v=s2t0jiWxiDI>

Romero Peñuela, Marlyn Hellen, Uribe-Velásquez, Luis Fernando, & Sánchez Valencia, Jorge Alberto. (2011). BIOMARCADORES DE ESTRÉS COMO INDICADORES DE BIENESTAR ANIMAL EN GANADO DE CARNE: STRESS BIOMARKERS AS INDICATORS OF ANIMAL WELFARE IN CATTLE BEEF FARMING. *Biosalud*, 10(1), 71-87. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502011000100007&lng=en&tlng=es.

- Sánchez, S., Benito, L., Sevilla, R. y Vega-Pla. (2016). Detección de cortisol en pelo como biomarcador de estrés crónico en perros de trabajo de las FAS. *Sanidad mil.* 72 (4): 255-259. Recuperado de: <http://scielo.isciii.es/pdf/sm/v72n4/original1.pdf>
- Sandoval G.L, Revidatti F.A., Terraes J.C., Fernández R.J., Esquivel de Luchi P., (1999-2000) Efectos del estrés sobre el peso y parámetros bioquímicos de los pollos parrilleros con y sin tratamiento lipotrópico continuo. *Revista Veterinaria.* 10-11(1 y 2). 25-29
- Santo M. (2017) Determinación de cortisol sérico y su relación con el síndrome de burnout en choferes profesionales (Tesis pregrado). Universidad Técnica de Ambato. Ambato
- Suiza Vet, (2013). Pruebas Hormonales. Cortisol. Recuperado de: <http://www.suizavet.com/prueba-hormonal-cortisol.php>
- Sumano H. y Ocampo L. (1997) *Farmacología Veterinaria.* México D.F., México. MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES S.A. de C.V
- Temple D., Mainau E., y Manteca X. (2013) Estrés en animales de granja. *Farm animal welfare education centre.* 6 Recuperado de https://www.fawec.org/media/com_lazypdf/pdf/fs6-es.pdf
- Thompson, M. (2015). *Diagnóstico diferencial clínico en pequeños animales.* México: ELSEVIER.
- Zambrano, M. (2017). “Evaluación de tres niveles de zeolita (1.5 -3.0 y 4.5%) en la alimentación de pollos boiler y su efecto en el comportamiento productivo”. (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica Salesiana. Ecuador. Cuenca.
- Zavaleta, V. (2010). Estudios experimentales. p: 1 Recuperado de: <https://es.scribd.com/doc/44259747/Estudios-Experimentales>

7. ANEXOS

Figura VIII. Dispersión de líneas rectas y marcadores.

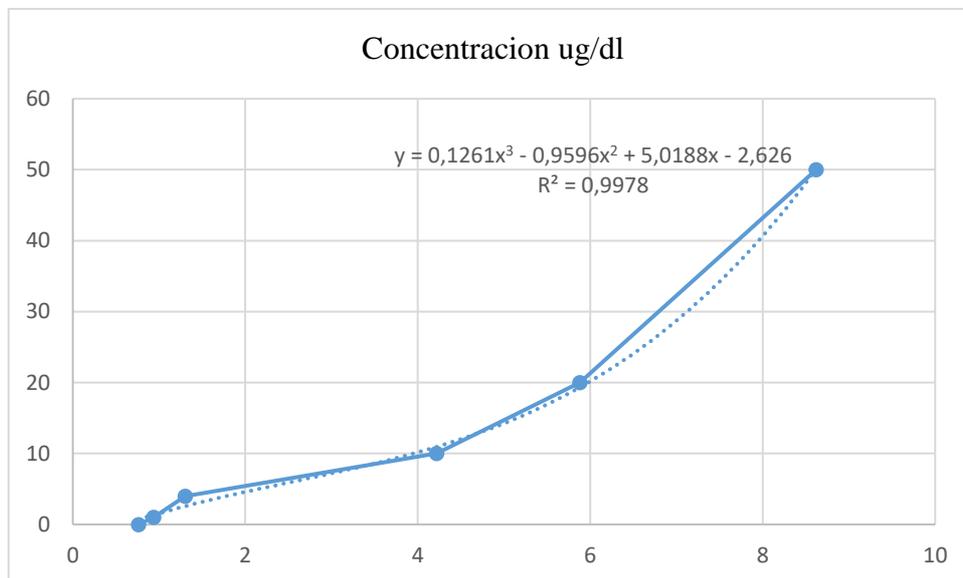


Tabla 8. Concentración de cortisol de 100 aves machos

Concentración de cortisol									
1,756	0,543	0,369	0,115	0,900	0,346	0,600	0,983	0,382	0,965
0,273	0,581	0,713	0,454	0,633	0,591	0,797	2,097	0,614	1,623
0,602	0,492	0,486	0,553	0,760	0,650	0,878	0,614	0,591	1,354
2,476	0,637	0,583	0,300	0,958	0,905	0,525	0,687	1,031	1,477
1,335	0,661	0,999	0,407	0,422	0,579	0,856	0,689	0,600	1,688
0,844	0,246	0,329	0,606	0,720	0,413	0,523	0,519	0,424	4,066
0,820	0,859	0,559	0,844	0,785	0,938	1,405	0,565	0,908	0,505
0,765	0,190	0,517	0,565	0,547	0,915	0,709	0,559	0,689	0,515
0,521	0,695	0,429	1,412	0,871	0,709	0,273	0,293	1,194	0,429
0,587	0,507	0,326	0,999	0,854	0,849	0,724	0,303	1,399	0,357

Tabla 9. *Concentración de cortisol de 100 aves hembras*

Concentración de cortisol									
0,788	0,005	1,082	0,785	0,799	0,600	0,878	0,806	0,484	0,744
0,799	0,357	0,435	0,571	2,138	0,682	0,753	1,670	0,665	0,709
0,587	1,601	0,868	0,742	0,598	0,742	0,513	0,799	0,591	0,504
1,283	0,366	0,935	0,704	0,571	1,063	0,859	0,579	0,960	0,469
1,418	1,370	0,674	0,735	0,695	0,953	0,856	0,256	1,484	0,413
0,433	0,509	0,835	0,650	1,049	0,612	0,910	0,674	0,854	0,441
1,079	0,429	0,623	0,682	0,535	1,052	0,823	0,776	1,232	0,583
0,981	0,429	0,842	0,839	0,767	0,350	0,999	1,323	0,747	0,170
0,726	1,454	0,616	0,706	0,467	0,541	0,633	0,795	0,553	0,738
0,569	0,760	0,539	2,062	0,650	0,667	0,940	1,098	22,043	2,002

Figura IX. Animales de estudio



Figura X. Toma de muestras



Figura XI. Muestras sanguíneas



Figura XII. Sueros sanguíneos



Figura XIII. Kit de ELISA de cortisol



Figura XIV. Equipo de ELISA

