



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTISOL EN GATOS (*Felis catus*)
APARENTEMENTE SANOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA CUANTITATIVA

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

AUTOR: JONNATHAN MAURICIO CAMPOVERDE LEÓN

TUTOR: DR. JUAN LEONARDO MASACHE MASACHE, MGTR.

Cuenca - Ecuador

2022

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Yo, Jonnathan Mauricio Campoverde León con documento de identificación N° 0105397343,
manifiesto que:

Soy el autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la
Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o
parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 01 de septiembre del 2022

Atentamente,



Jonnathan Mauricio Campoverde León

0105397343

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Jonnathan Mauricio Campoverde León con documento de identificación N° 0105397343, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del Trabajo Experimental: “Valoración de los niveles de cortisol en gatos (*Felis catus*) aparentemente sanos mediante la técnica de ELISA cuantitativa”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Médico Veterinario y Zootecnista, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 01 de septiembre del 2022

Atentamente,



Jonnathan Mauricio Campoverde León

0105397343

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Juan Leonardo Masache Masache con documento de identificación N° 11003109003, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTISOL EN GATOS (*Felis catus*) APARENTEMENTE SANOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA CUANTITATIVA, realizado por Jonnathan Mauricio Campoverde León con documento de identificación N° 0105397343, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 01 de septiembre del 2022

Atentamente,



Dr. Juan Leonardo Masache Masache, Mgtr.

11003109003

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo se lo dedico a Dios y a la Virgen que me han cuidado, guiado y protegido a lo largo de mi vida siendo mis pilares fundamentales en cada momento de mi vida. Reconozco también a mi madre Mónica Carmen León Ordoñez que siempre me ha acompañado en los buenos y malos momentos al brindarme su cariño, entusiasmo, empatía, comprensión, paciencia y sobre todo darme ánimos y apoyo incondicional para superarme cada día. A mi papa Raúl Campoverde darle muchas gracias por ese amigo, confidente, gran ser humano que siempre me dice sigue jamás te rindas sale al mundo a conseguir lo que te mereces y lucha por todos tus sueños. A mi abuelito Naún León también por ser esa persona que en cada momento me enseña muchas cosas y que me ha impartido sus conocimientos y por ser una gran persona con la cual le adoro con toda mi vida y que se sienta siempre orgulloso de mi y que se sienta el mejor abuelito del mundo viendo cumplir sus sueños. A mis hermanas Jessica Campoverde león y Andrea Cuesta que me enseñan siempre a ser persistente en las cosas que me gustan a que debo ser el mejor cada día y siempre humilde lo cual me hace una mejor persona y a todas esas personas que me han brindado un espacio de su tiempo para ayudarme y enseñarme todo lo que se hoy en día. A mi novia Estefanía Álvarez por ser esa fiel compañera y por ser una excelente persona quien está siempre a mi lado apoyándome a que no me rinda y nuestras palabras a darle con todo y ser el mejor a pesar de los problemas y que siga demostrando mi potencial que sea un excelente profesional le agradezco muchísimo y le dedico todos mis logros.

A mis maestros. Dr. Juan Leonardo Masache Masache por impulsarme a ser un excelente profesional y siempre ser el mejor en todo, al Dr. Patricio Garnica por brindarme su mano en los momentos más difíciles, al Ing. Pedro Webster por ser el amigo que siempre me ayudo a luchar por mis sueños y nunca rendirme en mis momentos de tristeza que me

brindo profundamente su apoyo incondicional para que no me rinda y que demuestre de lo que realmente estoy hecho y no me deje ganar por nada en este mundo estoy muy agradecido muchas bendiciones y gracias por todo mi buen amigo y agradecerle por ser nuestro guía en la elaboración de la tesis.

AGRADECIMIENTO

Me gustaría agradecer a todas esas personas que siempre han creído en mí desde que empecé a planificar mi futuro, empezando desde mi mamá Mónica Carmen León Ordoñez a la que amo con todo mi corazón y lucho cada día para que ella se sienta muy orgullosa de mí, a mi abuelito Naùn León que me ha apoyado en todo momento y que siempre creyó en mí, sobre todo a mi familia y amigos que han estado siempre que los necesite.

Agradeciendo también a todos los docentes que conforman la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia quienes, durante toda mi carrera universitaria, se han preocupado porque todos adquiramos conocimientos mediante el aprendizaje, nos han enseñado a esforzarnos y creer que después de toda tormenta viene la calma y la recompensa, me llevo solo satisfacción de estas personas tan maravillosas y los llevaré guardados a todos en el fondo de mi corazón y recuerdos únicos.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1 Problema.....	17
1.2 Delimitación	18
1.2.1 Temporal	18
1.2.2 Espacial	18
1.2.3 Académica.....	19
1.3 Explicación del problema.....	19
1.4 Objetivos	20
1.4.1 Objetivo general	20
1.4.2 Objetivos específicos.....	20
1.5 Hipótesis.....	21
1.5.1 Hipótesis alternativa.....	21
1.5.2 Hipótesis nula.....	21
1.6 Fundamentación teórica	21
2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO DOCUMENTAL	22
2.1 Gato doméstico.....	22
2.2 Manejo para evitar el estrés en el área clínica.....	22

2.3 Cortisol	23
2.3.1 Niveles altos de cortisol	23
2.3.2 Metabolismo del cortisol	24
2.3.3 Acciones del cortisol	24
2.3.4 Regulación de la secreción de cortisol: Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal	25
2.4 Hiperadrenocorticismo	25
2.4.1 Concepto.....	25
2.4.1.1 Hiperadrenocorticismo o enfermedad de Cushing	25
2.4.1.2 Enfermedad de Cushing	25
2.4.2 Epidemiología	26
2.4.2.1 Hiperadrenocorticismo espontáneo	26
2.4.2.2 Hiperadrenocorticismo iatrogénico	26
2.5 Estrés	26
2.5.1 Definición de estrés.....	26
2.5.2 Estrés en el gato.....	26
2.5.3 Factores que articulan la respuesta de estrés	27
2.6 Técnicas para determinar el cortisol.....	27
2.6.1 Técnica de Elisa	27
2.6.2 Elisa cuantitativa	28
2.7. Tipos de Elisa	28
2.7.1 Elisa indirecta	28

2.7.2 Elisa directa	29
2.7.3 Elisa sándwich.....	29
2.7.4 Elisa Competitivo	29
2.8 Cortisol accubind Elisa- IFU rev 4.....	30
2.9 Factores clave en el desarrollo de Elisa	31
2.9.1 Adsorción	31
2.9.2 Unión y lavados.....	32
2.9.3 Tiempos de incubación y temperatura	32
2.9.4 Enzimas y sustratos	32
2.9.5 Anticuerpos y antígenos empleados	32
2.9.6 Detectores.....	33
2.10 Resumen del estado del arte del problema	33
3. Materiales y métodos	35
3.1 Materiales.....	35
3.1.1 Físicos.....	35
3.1.2 Biológicos.....	36
3.1.3 Químicos	36
3.1.4. Recursos humanos.....	36
3.2 Método	37
3.3 Diseño estadístico.....	37
3.4 Población y muestra	37

3.5 Obtención de muestras sanguíneas.....	38
3.6 Procedimiento para realizar la técnica de Elisa cuantitativa	38
3.7 Procedimiento para realizar la prueba de cortisol	38
3.8 Operacionalización de variables.....	40
3.8.1 Variables independientes.....	40
3.8.2 Variables dependientes.....	41
3.9 Toma y registro de datos	41
3.10 Consideraciones éticas	41
3.12. Unidades utilizadas para el cálculo de resultados	42
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.	44
4.1. Datos obtenidos en esta investigación.....	44
4.1.1. Datos de campo en Machos.....	44
4.1.1.2. Datos obtenidos en el análisis estadístico en machos.	48
4.1.1.3. Discusión.....	49
4.1.2. Datos de campo en Hembras.....	49
4.1.2.1. Datos obtenidos en el análisis estadístico en hembras.	52
4.1.2.2. Discusión.....	53
4.1.3. Media aritmética.....	54
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	55
5.1. Conclusión.....	55
5.2. Recomendaciones.....	56

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
7. ANEXOS.....	63
7.1. Datos obtenidos en esta investigación.....	63
7.2. Fotos	66

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Ubicación: Universidad Politécnica Salesiana, Sede-Cuenca	19
Figura 4. Ilustración de la curva estándar (ejemplo).	43
Figura 5. Curva estándar de los datos de absorbancia y valores de cortisol en $\mu\text{g/dL}$ (machos)	45
Figura 6. Dispersión de líneas rectas y marcadores. (Machos).	46
Figura 7. Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 100 felinos machos.	46
Figura 8. Curva estándar de los datos de absorbancia y valores de cortisol en $\mu\text{g/dL}$ (hembras).	50
Figura 9. Dispersión de líneas rectas y marcadores. (Hembras)	50
Figura 10. Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 100 felinos hembras.	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales físicos	35
Tabla 2. Biológicos	36
Tabla 3. Químicos	36
Tabla 4. Recursos humanos.....	36
Tabla 5. Variables independientes: Animales	40
Tabla 6. Variables dependientes: Elisa Cuantitativa	41
Tabla 7. Primera placa de microtitulación analizadas en el Lector de Microplacas Elisa: absorbancia a 450nm: curva de absorbancia (6/6); plasma de felinos machos (100/100)	44
Tabla 8. Niveles de cortisol: Machos	47
Tabla 9. Análisis estadístico en machos	48
Tabla 10. Segunda placa de microtitulación analizadas en el Lector de Microplacas Elisa: absorbancia a 450nm: curva de absorbancia (6/6); plasma de felinos hembras (100/100).....	49
Tabla 11. Niveles de cortisol: Hembras	52
Tabla 12. Análisis estadístico en hembras	52
Tabla 13. Análisis de medias.....	54

RESUMEN

En la Ciudad de Cuenca se realizó la valoración de los niveles de cortisol en gatos (*Felis catus*) aparentemente sanos mediante la técnica de Elisa cuantitativa, cuya práctica se llevó a cabo en el laboratorio de la Clínica Veterinaria Polivet propiedad de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede-Cuenca. Se utilizaron 200 gatos, 100 machos y 100 hembras respectivamente. Para la valoración de los niveles de cortisol se tomó muestras sanguíneas, donde se pudo analizar e interpretar los resultados mediante la técnica de Elisa cuantitativa, la cual consistió en la utilización de un pocillo y un tester. Se ejecutó el análisis estadístico básico que determinó la media, mediana, moda, rango, varianza, desviación y coeficiente de variación. Para este inmunoensayo enzimático competitivo se utilizó reactivos que incluyen anticuerpo conjugado enzima-antígeno y antígeno nativo. Utilizando varias referencias de suero diferentes de concentración de antígeno conocida, se generó una curva de respuestas a la dosis a partir de la cual se pudo determinar la concentración de antígeno de una concentración desconocida. Los datos obtenidos en el equipo Lector de Microplacas Elisa en absorbancia a 450nm cuyos resultados fueron calculados utilizando la curva de referencia de suero, encontrando el punto de intersección en la curva y obteniendo una concentración de cortisol en microgramo por decilitro (ug/dL). En este estudio se obtuvo una media de concentración de cortisol en plasma sanguíneo en gatos de 6.721 ug/dL y 3.310 ug/dL en hembras siendo un valor referencia útil en laboratorios clínicos veterinarios.

ABSTRACT

In the city of Cuenca, cortisol levels were assessed in apparently healthy cats (*Felis catus*) using the quantitative Elisa technique, which was carried out in the laboratory of the Polivet Veterinary Clinic owned by the Salesian Polytechnic University. Headquarters-Cuenca. 200 cats, 100 males and 100 females, respectively, were used. For the assessment of cortisol levels, blood samples were taken, where the results could be analyzed and interpreted using the quantitative Elisa technique, which consisted of the use of a well and a tester. Basic statistical analysis was performed, determining the mean, median, mode, range, variance, deviation, and coefficient of variation. Reagents including enzyme-antigen conjugate antibody and native antigen were used for this competitive enzyme immunoassay. Using several different serum references of known antigen concentration, a dose response curve was generated from which the concentration of antigen of unknown concentration could be determined. The data obtained in the Elisa Microplate Reader equipment in absorbance at 450nm whose results were calculated using the serum reference curve, finding the intersection point on the curve and obtaining a cortisol concentration in micrograms per deciliter (ug/dL). In this study, a mean concentration of cortisol in blood plasma was obtained in cats of 6,721 ug/dL and 3,310 ug/dL in females, being a useful reference value in veterinary clinical laboratories.

1. INTRODUCCIÓN

La valoración de los niveles de cortisol en gatos (*Felis catus*), se realizó mediante la técnica de ELISA cuantitativa la cual se basa en el uso de antígenos o anticuerpos, esto de aquí marcará una enzima, de esta manera formando así los conjugados resultantes, que va a tener la actividad tanto inmunológica como enzimática. Por este motivo, la técnica de Elisa es relevante ya que, ayudara a medir y a obtener los diferentes resultados de los niveles de cortisol, en gatos aparentemente sanos, aparte de esto la técnica, es muy importante en la práctica diaria, puesto que nos sirve como una herramienta de diagnóstico muy útil y que se emplea muy poco en la actualidad.

Por esto la presente investigación busca proporcionar de tal manera la información sobre los valores de los niveles de cortisol en gatos (*Felis catus*) aparentemente sanos, a través de la técnica antes dicha, de esta manera ayudando, a los Médicos Veterinarios a establecer diagnósticos adecuados.

El presente trabajo de investigación nos permitirá cuantificar los niveles de cortisol en el suero de los gatos, mediante la prueba de Elisa cuantitativa

1.1 Problema

En el área clínica de la Medicina Veterinaria, con respecto a especies menores, existe una gran carencia de investigaciones acerca de la valoración de los niveles de cortisol ya que, en el momento de aplicar la prueba para medir dichos niveles, puede existir una alteración en los resultados del laboratorio, estas alteraciones pueden darse cuando la mascota se encuentra en un grado de estrés, este puede ser provocado por el entorno que le rodea.

Con respecto a las alteraciones que se pueden dar en el momento de aplicar la prueba para medir los niveles de cortisol en gatos (*Felis catus*), en efecto, llega a ser un problema,

ya que, puede darse una alteración en los resultados de laboratorio, provocando así el mal diagnóstico. Aparte la prueba “Elisa” para medir los niveles de cortisol, en la clínica, no es tan utilizada o puesta en práctica, a pesar de que esta es muy importante para los médicos veterinarios, ya que, no solo ayuda a medir los niveles de cortisol, sino también a detectar otras enfermedades y también a descartarlas.

Por este motivo, la investigación realizará la obtención de información, que sea necesaria, para los estudiantes y Médicos Veterinarios, que se dediquen al área clínica, con especialización a especies menores, de modo que, puedan tener más información con respecto a la prueba y a los resultados que se pueden obtener.

1.2 Delimitación

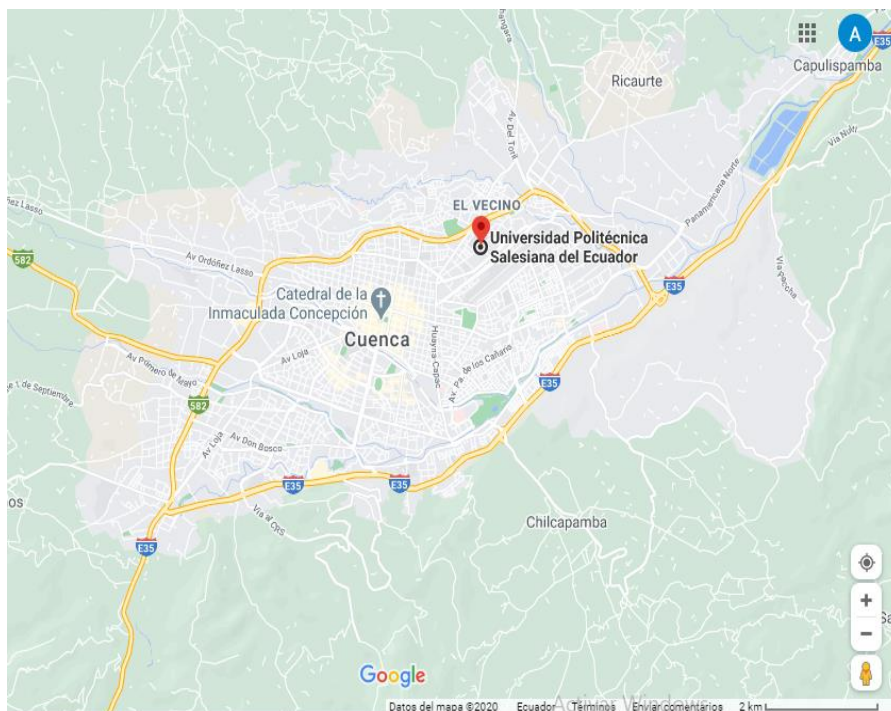
1.2.1 Temporal

El proceso investigativo abarcó una duración de 400 horas, las cuales fueron distribuidas en el trabajo experimental y la redacción del informe final.

1.2.2 Espacial

El cantón Cuenca está ubicado geográficamente entre las coordenadas 2°39' a 3°00' de latitud sur y 78°54' a 79°26' de longitud oeste con una altura de 2550 m.s.n.m. Limita al norte con la Provincia del Cañar, al sur con los Cantones Camilo Ponce Enríquez, San Fernando, Santa Isabel y Girón, al oeste con las Provincias del Guayas y hacia el este con los cantones Paute, Gualaceo y Síg sig (Espinoza, 2015). La presente investigación se realizó en el laboratorio de la Clínica Veterinaria Polivet propiedad de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede-Cuenca.

Figura 1. Ubicación: Universidad Politécnica Salesiana, Sede-Cuenca



Fuente (Google Maps, 2021)

1.2.3 Académica

La presente propuesta investigativa cubre el área de Laboratorio Clínico, la cual será aplicado a especies menores, en este caso en gatos (*Felis catus*), obteniéndose valores de referencia óptimos para mejorar la interpretación de los resultados de laboratorio tanto estudiantes y Médicos Veterinarios de la zona.

1.3 Explicación del problema

Esta investigación tiene la finalidad de obtener valores de los niveles de cortisol en gatos (*Felis catus*) aparentemente sanos, mediante la utilización de la técnica como es la Elisa cuantitativa.

El cortisol es el mayor glucocorticoide secretado por la corteza adrenal, la cual la mayoría del cortisol plasmático está ligado a lo que son las proteínas plasmáticas el 10% de cortisol circulante es libre y metabólicamente activo por tal razón esta hormona va a afectar el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos, estimulando la gluconeogénesis y así causando la resistencia periférica de la insulina, la secreción de cortisol es controlada por el feedback negativo en la respuesta a la secreción de ACTH.

Debido a que en la actualidad muchos Médicos Veterinarios y estudiantes se basan en la utilización de valores referenciales de diferentes lugares, generándose diagnósticos erróneos que conlleven a tratamientos o seguimientos del paciente equivocados, por tal manera se pretende determinar si mediante la prueba de Elisa cuantitativa nos indicará los valores de los niveles de cortisol en la especie mencionada.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Valorar los niveles de cortisol en gatos (*Felis catus*) aparentemente sanos mediante la técnica ELISA cuantitativa, en la Ciudad de Cuenca.

1.4.2 Objetivos específicos

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

Evaluar la relación de los niveles de cortisol y estrés en gatos (*Felis catus*) aparentemente sanos en condiciones de altura.

Obtener promedio de valores referenciales de cortisol en gatos domésticos aparentemente sanos en condiciones de altura.

Comparar los valores referenciales con citas bibliográficas.

1.5 Hipótesis

1.5.1 Hipótesis alternativa

Los resultados de los niveles de cortisol en gatos (*Felis catus*), aparentemente sanos obtenidos en la investigación, varían de los valores referenciales.

1.5.2 Hipótesis nula

Los resultados de los niveles de cortisol en gatos (*Felis catus*), aparentemente sanos obtenidos en la investigación, no varían de los valores referenciales.

1.6 Fundamentación teórica

El presente trabajo se realizó con el objetivo de dar a conocer la valoración de los niveles de cortisol en gatos (*Felis catus*), aparentemente sanos, mediante la técnica de Elisa cuantitativa la cual se ejecutó en el laboratorio de la clínica veterinaria Polivet ubicada en la universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca, con el fin, de conocer cómo se encuentran sus niveles de cortisol y de qué manera influye en la salud de los gatos (*Felis catus*) y por ende se obtuvo datos confiables por lo cual, se realizó diagnósticos adecuados y tratamientos efectivos.

2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO DOCUMENTAL

2.1 Gato doméstico

“El nacimiento del gato, llega a clasificarse en dos tipos de felinos de raza montés, los cuales se encuentran ubicados en diferentes continentes, el continente africano y el continente europeo. Existen evidencias de que el actual gato doméstico pudo haber sido descendiente de los gatos monteses” (Budiansky, 2003, p.16).

El gato doméstico (*Felis catus*) es uno de los mamíferos más especializados y evolucionados de todos los carnívoros y se entienden que su origen tuvo sus inicios a partir del gato silvestre (*Felis silvestris* subsp). Por motivo de los cruces continuos y también por la creación de nuevas razas ha contribuido a cambios en sus características generales (Carreño, Casanova, Díaz, y Granados, 2018, p.1123).

Por otra parte, la especie salvaje la cual proviene el gato se sitúa en el *Felis silvestris lybica*, el gato salvaje africano. Por ende, las hipótesis sobre el origen y la domesticación del gato han sido diversas con el transcurso del tiempo. El *Felis silvestris lybica* es una subespecie del gato montés (*Felis silvestris*), llegando a ser así la variante africana y de Oriente próximo (Álvarez R. ,2018, p.40).

2.2 Manejo para evitar el estrés en el área clínica

En la investigación realizada por Prieto (2018) afirma que los gatos son animales territoriales por este motivo tienden a abandonar su hogar, en el momento que tienen la visita al veterinario, les genera estrés, por este motivo debemos minimizar ya que puede inferir en el transcurso de la consulta. Por este motivo existen cinco pilares básicos para el bienestar de los felinos, estos fueron establecidos en el año 2013 por la AAFP (*American Association of Feline Medicine*) y la ISFM (*International Society of Feline Medicine*) se recomienda ser

aplicadas tanto en el hogar como en la consulta veterinaria por el motivo de que la mascota se encuentre en un ambiente tranquilo (p.374).

Para evitar el estrés en los gatos se debe utilizar un medio de transporte seguro y que le permita una ventilación adecuada. Una vez en el consultorio se debe evitar los ruidos y movimientos bruscos, ya que esto estresan más al paciente, por otra parte, no se debe olvidar de tomar las medidas necesarias para evitar que se escapen o se escondan en lugares poco accesibles, ya que son animales muy ágiles y rápidos, poseen uñas y colmillos afilados, los cuales pueden causar lesiones por este motivo es importante el manejo adecuado (Marín y Iturbe, 2019, p.4).

2.3 Cortisol

2.3.1 Niveles altos de cortisol

“Los niveles altos de cortisol pueden llegar a ocasionar enfermedades como el hipoadrenocortisismo o también conocida como la enfermedad de Addison siendo esta, el resultado de una secreción deficiente de mineralocorticoides y de glucocorticoides” (Uranovet, 2019).

El 80% de los felinos con niveles altos de cortisol son inducidos a la diabetes mellitus, insulina-resistente, ya que los gatos son más sensibles a los efectos diabetogénicos y después de ser diagnosticado las diabetes mellitus se puede sospechar de una hiperfunción cortico adrenal. También los gatos no diabéticos pueden sufrir una pérdida secundaria a los efectos catabólicos proteicos por el exceso del cortisol, conduciendo esto a la debilidad muscular, conocida también como letargia. Otra consecuencia que genera el exceso crónico de cortisol es una redistribución de las grasas, con un aumento específico en la zona abdominal ocasionando así el aspecto de un abdomen (péndulo) (Fernández, 2008, p.9).

“Cuando los niveles de cortisol están elevados pueden producir efectos severos en la piel, algunos de ellos son la atrofia epidérmica, hiperqueratosis, atrofia de la dermis, adelgazamiento de las paredes de los vasos sanguíneos y aumento de su fragilidad” (Anduar, Gómez & Matamoros, 2002, p.177).

2.3.2 Metabolismo del cortisol

El metabolismo del cortisol y corticosterona son los principales glucocorticoides que son secretados por la corteza suprarrenal. Tiene esta denominación por la incrementación de la salida de la glucosa hepática, se da a través de la estimulación del catabolismo de la grasa y proteínas periféricas la cual proporciona sustrato que llegue a alimentar la gluconeogénesis (Fernández, 2008, p. 4).

“Por otra parte, su función principal es el distribuir la hormona de transcortical hacia, los tejidos blancos y también llega a aplazar la depuración metabólica y a prevenir las fluctuaciones en la cortisolemia mediante la secreción episódica de la glándula, las condiciones normales, son del 90% del cortisol circulante la cual, está unida a la transcortina y la otra parte, que es el 10% libre” (Fernández, 2008, p.4).

2.3.3 Acciones del cortisol

En el hígado se realizan efectos sintéticos los cuales, provienen de la captación y utilización de los carbohidratos, aminoácidos y de los ácidos grasos, los cuales ayudan la conservación de la concentración de la glucosa plasmática. En cambio, en los tejidos periféricos antagonizan los efectos de insulina, en el músculo y en el tejido adiposo impiden la capacitación de la glucosa, en el encéfalo y el corazón el suministro adicional de glucosa ayuda a estos órganos a combatir con el estrés (Fernández, 2008, p.5).

2.3.4 Regulación de la secreción de cortisol: Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

En los neurotransmisores del sistema nervioso central se encarga de regular la liberación de las hormonas de corticoliberina (CRH) y arginina vasopresora (AVP), de las neuronas hipotalámicas. Estas dos hormonas se llegan a liberar en el sistema hipotálamo-hiposario y también en las células corticotropas de la adenohipófisis la cual llega a estimular la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). La corteza adrenal ACTH estimula la síntesis y también la secreción de glucocorticoides y esteroides androgénicos. El ACTH, tiene una secreción de grandes concentraciones circulantes de cortisol libre. Secretando así brotes episódicos durante todo el día, siendo influido por el hipotálamo. Por lo cual, el eje hipotálamo-hipófisis- adrenal llega a tener una alta sensibilidad de estrés, la cual responde en pocos minutos el aumento de secreción de CRH Y AVP (Fernández, 2008, p.5).

2.4 Hiperadrenocorticismo

2.4.1 Concepto

2.4.1.1 Hiperadrenocorticismo o enfermedad de Cushing

“Esta enfermedad puede darse o ser más frecuente en perros de edad media y viejos, en gatos es muy raro que se dé. Esto llega a constituir en un estado clínico la cual resulta la exposición crónica o concentraciones excesivas de glucocorticoides” (Ruiz, Espada & Peñalba, 2003, p.7).

2.4.1.2 Enfermedad de Cushing

“Es una hipersecreción de ACTH es dada por la hipófisis, la cual llega a constituir la causa más frecuente del síndrome de Cushing, siendo su aparición de manera natural” (Ruiz, Espada & Peñalba, 2003, p.8).

2.4.2 Epidemiología

2.4.2.1 Hiperadrenocorticismo espontáneo

La segregación del ACTH, en gatos normales lo hace en un ritmo circadiano y se llega a mantener en un efecto regular por la estimulación del CRH y por los efectos inhibidores del cortisol. En cambio, los gatos que padecen hiperadrenocorticismo siendo dependiente de la pituitaria (HDP), aparte la ACTH, es segregada en forma persistente la cual lleva a una hiperplasia adrenal bilateral. Esta anormalidad hipofisaria puede llegar a ser originada por adenomas, carcinomas o hiperplasia de las células corticotropas de la pars distal o intermedia de la hipófisis. Esta patología puede provocar la pérdida de la retroalimentación negativa la cual es impulsada por el cortisol y también en los niveles de ACTH las cuales, permanecen por encima de los valores normales (Fernández, 2008, p.8).

2.4.2.2 Hiperadrenocorticismo iatrogénico

“Esta de aquí es dada por la administración de glucocorticoides exógenos, aunque esto es extremadamente raro que se de en felinos” (Fernández, 2008, p.7).

2.5 Estrés

2.5.1 Definición de estrés

El estrés puede ser definido como una amenaza real que puede llegar afectar a la integridad fisiológica y psicológica del sujeto, puede ser un daño real o potencial, esto puede darse por dos tipos de estrés físico o emocional. El estímulo físico o sistémico puede darse por una alteración directa de la homeostasis, mientras tanto en el estímulo emocional o psicológico es provocado por una respuesta anticipada (Fernández & García, 2019, p.9).

2.5.2 Estrés en el gato

Es el conjunto de reacciones fisiológicas que le permiten a un animal adaptarse a una nueva situación y también puede ser considerado como positivo. El estrés llega a ser negativo

cuando es excesivo o sobrepasa la capacidad de adaptarse del animal, si este llega a ser crónico puede convertirse en ansiedad. Las principales causas de estrés en el gato pueden ser de factor genético, experiencias durante el desarrollo, experiencias tempranas del aprendizaje y también la falta de control y predicción del entorno social y físico (Baciero, 2017, p.1).

El estrés puede llegar a desencadenar de manera cronológica, una serie de estímulos que varían su magnitud en breve tiempo y de manera imperceptible produciendo así al animal la transición de un estado homeostático del equilibrio a una reacción de alarma la cual no es respondida de una forma adecuada. Siendo así el estrés la incapacidad para dominar el peligro (Álvarez, 2012).

2.5.3 Factores que articulan la respuesta de estrés

“Dichas situaciones de estrés son parte de nuestra vida diaria y las respuestas de estrés que se dan llegan a proporcionar mecanismos para sobrellevar estas situaciones, algunas de ellas es el adaptarse, afrontar o también puede llegar a perjudicar” (Fernández & García, 2019, p.15).

2.6 Técnicas para determinar el cortisol

“Existen diferentes tipos de técnicas que nos permiten medir el cortisol, algunas de ellas son: enzimoimmunoanálisis (ELISA), radioimmunoanálisis (RIA), automatizado y cromatografía líquida/espectrometría de masa en tándem (LC/MS) y por último electroquimioluminiscencia (ECLIA)” (Maidana, Bruno & Mesh, 2013, p.581).

2.6.1 Técnica de Elisa

“Son técnicas de alta sensibilidad que detectan cantidades iguales a nanogramos, estas son caracterizadas por la acción de un anticuerpo que es conjugado con una enzima siendo las más comunes, la peroxidasa o la fosfatasa alcalina” (Stanchi, 2010, p.150).

Para Tizard (2009) indica que entre “las pruebas más importantes de inmunoanálisis empleadas en medicina veterinaria está el análisis de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA). Al igual que otras pruebas de unión primaria, el Elisa puede emplearse para detectar y medir tanto anticuerpos como antígenos” (p. 513).

La forma más utilizada de Elisa es para detectar y cuantificar anticuerpos específicos. Lo primero que se hace es llenar los pocillos de las microplacas de poliestireno con una solución de antígeno (Tizard, 2009).

2.6.2 Elisa cuantitativa

“Es un método novedoso, pero a diferencia de los otros, se utiliza protocolos más complejos y su adquisición se restringe a laboratorios especializados debido al costo de este, ya que requiere de equipos especiales para su realización” (Beneanula, 2010, p. 63).

Elisa cuantitativa se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, formando así los conjugados resultantes que tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Los componentes (antígeno o anticuerpo) al estar marcados con una enzima e insolubilizado sobre un soporte, tienen la reacción del antígeno anticuerpo, este quedará inmovilizado y por lo tanto será más fácil revelarla por esto la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso del espectrofotómetro o un colorímetro (Buñay, 2019, p.51).

2.7. Tipos de Elisa

2.7.1 Elisa indirecta

“Usado para la detención de Abs (anticuerpos) y Ags (antígenos) se incuba el Ag (antígeno) en un tapón apropiado en los pocillos de una placa de micro titulación y se absorbe en las paredes de los pocillos, el Ag libre se elimina por lavado y el Ag absorbida en la placa reacciona con el Ab específico” (Suárez, 2017, p. 98).

Esta prueba favorece en la detención de anticuerpos, el soporte tiene unido al antígeno específico contra el que va dirigido el anticuerpo que se está buscando la muestra. Lo primero es agregar la muestra del paciente y si el anticuerpo está presente, existirá una unión al antígeno el cual ya estaba adherido al soporte (Mercadillo, Ríos, Ríos & Yuil de Ríos, 2012, p.213).

2.7.2 Elisa directa

El nombre de Elisa directa tiene su desglosamiento, en la comparación de la inmunofluorescencia directa, en donde una sola etapa es necesaria, para que la reacción se lleve a cabo y se evidencie (Gómez, Gutiérrez, Rodríguez & Rueda, 1994, p.84).

“Es el ensayo as simple y rápido de todos, donde un anticuerpo primario marcado con una enzima unirá directamente el antígeno de interés permitiendo la detección o cuantificación de este” (Abyntek, 2019, p.1).

2.7.3 Elisa sándwich

“Es una modalidad que permite cuantificar antígenos entre dos capas de anticuerpos (anticuerpo de captura y de detección). El antígeno en el momento que es medido debe contener al menos dos epítomos antigénicos (sitios de reconocimiento) los cuales son capaces de unirse al anticuerpo, ya que dos anticuerpos actúan en el sándwich” (Urse, 2016, p. 81).

En el ELISA en sándwich las placas se sensibilizan con anticuerpos, que son dirigidos contra el antígeno problema, ya que este busca y cuantifica los antígenos (Rojas, 2006, p.228.).

2.7.4 Elisa Competitivo

“En esta técnica, el antígeno marcado con la enzima compite con el antígeno problema, presente en el espécimen, por los centros de unión de una cantidad limitada de anticuerpos específicos, adsorbidos o unidos covalentemente a una fase sólida. En los

procedimientos de enzimoimmunoanálisis competitivo la detectabilidad depende en gran medida de la constante de afinidad del anticuerpo para con su antígeno” (Castiñeiras & Queraltó, 1997, p. 352-353).

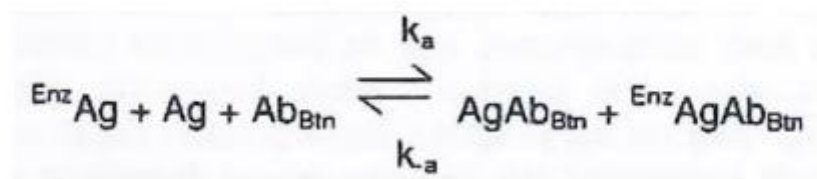
“Una cantidad determinada de anticuerpo no marcado se fija a un grupo de placas y a una preparación de estándar de referencia de un antígeno marcado existe lo que es la unión, después de todo esto se añade diversas cantidades de muestras no marcadas y se mide lo que es el desplazamiento del antígeno marcado, esto genera curvas de inhibición” (León, 2019).

2.8 Cortisol accubind Elisa- IFU rev 4

El kit de Elisa Monobind Cortisol utiliza un anticuerpo monoclonal anti-cortisol específico y este no requiere de la extracción de una muestra previa de suero o plasma. La colocación de varias referencias séricas de concentración es conocida de cortisol las cuales, permiten la construcción de una gráfica activa y también de concentración. Donde se puede comparar la curva con la respuesta de la dosis y también se puede correlacionar una muestra desconocida con una concentración de cortisol (AccuBind® Elisa, 2019).

Los reactivos que son esenciales para un inmunoensayo enzimático llegan a incluir anticuerpos, conjugados con enzimas-antígeno y antígeno nativo. Ya que al mezclar anticuerpo biotinilado, conjugado con enzima- antígeno y un suero el cual contiene el antígeno nativo, se produce una reacción de competencia con el antígeno nativo y el conjugado enzima-antígeno con un limitado número de uniones de anticuerpos (AccuBind® Elisa, 2019. p. 7). Dicha interacción se presenta en la siguiente ecuación en la figura 1.

Figura 1. Ecuación de inmunoensayo enzimático competitivo.



Fuente: (AccuBind®Elisa 2019).

- Ac_{Btn} = Anticuerpo marcado con biotina (Cantidad constante)
- Ag = Antígeno nativo (Cantidad variable)
- EnzAg = conjugado enzima-antígeno (cantidad constante)
- AgAc_{Btn} = complejo antígeno-anticuerpo
- $\text{EnzAgAc}_{\text{Btn}}$ = Complejo de anticuerpo-Conjugado enzima-antígeno
- K_a = Rango constante de Asociación
- kK_a = Rango constante de disociación
- $K = k_a/k_{-a}$ = Constante de equilibrio

“Se da una reacción simultanea entre biotina adherida al anticuerpo y la estreptavidina inmovilizada en el micro pocillo, esto llega a efectuar la separación de la fracción adherida al anticuerpo después de la aspiración o decantación” (AccuBind® Elisa, 2019, p.8).

2.9 Factores clave en el desarrollo de Elisa

2.9.1 Adsorción

En la fase sólida tiene que ser un tipo fácil de manejo y que se mantenga una buena reproducción en la unión de Ags o Abs en su superficie. Se han llegado a ensayar varias fases sólidas, desde los tubos de cristal a las actuales microplacas de 96 pocillos de plástico, esta de aquí ayuda en la capacidad de adsorción, de moléculas y con fondos de pocillo los cuales son ópticamente transparentes donde se puede realizar las medidas

espectrofotométricas, siendo así las lecturas de placas que tienen el nombre de lector de Elisa. Las microplacas de 96 pocillos y con un volumen de 360 μl , son ventajosas ya que, permite procesar elevados números de muestras, y una vez tapizadas, en el material permanece reactiva mucho tiempo la muestra, siempre y cuando se mantenga seca y a baja temperatura (Cultek, 2006).

2.9.2 Unión y lavados

Estos de aquí son dos procesos importantes, ya que en las diferentes etapas del lavado se llega a eliminar toda la fracción de moléculas que ha quedado libre, sin reaccionar, de esta manera se evita interferencias no deseadas por otra parte, permite asegurar la unión de forma correcta sin el impedimento de fracciones libres (Suárez, 2017).

2.9.3 Tiempos de incubación y temperatura

Se debe asegurar del tiempo y la temperatura de incubación deben ser los correctos en cada etapa ya que, si existe una mínima variación en estos ensayos, puede existir grandes cambios en los resultados de los ensayos. Por este motivo, se debe trabajar con un equipo bien calibrado, estufas de incubación, frigoríficos con la temperatura exacta y no tenga leves variaciones y ser muy cuidadosos en el momento de finalizar la fase del ensayo y comenzar la siguiente (Suárez, 2017).

2.9.4 Enzimas y sustratos

“Las enzimas son elementos marcadores, esto se debe a su enorme poder catalítico, su alta especificidad, el amplio espectro de sustratos que pueden llegar a unirse y por último su gran estabilidad de los conjugados” (Ochoa, 2012).

2.9.5 Anticuerpos y antígenos empleados

En el método de Elisa se debe emplear los Abs y Ags de manera adecuada al objetivo planteado, de esta manera la calidad y la pureza de estos. Si es adquirida en las casas

comerciales, deben venir acompañadas de su certificado de análisis donde se llegue a facilitar los datos referentes del producto, así también como se debe ir indicado el lote de fabricación (Suárez, 2017.p 104).

2.9.6 Detectores

Los lectores de Elisa son espectrofotómetro los cuales son capaces de realizar lecturas en serie de cada uno de los pocillos de la placa de Elisa. También los lectores similares de espectrofotómetro convencionales tienen la capacidad de medir todas las longitudes con una onda ultravioleta y del visible, los lectores de Elisa más ocupados tienen un sistema de filtros que solo permiten la lectura de un conjunto de longitud de onda. Se encarga de medir la adsorción de los cromógenos más comúnmente utilizados. Existen sistemas de detección colorimétricos, fluorescentes y luminiscentes (Coello, 2010).

2.10 Resumen del estado del arte del problema

En el día a día los animales domésticos se someten a lo que es situaciones estresantes lo cual en el gato se debe a la falta de conocimiento sobre la forma del compartimiento de esta especie por parte de los propietarios. Una de las causas ambientales que presentan los gatos y que generan es el estrés, que van a incluir los cambios de entorno, los ambientes, que van a impedir lo que son los comportamientos naturales y necesarios, y las relaciones sociales con las personas y otros animales. Se realizó en gatos que vivían en un entorno de laboratorio y fueron sometidos a condiciones de predictibilidad, lo cual se pudo constatar que los animales que se escondían son más propensos a tener niveles de cortisol más bajo donde los resultados indica que su comportamiento incrementa la situación de estrés (Fernández & García, 2019).

Se realizó un estudio en Uruguay, por Fernández (2008), en el cual se obtuvieron los siguientes valores referenciales de 2 a 36×10^6 basando en los resultados de 42 gatos sanos, y en otros valores se obtuvieron de 0 a 4×10^6 en la muestra de 31 gatos (p.13).

Se realizó una investigación en la universidad de Zaragoza-España, por Chacón, Palacios, Sánchez, Mendoza, Galarza & García (2005), donde se pudo observar que el suero tiene una gran afinidad con el cortisol estando un 70% por otra parte, la concentración en la sangre está limitada y puede llegar a saturarse con concentraciones altas de cortisol (p. 70). La concentración basal de cortisol en la muestra de plasma en felinos es de 27 ng/ml (0.00027 ug/dl) por el método de Elisa (p. 70).

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Físicos

Tabla 1. *Materiales físicos*

Descripción	Unidad	Cantidad
Paquete de hojas de papel bond	Unidad	1
Esferos	Unidad	2
Libreta de notas	Unidad	2
Marcadores	Unidad	3
Carpetas	Unidad	2
Guantes de nitrilo	Caja	1
Mascarillas	Caja	1
Jeringas	Caja	1
Tubos eppendorf (100 unidades)	Caja	1
Termómetro	Unidad	1
Algodón	Paquete	2
Maquina rasuradora	Unidad	1
Bozal	Unidad	2
Lector de Elisa	Unidad	1
Tubos vacutainer	Caja	1
Kit de Elisa	Caja	1

3.1.2 Biológicos

Tabla 2. *Biológicos*

Descripción	Cantidad
Animales	200
Sangre por animal	1ml
Estudiante	1

3.1.3 Químicos

Tabla 3. *Químicos*

Descripción	Unidad	Cantidad
Colorante	Unidad	1
Alcohol	Unidad	1

3.1.4. Recursos humanos

Tabla 4. *Recursos humanos*

Nombre	Descripción
Dr. Juan Masache Masache	Tutor de tesis
Jonnathan Campoverde León	Tesista

3.2 Método

El método que se utilizó en la presente investigación fue experimental-deductivo debido a que de tal manera se observan e identifican la valoración en los niveles de cortisol mediante la prueba de laboratorio como es la técnica de Elisa cuantitativa donde se ve determinada por la especie a estudiar, lo que permitirá a los Médicos Veterinarios y Zootecnistas realizar un diagnóstico certero y confiable.

3.3 Diseño estadístico

Para el análisis estadístico se empleó la estadística descriptiva, donde se procedió a utilizar medidas de dispersión la cual va a abarcar conceptos de media, rango, mediana, moda, varianza, desviación típica y coeficiente de variación, así como gráfica interpretativa.

3.4 Población y muestra

Para la investigación se realizó lo que es un examen clínico general en pacientes aparentemente sanos, donde se manejó 200 gatos, 100 hembras y 100 machos respectivamente, de los cuales se tomaron muestras sanguíneas para poder analizar e interpretar resultados mediante la técnica de Elisa cuantitativa y la utilización de un pocillo y un tester. Cuya práctica se realizó a cabo en el laboratorio de la clínica veterinaria Polivet propiedad de la Universidad Politécnica Salesiana., Sede Cuenca.

$$n = \frac{N}{(E)^2(N-1)+1}$$

n= Tamaño de la muestra

N=Población o universo

E= Error admisible

$$n = \frac{200}{(0.005)^2(200-1)+1} = \frac{200}{(0.0025)^2(199)+1} = \frac{200}{14975} = 133.55593$$

La población es de 200 gatos, se trabajó con lo que es un error admisible de 5% es decir 0,005%, entonces si el universo es de 200 gatos, el tamaño de la muestra es de 133.5593 gatos.

3.5 Obtención de muestras sanguíneas

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular del cuello, utilizando una jeringa de 5 ml, por tal razón se depiló la extremidad mencionada y se procedió a aplicar antisépticos, luego se procedió a realizar la punción en la vena para extraer 1ml de sangre que se colocó en un tubo vacutainer con anticoagulante EDTA (etilen-diamino-tetra-acético) con la finalidad de realizar la técnica de Elisa cuantitativa.

3.6 Procedimiento para realizar la técnica de Elisa cuantitativa

Mediante los componentes del kit de Elisa cuantitativa se procedió a utilizar y realizar la preparación de las muestras, también se llevó a cabo la preparación del antígeno, la adicción del control positivo y negativo en los pocillos y por consiguiente la adicción de las muestras previamente preparadas, se procedió a la incubación a 37°C y después se realizó un lavado, según las indicaciones previas, se procedió a la aplicación de la solución de frenado y de esta manera se obtuvo la placa ya lista para ser colocada en el lector de Elisa.

3.7 Procedimiento para realizar la prueba de cortisol

La elaboración de la prueba se llevó a cabo en el laboratorio de la Universidad Politécnica Salesiana donde se permitió realizar todos los reactivos, calibradores de suero de referencia y controles a temperatura ambiente (20 – 27 °C).

El kit que se utilizó es de la marca AccuBind® ELISA importado de Lake Forest del condado de Orange, California, USA.

Se debe de seguir las instrucciones del fabricante para un uso adecuado.

1. Se marca cada pozo de la microplaca de los calibradores, controles y las muestras de los pacientes y se pueden probar por duplicado.
 2. Se pipetea 0.025 ml (25 μ l) del calibrador apropiado, así se controla las muestras dentro del pozo asignado.
 3. Se adiciona 0.050 ml (50 μ l) de reactivo de enzima cortisol a todos los pozos.
 4. Se agita de manera suave la microplaca por 20-30 segundos para mezclar.
 5. Se adiciona 0.050 ml (50 μ l) de reactivo de Biotina-Cortisol a todos los pozos.
 6. Agitar la microplaca de manera ligera por unos 20 a 30 segundos para mezclarle.
 7. Se cubre y se lleva a incubar por 60 minutos en temperatura ambiente.
 8. Se descarta los contenidos de la microplaca por medio de decantación o aspiración. Si se hace decantación de debe golpear la placa sobre un papel absorbente
 9. Se adiciona 350 μ l del tapón de lavado, decantar, golpear de manera suave y secar o también se puede aspirar, este procedimiento se repite de 2 veces para un total de 3 lavados.
 10. Se adiciona 0.100ml (100 μ l) de solución de sustrato a todos los pozos.
- NO SE MEZCLA LA MICROPLACA DESPUÉS DE LA ADICIÓN DE SUSTRATO.
11. Incubar en temperatura ambiente en un lapso de 15 minutos.
 12. Se coloca 0.050ml (50 μ l) de solución de parada a cada pozo y se mezcla de manera ligera por un lapso de 15-20 segundos.
 13. Se lee la absorbencia de cada pocillo a 450nmn, con una longitud de onda con una referencia de 620-630nm donde se minimiza las imperfecciones de los pocillos, en un

lector de microplacas, estos resultados deben ser leídos en un lapso de 30 minutos después de haber colocado la solución de parada.

3.8 Operacionalización de variables

3.8.1 Variables independientes

Tabla 5. *Variables independientes: Animales*

Concepto	Categorías	Indicadores	Variables
Gatos aparentemente sanos mediante la valoración de los niveles de cortisol	-Biológica: -Muestra de sangre -Hembra Macho	-Número de hembras -Número de machos -Cantidad de sangre	-Número -Número -Mililitros (ml)

3.8.2 Variables dependientes

Tabla 6. *Variables dependientes: Elisa Cuantitativa*

Concepto	Categorías	Indicadores	Variables
Es un test que permite	-Muestra		
cuantificar el nivel de	de sangre	-Niveles de cortisol	- Aumento de los
anticuerpos, se toma			niveles de cortisol
una muestra de sangre		-Constantes	- Disminución de los
la cual se lleva a cabo el		fisiológicas:	niveles de cortisol
procedimiento para		-temperatura	
obtener una placa ya		-frecuencia cardiaca	
lista y donde se		-frecuencia	
analizara los niveles		respiratoria	
cortisol.		-Presión arterial	

3.9 Toma y registro de datos

Se utilizaron fichas clínicas en donde se registró el género, el número de muestra y los niveles de cortisol obtenidos en la técnica de Elisa cuantitativa

3.10 Consideraciones éticas

Las normativas éticas, por ende, se basan en ideas de que existen diferencias cualitativas entre animales y humanos, por este motivo con el tiempo, se ha llegado a un acuerdo de velar por el bienestar de los animales de laboratorio, por este motivo se basan en tres principios que se enfocan en reducir la falta de humanidad en la investigación: Reemplazar, reducir y refinar (Villela, 2019).

Cabe recalcar que debemos brindar los cuidados adecuados a los animales, aparte se debe evitar el dolor innecesario, sufrimiento, estrés o lesiones prolongadas, evitar la duplicación o repetición innecesaria de experimentos y también se debe reducir al mínimo número de animales para garantizar la validez del estudio a realizar. De esta manera se observó las condiciones de bienestar y calidad que va a tener el animal (Martínez y Osorio, 2008, p.50).

3.11. Valores referenciales de la bibliografía.

Las concentraciones plasmáticas de cortisol varían dentro de un rango normal en mamíferos de alrededor de 4 a 16 µg/dL, y muestran un ritmo circadiano, con concentraciones normales que aumentan durante las horas de sueño. Debido a esta ritmicidad circadiana, debe tenerse en cuenta el momento de la toma de muestras de sangre al interpretar las concentraciones clínicas de cortisol plasmático. (Larry E. 2012, p.45).

3.12. Unidades utilizadas para el cálculo de resultados

Las unidades que se utilizan para medir el cortisol son en ng/ml y en µg/dl, según Grandin, T. (1997) en su recopilación de niveles de cortisol en ganado bovino durante el manejo y la matanza, utiliza ng/ml y otros autores de libros como Larry E. (2012) y el fabricante del kit de cortisol Monobind Inc. trabajan en las unidades de µg/dl.

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.

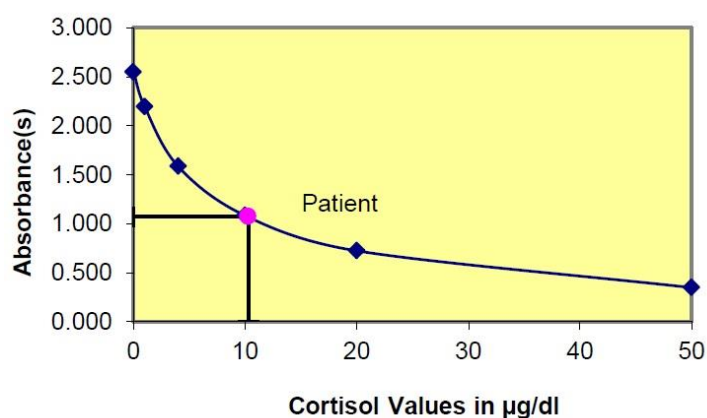
Las concentraciones plasmáticas de cortisol varían dentro de un rango normal en mamíferos de alrededor de 4 a 16 µg/dL, y muestran un ritmo circadiano, con concentraciones normales que aumentan durante las horas de sueño. Debido a esta ritmicidad

circadiana, debe tenerse en cuenta el momento de la toma de muestras de sangre al interpretar las concentraciones clínicas de cortisol plasmático. (Larry E. 2012, p.45).

Las unidades que se utilizan para medir el cortisol son en nanogramo por mililitro (ng/ml) y en microgramo por decilitro ($\mu\text{g/dL}$), según Grandin, T. (1997) en su recopilación de niveles de cortisol, utiliza ng/ml y otros autores de libros como Larry E. (2012) y el fabricante del kit de cortisol Monobind Inc. trabajan en las unidades de $\mu\text{g/dL}$.

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).

Figura 2. Ilustración de la curva estándar (ejemplo).



Fuente: Monobind Inc. 2019.

La figura 4 es utilizada para el cálculo de los datos, útil para hallar la concentración del cortisol, es obtenida del calibrador del cortisol siendo seis los viales de suero referencia cortisol analizado en el equipo de ELISA junto con la lectura de las microplacas de plasma sanguíneo. Esta curva se grafica según las 6 absorbancias del calibrador útil para determinar la concentración en plasma. Localizando cada absorbancia en el eje vertical del gráfico, encontrando el punto de intersección de la curva y leer la concentración en $\mu\text{g/dl}$ en el eje horizontal de la gráfica.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

4.1. Datos obtenidos en esta investigación

4.1.1. Datos de campo en Machos.

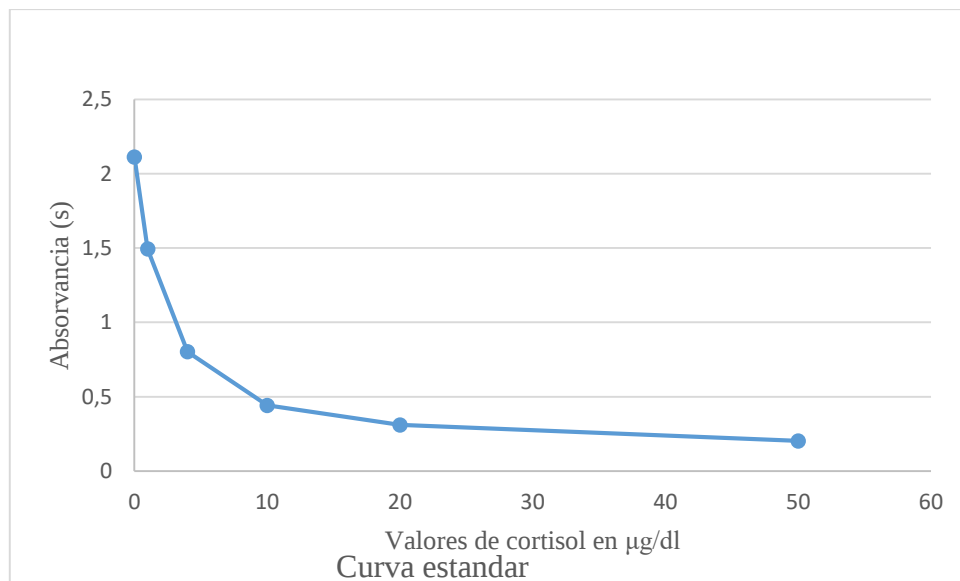
Luego del análisis del cortisol en plasma de felinos machos obtuvimos las siguientes tablas:

Tabla 7. *Primera placa de microtitulación analizadas en el Lector de Microplacas Elisa: absorbancia a 450nm: curva de absorbancia (6/6); plasma de felinos machos (100/100)*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A	2,112	0,243	0,846	0,448	0,926	0,407	0,499	0,314	0,185	0,896	0,230	1,696	2,191	0,864
B	1,494	0,394	0,601	0,441	0,406	1,166	0,438	0,271	0,262	0,627	0,321	0,267	1,296	1,283
C	0,802	0,183	0,291	0,520	0,804	0,358	0,284	0,350	0,283	0,452	0,331	0,307	1,070	
D	0,442	0,629	0,667	0,276	0,385	0,322	0,415	0,363	0,365	1,147	0,452	0,294	2,259	
E	0,310	0,237	0,305	0,490	0,362	0,630	0,247	0,221	0,186	0,149	0,208	0,183	1,203	
F	0,203	0,437	0,367	0,301	0,263	0,348	0,212	0,222	0,397	0,267	0,383	0,309	1,118	
G	0,247	0,837	0,342	0,203	0,395	0,362	0,221	0,370	0,167	0,239	0,242	0,340	1,729	
H	0,671	0,424	0,369	0,827	0,327	0,448	0,309	1,158	0,404	1,317	0,607	0,431	1,341	

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

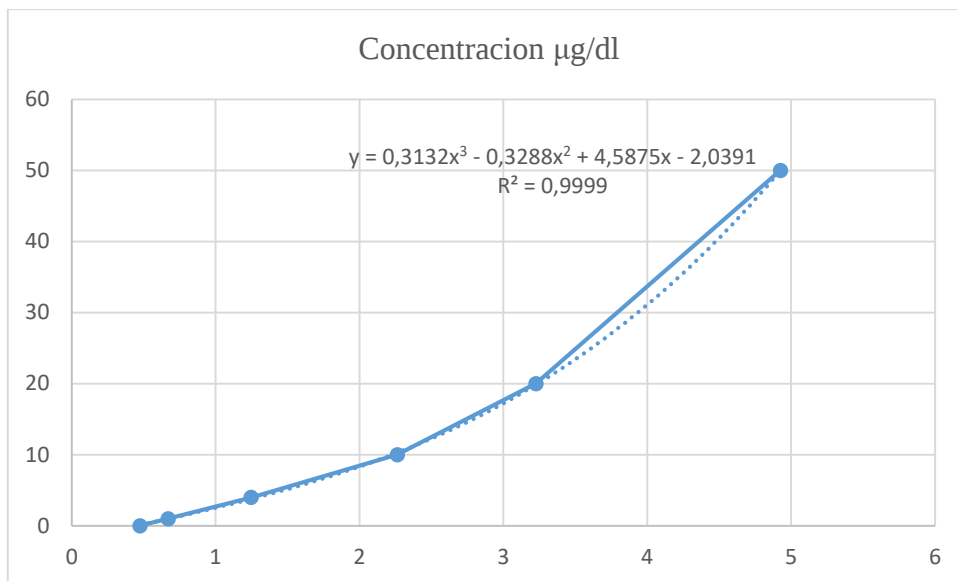
Figura 3. Curva estándar de los datos de absorbancia y valores de cortisol en $\mu\text{g/dL}$ (machos)



Los datos obtenidos en el equipo de ELISA nos dan los resultados en el eje-y (lineal) se refleja contra su concentración en el eje-x (logarítmico) logrando un ajuste con cobic spline, logrando obtener el dato en $\mu\text{g/dL}$

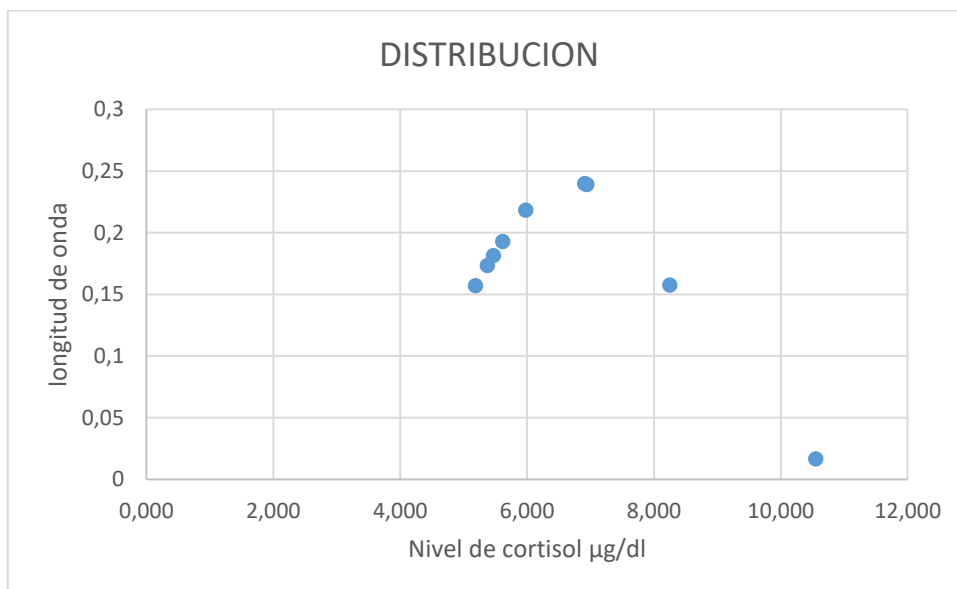
Para obtener los resultados de la absorbancia 450nm a $\mu\text{g/dL}$ en una hoja de cálculo de Microsoft Excel se obtuvo la ecuación de la siguiente gráfica de dispersión de líneas rectas y marcadores.

Figura 4. Dispersión de líneas rectas y marcadores. (Machos).



Una vez obtenido los datos en $\mu\text{g/dL}$ se realizó el análisis estadístico dando como resultados la siguiente tabla.

Figura 5. Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 100 felinos machos.



En la figura observamos la representación gráfica de la media de los niveles de cortisol $6.721 \mu\text{g/dL}$ y la desviación estándar 0.07 referente de datos obtenidos del plasma

de felinos 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 $\mu\text{g/dL}$. Este hecho, se debe a la forma acampanada y simétrica que posee su función de densidad, reconociendo una zona media, cóncava y con el valor medio de la función en su centro conformado por los elementos más comunes, y los valores menos frecuentes, en los extremos.

Tabla 8. *Niveles de cortisol: Machos*

Concentración de cortisol en $\mu\text{g/dL}$									
10,332	2,174	4,374	6,574	6,574	7,698	8,690	25,954	10,625	-0,523
3,140	3,649	8,959	9,515	5,198	9,163	6,514	9,335	3,602	0,733
10,565	8,406	4,692	5,976	4,593	6,821	16,216	10,811	0,025	1,329
5,992	3,166	8,080	7,354	5,331	6,554	5,943	0,687	9,335	-0,581
16,721	7,958	13,885	5,783	8,653	12,119	20,094	11,419	7,898	0,955
3,434	6,476	2,263	1,052	5,660	12,036	5,830	7,509	8,305	1,186
10,939	6,997	1,834	6,654	10,332	6,418	1,955	7,255	16,721	-0,020
5,345	6,437	5,798	7,482	12,931	1,074	3,449	5,146	7,840	0,635
2,215	5,198	2,374	3,427	12,119	16,381	5,146	13,336	7,042	2,093
5,527	5,291	6,146	6,864	7,840	9,562	1,104	6,181	5,428	0,763

4.1.1.2. Datos obtenidos en el análisis estadístico en machos.

Tabla 9. *Análisis estadístico en machos*

MACHOS	VALOR
Media	6,721
Rango	22,593
Mediana	6,250
Moda	10,332
Varianza	207,011
Desviación	14,388
Coeficiente	1,134

En la tabla se muestran los datos obtenidos en el análisis estadístico, obteniendo la media aritmética, rango, mediana, moda, varianza, desviación típica, y coeficiente de variación.

El rango de 22.593 en machos expresa la diferencia entre valor mínimo y máximo en cada variable de estudio.

La mediana de 6,250 en machos ocupa el lugar central cuando todos los datos que están ordenados de menor a mayor.

La moda de 10,332 en machos llega a ser un valor con mayor frecuencia absoluta de la investigación.

La varianza expresa el grado de dispersión de los datos con respecto a la media aritmética, por lo que en machos el resultado fue de 207.011 está concentrado a la media aritmética en cada variable.

La desviación típica brinda información sobre la dispersión media de una variable obteniendo en machos el valor de 14,388 expresa una concentración media con respecto a la media aritmética de cada variable.

El coeficiente de variación en machos es de 1,134 % de lo que nos da la confiabilidad de los datos en términos porcentuales.

4.1.1.3. Discusión

En la obtención de plasma de 100 machos felinos, se obtuvo una media de 6,721 $\mu\text{g/dL}$ llegando a estar dentro de los valores referenciales en mamíferos dada por Larry E. 2012, que tiene un rango de 4 a 16 $\mu\text{g/dL}$, dando por entender que los animales de estudio gozan de bienestar y buena salud en condiciones de altitud.

4.1.2. Datos de campo en Hembras.

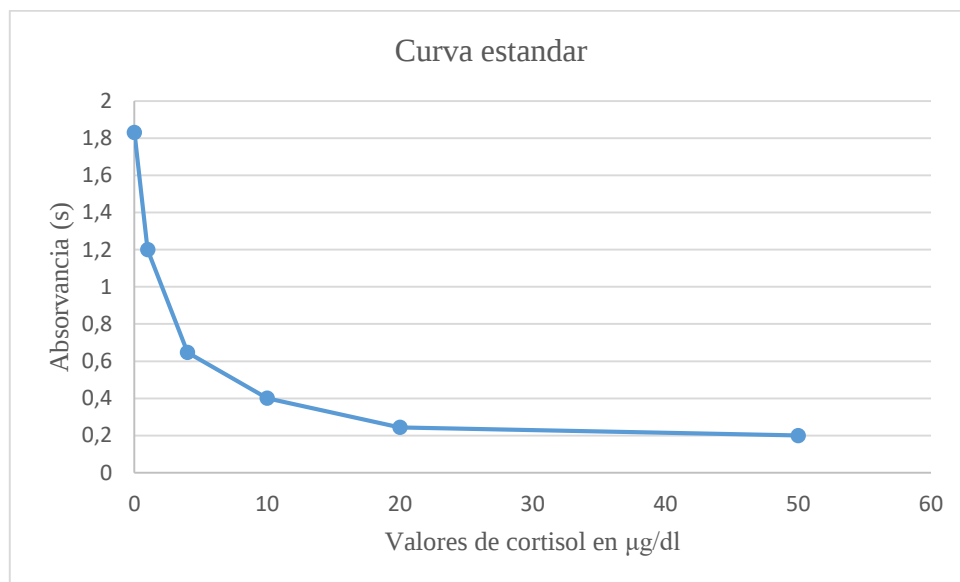
Luego del análisis del cortisol en plasma de felinos hembras obtuvimos las siguientes tablas:

Tabla 10. *Segunda placa de microtitulación analizadas en el Lector de Microplacas Elisa: absorbancia a 450nm: curva de absorbancia (6/6); plasma de felinos hembras (100/100).*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A	1,831	0,398	0,848	0,664	0,833	0,758	0,619	0,476	0,232	1,014	0,957	0,591	1,629	1,121
B	1,200	0,611	0,791	0,998	1,111	0,433	0,701	0,647	0,759	0,288	1,456	0,331	1,122	1,423
C	0,647	0,639	0,972	0,578	1,513	0,407	1,146	0,545	0,691	0,458	1,252	0,352	1,388	
D	0,401	0,647	0,582	0,648	0,562	0,717	0,356	0,635	1,222	0,643	0,897	0,599	1,434	
E	0,244	0,714	0,748	0,964	0,826	1,168	0,704	0,433	0,866	0,490	0,428	0,671	1,831	
F	0,200	0,551	0,673	0,376	0,427	0,483	0,530	0,659	0,406	0,622	0,484	0,602	1,357	
G	0,740	1,554	1,115	0,568	0,477	0,391	0,554	0,744	1,113	0,569	0,323	0,699	1,129	
H	0,766	0,573	0,750	0,638	0,595	0,647	0,646	1,078	0,279	0,381	0,464	0,867	1,845	

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

Figura 6. Curva estándar de los datos de absorbancia y valores de cortisol en $\mu\text{g/dL}$ (hembras).



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.

Figura 7. Dispersión de líneas rectas y marcadores. (Hembras)

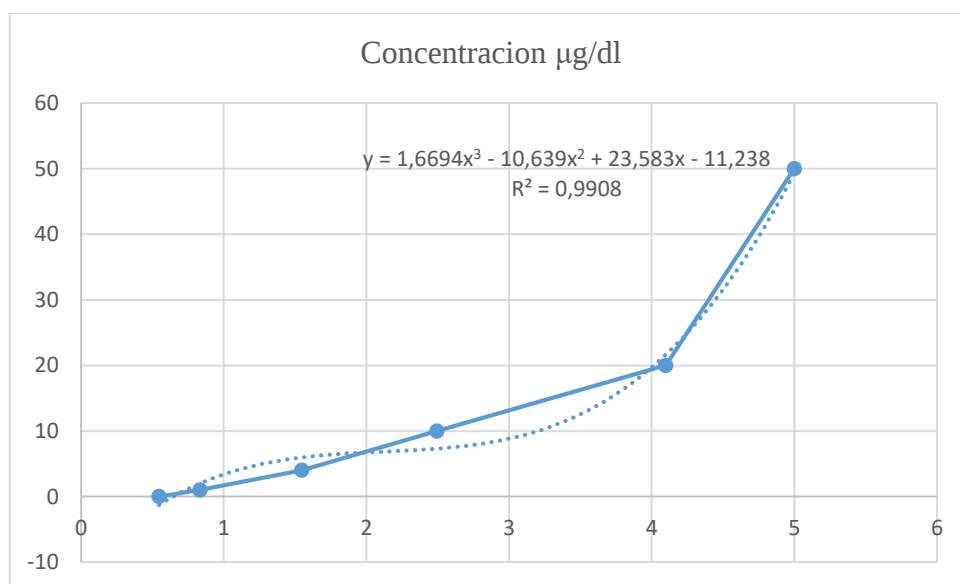
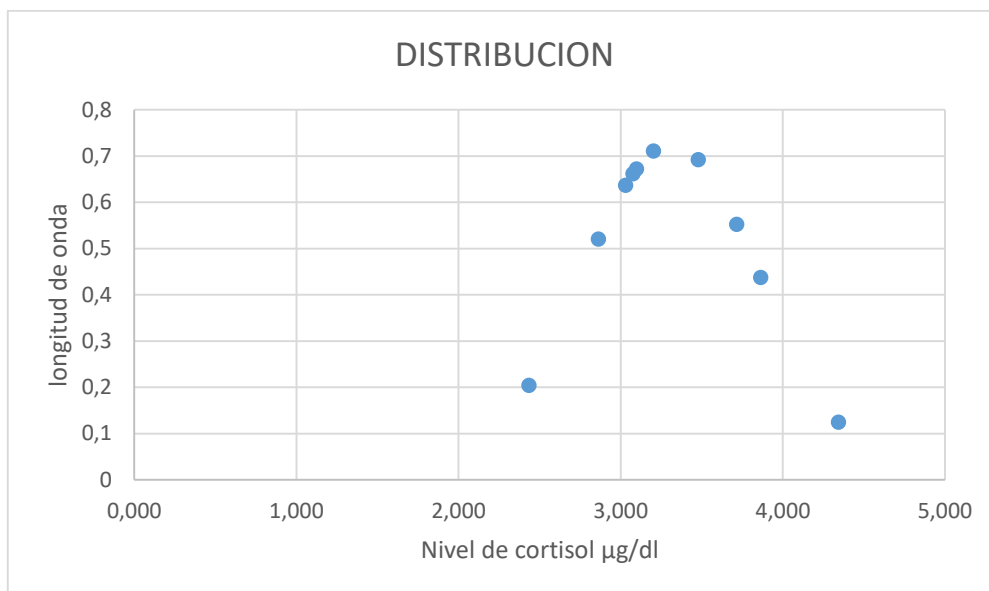


Figura 8. Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 100 felinos hembras.



En la figura observamos la representación gráfica de la media de los niveles de cortisol 6.721 µg/dL y la desviación estándar 0.55 referente de datos obtenidos del plasma de felinos 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 µg/dL. Este hecho, se debe a la forma acampanada y simétrica que posee su función de densidad, reconociendo una zona media, cóncava y con el valor medio de la función en su centro conformado por los elementos más comunes y los valores menos frecuentes, en los extremos.

Tabla 11. *Niveles de cortisol: Hembras*

Concentración de cortisol en µg/dL									
2,715	2,165	3,838	2,267	6,043	4,852	3,010	4,692	7,456	0,122
2,571	2,440	3,297	5,484	3,304	3,304	0,908	3,486	4,996	1,174
5,926	1,659	1,688	4,840	3,509	4,131	2,084	3,915	3,730	0,539
3,570	3,804	6,307	3,697	2,947	3,390	5,798	6,216	7,255	0,450
3,361	2,670	3,924	2,615	1,107	5,400	1,200	1,714	6,779	-0,151
3,304	3,126	3,369	5,400	6,695	3,221	8,841	0,409	3,665	0,602
2,867	1,194	2,234	5,783	2,928	2,692	1,511	0,835	3,140	1,154
4,076	2,659	1,206	2,849	4,274	1,305	8,510	1,951	3,641	-0,168
0,240	3,187	0,308	1,047	4,048	11,277	5,070	5,470	2,959	1,177
3,880	1,566	3,976	4,771	3,311	2,609	3,333	4,759	2,080	0,471

4.1.2.1. Datos obtenidos en el análisis estadístico en hembras.

Tabla 12. *Análisis estadístico en hembras*

HEMBRAS	VALOR
Media	3,310
Rango	8,627
Mediana	3,340
Moda	3,304
Varianza	7,161
Desviación	2,676
Coeficiente	0,873

En la tabla se muestran los datos obtenidos en el análisis estadístico, obteniendo la media aritmética, rango, mediana, moda, varianza, desviación típica, y coeficiente de variación.

El rango de 8.627 en hembras expresa la diferencia entre valor mínimo y máximo en cada variable de estudio.

La mediana 3,340 en hembras ocupan el lugar central cuando todos los datos que están ordenados de menor a mayor.

La moda 3,304 en hembras llega a ser un valor con mayor frecuencia absoluta de la investigación.

La varianza expresa el grado de dispersión de los datos con respecto a la media aritmética, por lo que en hembras tiene un valor de 7.161 lo cual demuestra una dispersión.

La desviación típica brinda información sobre la dispersión media de una variable obteniendo en hembras de 2,676 corroborando su dispersión.

El coeficiente de variación en hembras es 0,873 % de lo que nos da la confiabilidad de los datos en términos porcentuales.

4.1.2.2. Discusión

En gatas se obtuvo una media aritmética de 3,310 $\mu\text{g/dL}$ siendo poca la diferencia, es útil como dato referencial en felinos hembras en condiciones de altitud, dato que está por debajo de lo referencial que tiene un rango de 4 a 16 $\mu\text{g/dL}$, por lo que en esta investigación las condiciones de altitud influyen en el sexo hembra en dichos niveles de cortisol.

4.1.3. Media aritmética.

Realizando el análisis estadístico obtuvimos las medias en machos y hembras los cuales se encuentran en el siguiente cuadro.

Tabla 13. *Análisis de medias*

	Niveles de cortisol de esta investigación en $\mu\text{g/dL}$	EIA en $\mu\text{g/dL}$	Niveles de cortisol en mamíferos $\mu\text{g/dL}$
Machos	6.721	0.00027	4 – 16
Hembras	3.310	0.00027	4 – 16

Las medias obtenidas en machos son de 6.721 $\mu\text{g/dL}$ a estar dentro del rango de referencia de 4 a 16 $\mu\text{g/dL}$ según Larry E. (2012). y las medias obtenidas en hembras es de 3.310 por debajo de lo referencial, por lo que se podría valorar como un dato de referencia de cortisol en plasma de felinos en condiciones de altitud, dado por entendido que los animales están en un entorno de bienestar.

Según el departamento de patología animal facultad de veterinaria de Zaragoza en su investigación con la técnica de EIA (Enzimoimmunoensayo o ELISA) en plasma de gatos con una media de 27 ng/ml (0.00027 $\mu\text{g/dL}$), lo que en comparación es menor a los datos obtenidos en esta investigación, dando como aprobada la hipótesis alternativa planteada, dando a entender que en condiciones de altitud los valores de cortisol tienen una variación frente a los datos de referencia.

Según Grandin (1997). Explica que los niveles de cortisol son altamente variables y no se deberían hacer comparaciones absolutas entre distintos estudios.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1. Conclusión.

En esta investigación se determinó la concentración de cortisol con un promedio en machos de 6.721 μ g/dL que está dentro de los parámetros de referencia el cual varía entre 4 a 16 μ g/dL siendo un valor referencial y en hembras 3.310 μ g/dL dato por debajo de lo referencial en mamíferos lo cual es un valor útil y sirve como información científica para consultas en el laboratorio clínico veterinario ubicadas en zonas geográficamente de altitud para diagnósticos más certeros y para el médico tener mejores resultados con tratamientos adecuados.

La media aritmética en hembras tiene una disminución frente a los parámetros dado por Larry E. (2012), dando a conocer que la altitud influye en los resultados obtenidos en comparación con la referencia en mamíferos y los datos obtenidos del sexo hembra en los niveles de cortisol bajos en relación a los valores referenciales.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda realizar investigaciones en condiciones de altitud en especial de los distintos niveles de biomarcadores como hidrocortisona, glucosa, lactato, etc. Y también hacer más análisis del cortisol con distintos kits de fabricantes.

Clasificar en variables como edad, peso, sexo, raza, alimentación, hora del día, genética y felinos domésticos agresivos para investigar alguna alteración en los niveles de cortisol.

Realizar investigaciones de análisis del cortisol en felinos enteros y esterilizados tomando muestras semanas antes y después de dichas esterilizaciones, aconsejando de igual manera el análisis no más de 90 animales ya que cada kit para análisis de cortisol lleva 96 pocillos siendo los 6 pocillos sobrantes para el análisis de la curva de referencia dada por el kit, y así economizamos y ahorramos reactivo.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abyntek. (2019). *Tipos de ELISA*. Recuperado en: <http://www.abyntek.com/tipos-de-elisa/>
- AccuBind® Elisa. (2019). Cortisol Test System. Lake Forest, EE.UU. Monobind Inc.
- Álvarez, A., (2012). Fisiología del estrés. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia, 288-255. Recuperado de <https://biblioteca.ihatuey.cu/link/libros/veterinaria/fe.pdf>
- Álvarez, R., (2018). *Etología felina: Guía básica sobre el comportamiento de los gatos*. Zaragoza-España. Editorial Amazing Books. Recuperado de: <https://books.google.com.ec/books?id=khrLDwAAQBAJ&pg=PT23&dq=etologia+gato+domestico&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiw3LSgzKLpAhWimOAKHf-NC8UQ6AEILTAB#v=onepage&q&f=false>
- Álvarez, R & Medellín., (2005). Felissilvestris Schreber, 1775. *Instituto de Ecología*, Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado en: <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/exoticas/fichaexoticas/Felissilvestris00.pdf>
- Anduar, M., Gómez, C., y Matamoros, R., (2002). Hormonas de utilidad diagnostica en medicina veterinaria. *Archivos de medicina veterinaria*, 34 (2), 167-182. Recuperado de: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2002000200003#a81
- Arias, L & Rodríguez, C., (2005, Julio-diciembre). Validación y aplicación de la prueba de ELISA para medir cortisol fecal en jaguar (*panthera onca*) y puma (*Puma concolor*) durante un programa de enriquecimiento ambiental en el Zoológico Jaime Duque. *Revista de medicina veterinaria*, volumen (10), 53-64. Recuperado en: [file:///C:/Users/Hp/Downloads/Dialnet-ValidacionYAplicacionDeLaPruebaELISAParaMedirCorti-4943894%20\(9\).pdf](file:///C:/Users/Hp/Downloads/Dialnet-ValidacionYAplicacionDeLaPruebaELISAParaMedirCorti-4943894%20(9).pdf)

- Baciero, G., (2017). *El estrés en el gato*. Madrid- España: Editorial Royal Cannin Ibérica, S.A. Recuperado de:
http://axonveterinaria.net/web_axoncomunicacion/auxiliaveterinario/21/AV21_Estres_gato.pdf
- Beneanula, D., (2010). *Determinación de inmunoglobulina A en suero sanguíneo por los métodos de inmunodifusión radial y ELISA cuantitativo indirecto en niños de edad escolar*. (Tesis de titulación). Universidad de Cuenca
- Buestàn, D., (2011). *Fisiología del estrés y sus efectos sobre la reproducción de la hembra bovina*. (Monografía de grado). Universidad de Cuenca.
- Berdiansk, S., (2014). *La naturaleza de los gatos*. Estados Unidos: Ediciones Paidós Ibérica. Recuperado de: <https://pdflibre.com/8449313813/La-naturaleza-de-los-gatos-Or%C3%ADgenes-inteligencia-comportamiento-y-astucia-del-Felis-Silvestris-Catus>
- Buñay, T., (2019). *Diagnòstico comparative de moquillo en caninos (Canis lupus familiaris) machos y hembras mediante la técnica ELISA cuantitativa y ELISA cuantitativa*. (Tesis de titulación). Universidad Politécnica Salesiana.
- Bradshaw, J., (2015). *En la mente de un gato*. Barcelona, España: Editorial RBA Libros. Recuperado en:
https://books.google.com.ec/books?id=ST_ODwAAQBAJ&pg=PT45&dq=gato+domestico+definici%C3%B3n&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwj4fnHmM7tAhXCo1kKHfQFDP4Q6AEwAXoECAIQAg#v=onepage&q=gato%20domestico%20definici%C3%B3n&f=false

Brousset, D., Galindo, F., Romano, M., Schuneman, A., & Valdez, R., (2005, mayo).

Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres.

Veterinaria México, volumen (36), 325-337. Recuperado en:

<https://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-2005/vm053h.pdf>

Cardozo, C y Osorio, A., (2008). Una actitud responsable y respetuosa del investigador con

rigor y calidad científica. *Bicetica*, 8, (2), 46-71. Recuperado

en:<http://www.scielo.org.co/pdf/rlb/v8n2/v8n2a06.pdf>

Castiñeiras., M., & Queraltó., J., (1997). Bioquímica clínica y patología molecular. *X*

Fuentes Arderiu, 2 (2), 585-1079. Recuperado

en:https://books.google.com.ec/books?id=nM8ED6gYou0C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbg_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Carreño, A., Casanova, P., Díaz, K., y Granados, R., (2018). Crecimiento del gato

doméstico mediante un modelo logístico. *Rev. inv. Vet Perú*, 29 (4), 1112-1128.

Recuperado de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v29n4/a05v29n4.pdf>

Chiappe, A., Dantin, A., & Mazzini, E., (2016). Fisiopatología del hiperadrenocorticismo

en felinos presentación de caso clínico. *R C C V*, volumen (1), 35-52. Recuperado

en: [file:///C:/Users/Hp/Downloads/52274-Texto%20del%20art%C3%ADculo-96734-2-10-20160407%20\(6\).pdf](file:///C:/Users/Hp/Downloads/52274-Texto%20del%20art%C3%ADculo-96734-2-10-20160407%20(6).pdf)

Chacón, G., Et al., (2005). Utilidad de la determinación de cortisol en diferentes muestras

biológicas. *Laboratorial*, volumen (121), 69-78. Recuperado de

https://www.researchgate.net/publication/260164084_Utilidad_de_la_determinacion_de_cortisol_en_diferentes_muestras_biologicas

- Coello, D. (2012). Técnica de Elisa (Enzyme Linked immunoabsorbent assay) Método de Elisa y micro Elisa. Escuela Superior Politécnica del Litoral definiciones médicas. Recuperado de <https://www.slideshare.net/dicoello/metodo-de-elisa-y-microelisa>
- Cultek. (2006). Soluciones Elisa protocolo y técnicas. Recuperado de <https://es.slideshare.net/luissandorodri/soluciones-elisaprotocolos>
- Fernández, S., (2008). *Hiperadrenocorticismo en felinos* (tesis de grado). Universidad de la República. Uruguay.
- Fernández, M & García, C., (2019). *Respuestas comportamentales y fisiológicas en situaciones de estrés en el perro y el gato*. (tesis de doctorado). Universidad autónoma de Barcelona, Bellaterra, España
- Gómez., S., et al., (1994). *La inmunología en el diagnóstico clínico*. Santafé de Bogotá, Colombia: Editorial Javeriano CEJA. Recuperado en: https://books.google.com.ec/books?id=R3Hn3NMt0zsC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- León., I., (2019). *ELISA: ¿Qué es? ¿en qué consiste? ¿Cuáles son los distintos tipos de este ensayo y en qué se diferencian*. Recuperado en: <https://www.e-allscience.com/blogs/news/elisa-que-es-en-que-consiste-cuales-son-los-distintos-tipos-de-este-ensayo-y-en-que-se-diferencian>
- Maidana, P., Bruno, O., & Mesch, V, (2013). Medición de cortisol y sus fracciones una puesta al día. *Medicina Buenos Aires*; 73, (6), 579-584. Recuperado de http://medicinabuenosaires.com/revistas/vol73-13/6/579-584-MED6038_MAIDANA.pdf

Marín, J., y Iturbe, T., (2019). Manual de prácticas de medicina para gatos. México. Ed.

Wiley Blackwell. Recuperado de:

https://fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/manuales_2013/Manual%20de%20Practicas%20de%20Gatos.pdf

Mercadillo, P., Ríos, M., Ríos., J., & Yuil de Ríos., E., (2012). ELISA y sus aplicaciones en dermatología. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica. Volumen 10*, (3),

212-222. Recuperado en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2012/dcm123j.pdf>

Ochoa, R. (2012). *Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos*. Finlay ediciones. La Habana.

Prieto, Eva., (2018). Bajo estrés en clínica felina. *Psychologia Latina*, 1, 373-376.

Recuperado de: <https://psicologia.ucm.es/data/cont/docs/29-2019-02-15-Prieto.pdf>

Rojas., O., (2006). *Inmunología (de memoria)*. México: Editorial Panamericana.

Recuperado en: [https://books.google.com.ec/books?id=CtWACreo-](https://books.google.com.ec/books?id=CtWACreo-BkC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbg_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

[BkC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbg_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=CtWACreo-BkC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbg_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

Roldán, W., (2016). Hiperadrenocorticismo felino. *ResearchGate*, volumen (44), 19-23.

Recuperado en:

https://www.researchgate.net/publication/317659961_Hiperadrenocorticismo_felino

Ruiz, G., Espada, I & Peñalba, B., (2003). *Medicina interna de pequeños animales*.

España-Barcelona; Editorial MATERIALS. Recuperado en

[cas.ups.edu.ec/sso/login?service=https://portal.ups.edu.ec/c/portal/login&service=h](https://portal.ups.edu.ec/c/portal/login&service=https://portal.ups.edu.ec/c/portal/login&service=https://portal.ups.edu.ec/c/portal/login)
[ttps%3A%2F%2Fportal.ups.edu.ec%2Fportal%2Flogin](https://portal.ups.edu.ec/c/portal/login)

Suárez, I., (2017). *Metodología ELISA para estudiar la estabilidad de medicamentos biotecnológicos*. (Tesis doctoral). Universidad de Granada.

Stanchi, N., (2010). *Microbiología Veterinaria*. Buenos Aires: Editorial Intermédica.

Recuperado

en: https://www.academia.edu/37283154/Stanchi_Microbiologia_Veterinaria

Tizard, I., (2009). *Inmunología Veterinaria*. Madrid, España: Editorial Elsevier.

Recuperado

en: https://www.academia.edu/35951470/Inmunologia_Veterinaria_Tizard_pdf

Villela, F., (2019). Consideraciones éticas sobre el uso de animales no humanos en investigación. *Bioética*, 14 (1), 2-25. Recuperado

en: https://www.researchgate.net/publication/333839072_CONSIDERACIONES_ETICAS SOBRE_EL_USO_DE_ANIMALES_NO_HUMANOS_EN_INVESTIGACION

Uranovet., (2019). *Hipoadrenocorticismo*. Recuperado de:

<https://www.uranovet.com/es/uranolab/fichas-clinicas-veterinarias/hipoadrenocorticismo>

Urse., J., (2016). *Control de calidad de vacunas de uso en animales de producción*. (Tesis de grado). Universidad de la República Uruguay.

7. ANEXOS

7.1. Datos obtenidos en esta investigación.

Tabla de datos obtenidos en el lector de microplacas: absorbancia a 450nm. Felinos machos y hembras.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A	2,112	0,243	0,846	0,448	0,926	0,407	0,499	0,314	0,185	0,896	0,230	1,696	2,191	0,864
B	1,494	0,394	0,601	0,441	0,406	1,166	0,438	0,271	0,262	0,627	0,321	0,267	1,296	1,283
C	0,802	0,183	0,291	0,520	0,804	0,358	0,284	0,350	0,283	0,452	0,331	0,307	1,070	
D	0,442	0,629	0,667	0,276	0,385	0,322	0,415	0,363	0,365	1,147	0,452	0,294	2,259	
E	0,310	0,237	0,305	0,490	0,362	0,630	0,247	0,221	0,186	0,149	0,208	0,183	1,203	
F	0,203	0,437	0,367	0,301	0,263	0,348	0,212	0,222	0,397	0,267	0,383	0,309	1,118	
G	0,247	0,837	0,342	0,203	0,395	0,362	0,221	0,370	0,167	0,239	0,242	0,340	1,729	
H	0,671	0,424	0,369	0,827	0,327	0,448	0,309	1,158	0,404	1,317	0,607	0,431	1,341	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A	1,831	0,398	0,848	0,664	0,833	0,758	0,619	0,476	0,232	1,014	0,957	0,591	1,629	1,121
B	1,200	0,611	0,791	0,998	1,111	0,433	0,701	0,647	0,759	0,288	1,456	0,331	1,122	1,423
C	0,647	0,639	0,972	0,578	1,513	0,407	1,146	0,545	0,691	0,458	1,252	0,352	1,388	
D	0,401	0,647	0,582	0,648	0,562	0,717	0,356	0,635	1,222	0,643	0,897	0,599	1,434	
E	0,244	0,714	0,748	0,964	0,826	1,168	0,704	0,433	0,866	0,490	0,428	0,671	1,831	
F	0,200	0,551	0,673	0,376	0,427	0,483	0,530	0,659	0,406	0,622	0,484	0,602	1,357	
G	0,740	1,554	1,115	0,568	0,477	0,391	0,554	0,744	1,113	0,569	0,323	0,699	1,129	
H	0,766	0,573	0,750	0,638	0,595	0,647	0,646	1,078	0,279	0,381	0,464	0,867	1,845	

Tabla de cortisol: felinos machos

Concentración de cortisol en µg/dL									
10,332	2,174	4,374	6,574	6,574	7,698	8,690	25,954	10,625	-0,523
3,140	3,649	8,959	9,515	5,198	9,163	6,514	9,335	3,602	0,733
10,565	8,406	4,692	5,976	4,593	6,821	16,216	10,811	0,025	1,329
5,992	3,166	8,080	7,354	5,331	6,554	5,943	0,687	9,335	-0,581
16,721	7,958	13,885	5,783	8,653	12,119	20,094	11,419	7,898	0,955
3,434	6,476	2,263	1,052	5,660	12,036	5,830	7,509	8,305	1,186
10,939	6,997	1,834	6,654	10,332	6,418	1,955	7,255	16,721	-0,020
5,345	6,437	5,798	7,482	12,931	1,074	3,449	5,146	7,840	0,635
2,215	5,198	2,374	3,427	12,119	16,381	5,146	13,336	7,042	2,093
5,527	5,291	6,146	6,864	7,840	9,562	1,104	6,181	5,428	0,763

Tabla de cortisol: felinos hembras

Concentración de cortisol en µg/dl									
2,715	2,165	3,838	2,267	6,043	4,852	3,010	4,692	7,456	0,122
2,571	2,440	3,297	5,484	3,304	3,304	0,908	3,486	4,996	1,174
5,926	1,659	1,688	4,840	3,509	4,131	2,084	3,915	3,730	0,539
3,570	3,804	6,307	3,697	2,947	3,390	5,798	6,216	7,255	0,450
3,361	2,670	3,924	2,615	1,107	5,400	1,200	1,714	6,779	-0,151
3,304	3,126	3,369	5,400	6,695	3,221	8,841	0,409	3,665	0,602
2,867	1,194	2,234	5,783	2,928	2,692	1,511	0,835	3,140	1,154
4,076	2,659	1,206	2,849	4,274	1,305	8,510	1,951	3,641	-0,168
0,240	3,187	0,308	1,047	4,048	11,277	5,070	5,470	2,959	1,177
3,880	1,566	3,976	4,771	3,311	2,609	3,333	4,759	2,080	0,471

7.2. Fotos

Foto 1. Muestras de plasma de 200 animales 100 hembras 100 machos

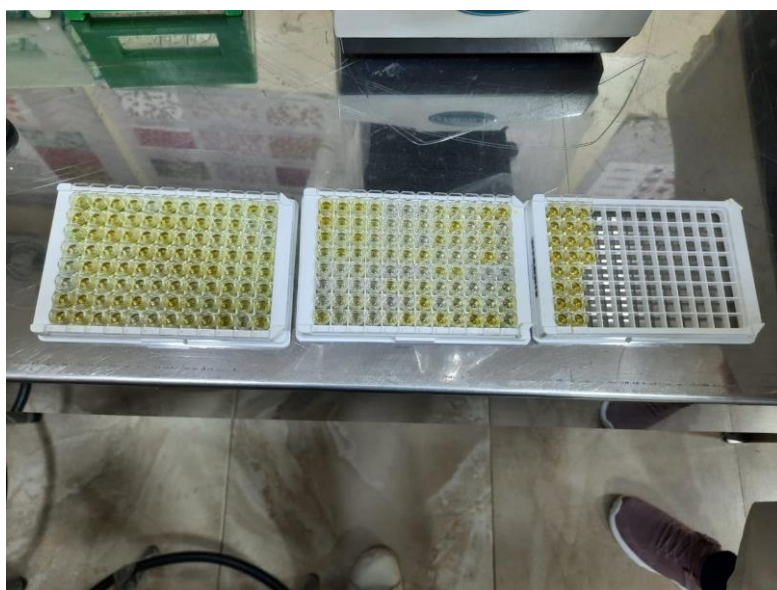


Foto 2. Dos kits de elisa para cortisol.



Foto 3. Pipeteo de cada muestra de plasma en posillos.

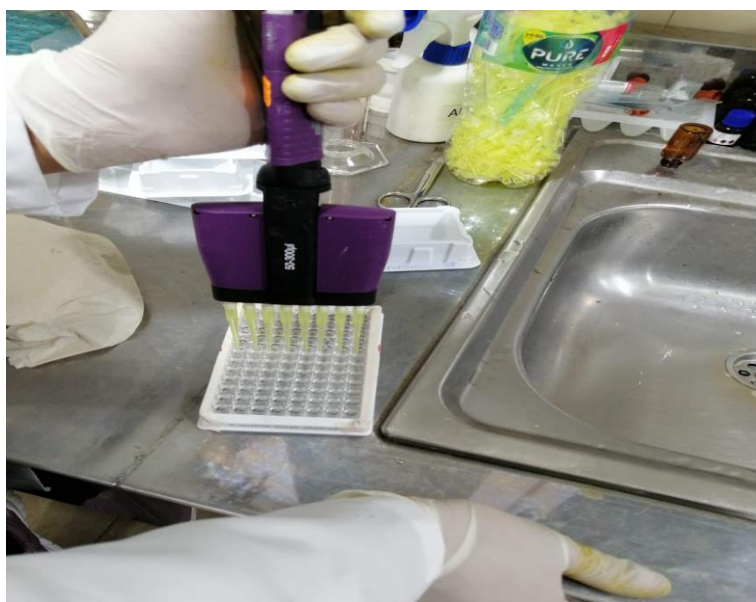


Foto 4. Material de laboratorio



Foto 5. Incubación de 60 minutos con control de biotina.



Foto 6. Lector de microplacas se lee la absorbancia a 450nm.

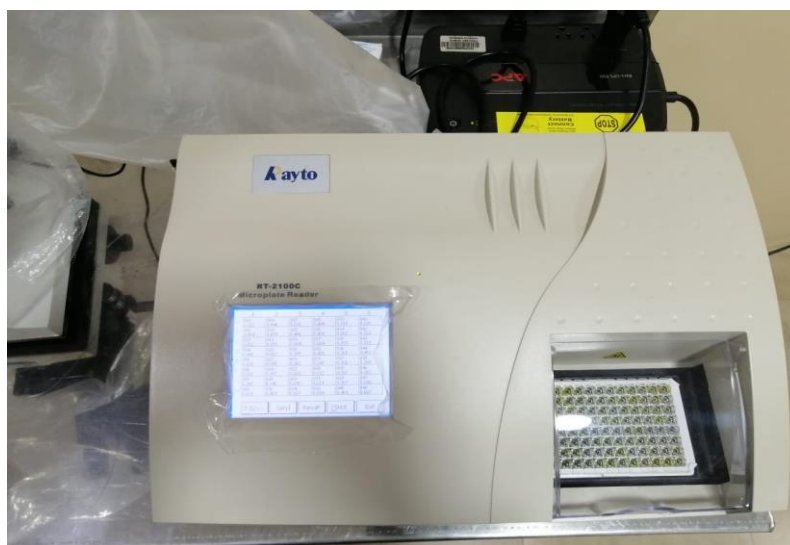


Foto 7. Placa con los primeros datos en 450 nm de absorbancia en plasma de machos.

	1	2	3	4	5	6
A	001 2.112	009 0.846	017 0.926	025 0.499	033 0.185	041 0.230
B	002 1.494	010 0.601	018 0.406	026 0.438	034 0.262	042 0.321
C	003 0.802	011 0.291	019 0.804	027 0.284	035 0.283	043 0.331
D	004 0.442	012 0.667	020 0.385	028 0.415	036 0.365	044 0.452
E	005 0.310	013 0.305	021 0.362	029 0.247	037 0.186	045 0.208
F	006 0.203	014 0.367	022 0.263	030 0.212	038 0.397	046 0.383
G	007 0.247	015 0.342	023 0.395	031 0.221	039 0.167	047 0.242
H	008 0.671	016 0.369	024 0.327	032 0.309	040 0.404	048 0.607

7-12>> Send Result Print Exit

Foto 8. Placa con los primeros datos en 450 nm de absorbancia en plasma de hembras.

	1	2	3	4	5	6
A	001 1.831	009 0.848	017 0.833	025 0.619	033 0.232	041 0.957
B	002 1.200	010 0.791	018 1.111	026 0.701	034 0.759	042 1.456
C	003 0.647	011 0.972	019 1.513	027 1.146	035 0.691	043 1.252
D	004 0.401	012 0.582	020 0.562	028 0.356	036 1.222	044 0.897
E	005 0.244	013 0.748	021 0.826	029 0.704	037 0.866	045 0.428
F	006 0.200	014 0.673	022 0.427	030 0.530	038 0.406	046 0.484
G	007 0.740	015 1.115	023 0.477	031 0.554	039 1.113	047 0.323
H	008 0.766	016 0.750	024 0.595	032 0.646	040 0.279	048 0.464

7-12>> Send Result Print Exit