



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“DETERMINACIÓN DE NIVELES DE CORTISOL EN OVINOS “*Ovis aries*”
APARENTEMENTE SANOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA
CUANTITATIVA A CONDICIONES DE ALTITUD”

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

AUTOR: DANIEL RICARDO LAZO PAGUAY

TUTOR: DR. JUAN LEONARDO MASACHE MASACHE, MGTR.

Cuenca - Ecuador

2023

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

Yo, Daniel Ricardo Lazo Paguay con documento de identificación N° 0105904221,
manifiesto que:

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

Cuenca, 6 de junio del 2023

Atentamente,



Daniel Ricardo Lazo Paguay

0105904221

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

Yo, Daniel Ricardo Lazo Paguay con documento de identificación N° 0105904221, 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: “Determinación de niveles de cortisol en ovinos “*Ovis aries*” aparentemente sanos mediante la técnica de ELISA cuantitativa a condiciones de altitud”, el cual 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 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, 6 de junio del 2023

Atentamente,



Daniel Ricardo Lazo Paguay

0105904221

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Juan Leonardo Masache Masache con documento de identificación N° 1103109003, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “DETERMINACIÓN DE NIVELES DE CORTISOL EN OVINOS “*Ovis aries*” APARENTEMENTE SANOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA CUANTITATIVA A CONDICIONES DE ALTITUD”, realizado por Daniel Ricardo Lazo Paguay con documento de identificación N° 0105904221, obtenido 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, 6 junio del 2023

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'J. Masache', with a horizontal line drawn below it.

Dr. Juan Leonardo Masache Masache, Mgtr.

1103109003

DEDICATORIA

El siguiente trabajo quiero agradecer a mi Madre y a mi Tío por haber siempre haber creído en mí, al Equipo Veterinario de la Clínica Veterinaria Austrovet por haberme formado en esta hermosa carrera de la Medicina veterinaria de pequeñas especies, y a mis amigos que he formado durante esta el lapso de esta carrera.

AGRADECIMIENTO

Agradezco especialmente a mí por haber sido perseverante y poder alcanzar el objetivo planteado que siempre he deseado, además a mi padre, aunque ya no se encuentre aquí le agradezco mucho por la ayuda durante mi estancia en la universidad, a mi madre por toda la ayuda puesta sobre mí y en gran parte especial mi Tío Jaime Lazo por estar siempre ayudándome con su ejemplo y su enseñanza.

ÍNDICE

RESUMEN	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1 Problema.....	15
1.1 Delimitación.....	15
1.2.1 Temporal.....	15
1.2.2. Espacial.....	15
1.2.3. Académica	16
1.2 Explicación del Problema	16
1.4 Objetivos.....	17
1.4.1 Objetivo General.....	17
1.4.2. Objetivos Específicos.....	17
1.5 Hipótesis	17
1.5.1. Hipótesis Alternativa.....	17
1.5.2. Hipótesis Nula.....	17
1.6. Fundamentación Teórica.....	18
2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO DOCUMENTAL.....	19
2.1 Origen e Historia de los Ovinos.....	19
2.2 Clasificación Taxonómica	19
2.3. Glándulas Suprarrenales	21
2.3.1. Definición de ACTH.....	21
2.3.2 Definición de la CRH.....	22
2.4. Transporte de Cortisol en la Sangre.....	22
2.5 Cortisol.....	23
2.5.1 Definición	23
2.5.2. Función del Cortisol.....	23

2.5.3	Secreción de glucocorticoides	24
2.5.4.	Metabolismo de Cortisol.....	24
2.5.5	Valor de Cortisol en Ovinos	25
2.5.6.	Acciones de Cortisol.....	25
2.6	Regulación de la secreción de cortisol: Eje Hipotalamo-Hipofisis- Adrenal	26
2.7	Ritmo Circadiano y Ritmo Ultradiano del cortisol.....	27
2.7.1	Estrés.....	27
2.7.2.	Definición de Estrés.....	27
2.7.3.	El estrés en Ovinos	28
2.7.4	Medición del estrés inmediato	29
2.8.	Efectos Metabólicos.....	30
2.8.1	Fisiopatología del Estrés	30
2.8.2	Indicadores de Estrés	31
2.9.	Tipos y Técnicas de Elisa.	31
2.9.1	Técnica de ELISA.....	31
2.9.2	Elisa Cuantitativa.....	31
2.9.3	Tipos de Elisa.....	32
2.9.3.1	ELISA Directo	32
2.9.3.2	ELISA Indirecto.....	32
2.9.3.3	ELISA Competitivo	32
2.9.3.4	ELISA Sándwich.	32
2.9.4	Cortisol Accubind Elisa – IFU Rev 4	33
2.9.5	Adsorción.....	34
2.9.5.	Unión y Lavados	35
2.9.6.	Tiempos de incubación y temperatura	35
2.9.7.	Enzimas y sustratos.....	35

2.9.8 Anticuerpos y Antígenos Empleados.....	35
2.9.9 Detectores.	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.1 Materiales.....	37
3.1.1. Físicos	37
3.1.2. Biológicos	38
3.1.3. Recursos Humanos.	38
3.1.4. Recursos Químicos.	39
3.2. Método.....	40
3.3. Diseño Estadístico.....	40
3.4. Población y muestra.....	40
3.5. Obtención de la Muestras.	41
3.6. Procedimiento para realizar la prueba de cortisol.....	41
3.7. Operacionalización de Variables.	43
3.7.1. Variables Independientes.....	43
3.7.2. Variables Dependientes.	43
3.8. Toma y Registro de datos.	44
3.9. Consideraciones Éticas.	44
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	45
4.1 Resultados.....	45
4.1.1 Valores de Cortisol en Machos	46
4.1.1.2. Datos Obtenidos en el análisis estadístico en Machos.....	49
4.1.1.3 Discusión.	51
4.1.2. Valores de Cortisol en Hembras.	52

4.1.2.1. Datos Obtenidos en el análisis estadístico en ovinas hembras.	55
4.1.2.2 Discusión.	56
4.1.3 Media aritmética.	56
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	58
5.1 Conclusión.	58
5.2. Recomendaciones.	58
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	59
7. ANEXOS	64
7.1. Datos Obtenidos en esta investigación.	64
7.2. Fotos.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Mapa de la ciudad de Cuenca y sus parroquias.....	16
Figura 2. Ecuación de Inmunoensayo enzimático Competitivo	33
Figura 3. Curva Estándar de los valores de cortisol en ug/DL.....	46
Figura 4. Dispersión de líneas rectas y Marcadores.....	47
Figura 5. Distribución Normal de los datos obtenidos de 100 ovinos machos.....	48
Figura 6. Curva Estándar de los datos de valores de cortisol en ug/DL.....	52
Figura 7. Dispersión de Líneas rectas y Marcadores (Hembras).....	53
Figura 8. Distribución normal de datos obtenidos de 100 ovinas Hembras.....	53

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Materiales Físicos.....	37
Tabla 2. Materiales Biológicos.....	38
Tabla 3. Recursos Humanos.....	38
Tabla 4. Recursos Químicos.....	39
Tabla 5. Variables Independientes Suero.....	43
Tabla 6. Variables Dependiente Reactivo.....	43
Tabla 7. Registro de la absorbancia del lector de micro placas.....	45
Tabla 8. Primera placa de micro titulación de Mirco placas Elisa ovinos machos...	46
Tabla 9. Niveles de Cortisol Machos.....	49
Tabla 10. Análisis Estadístico en Machos.....	50
Tabla 11. Segunda placa de micro titulacion de Micro placas ovinos hembras.....	52
Tabla 12. Niveles de Cortisol Hembras.....	54
Tabla 13. Análisis Estadístico en Hembras.....	55
Tabla 14. Análisis de Medias en Ovinos machos y hembras.....	57

RESUMEN

En la ciudad de Cuenca se realizó la valoración de los niveles de cortisol en ovinos (*Ovis aries*) aparentemente sanos mediante la técnica de ELISA cuantitativa, cuya práctica se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología propiedad de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede-Cuenca. Se utilizaron 200 ovejas, 100 machos y 100 hembras respectivamente. Para su 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. En el inmunoensayo enzimático competitivo se utilizó reactivos que incluyen anticuerpo conjugado enzima-antígeno y antígeno nativo. Posteriormente usando suero de concentración de antígeno conocida, se generó una curva de respuestas a la dosis y se pudo determinar la concentración de antígeno en el cual se obtuvo una curva de respuestas. Por el cual el equipo Lector de Micro placas ELISA en absorbancia a 450nm cuyos resultados fueron calculados utilizando la curva de referencia de suero, que encontró el punto de intersección de 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 ovinos Machos de 1,973 ug/dL y de ovinas hembras 1,828 ug/dL siendo un valor de referencia útil en laboratorios clínicos veterinarios.

ABSTRACT

In the city of Cuenca, cortisol levels were assessed in apparently healthy sheep (*Ovis aries*) using the quantitative ELISA technique, which practice was carried out in the Biotechnology laboratory owned by the Salesian Polytechnic University, Headquarters-Cuenca. . 200 sheep, 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. The basic statistical analysis that determined the mean, median, mode, range, variance, deviation and coefficient of variation was carried out. In the competitive enzyme immunoassay, reagents including enzyme-antigen conjugate antibody and native antigen were used. Subsequently using serum of known antigen concentration, a dose response curve was generated and the antigen concentration at which a response curve was obtained could be determined. By which the ELISA Microplate Reader equipment in absorbance at 450nm whose results were calculated using the serum reference curve, which found the intersection point of the curve and obtaining a cortisol concentration in micrograms per deciliter (ug/dL).

In this study, a mean cortisol concentration in blood plasma was obtained in male sheep of 1.973 ug/dL and 1.828 ug/dL in female sheep, being a useful reference value in veterinary clinical laboratories.

1. INTRODUCCIÓN.

El cortisol es una hormona esteroidea, (glucocorticoide o corticosteroide) producida por la glándula suprarrenal, es importante ya que ayuda a controlar el estrés, reduce la inflamación y ayuda con el funcionamiento del sistema inmune a que pueda metabolizar los carbohidratos, grasas y proteínas. Los niveles de cortisol y algunos neurotransmisores como la serotonina se relacionan con la actividad diaria es decir sus valores van aumentar en la mañana y estos así mismo van disminuyendo a lo largo del día.

Por tanto, a toda especie animal en el ámbito de producción; el estrés tiene consecuencias en diferentes sistemas y funciones del organismo ya que afecta a las situaciones que intervienen en los sistemas de producción de lana y algunos de problemas de calidad en los cortes valiosos de carne esto entre los aspectos más destacables. Además, se mantiene una vigencia en comprender los fenómenos que afectan el desempeño animal en ya que existen dos visiones del bienestar animal y de la productividad.

El análisis de cortisol que se va realizar mediante la prueba de ELISA cuantitativo se ha puesto como apoyo para la detención de entidades patológicas y que permitiría al veterinario analizar y localizar la enfermedad sospechada. Por ende, el presente trabajo de investigación nos permitirá cuantificar los niveles de cortisol en el suero de ovinos "*Ovis aries*".

1.1 Problema.

En Ecuador en la provincia del Azuay todavía no se encuentra valores que sean referenciales respecto a los niveles de cortisol en Ovinos tomando en cuenta que existe factores y condiciones de la edad, altura, estado de producción por lo cual esto genera alteraciones en laboratorio.

El análisis del cortisol sérico es uno de los métodos de diagnóstico que tiene a mano el médico veterinario y que se ha impuesto como un apoyo para la detección de los trastornos metabólicos. Por tanto, el cortisol como biomarcador del estrés es un término que se refiere al estado del paciente en condiciones de su entorno de bienestar si está sano cómodo con una buena condición corporal y buenas actitudes de comportamiento y si no padece de dolor o miedo.

1.1 Delimitación.

1.2.1 Temporal.

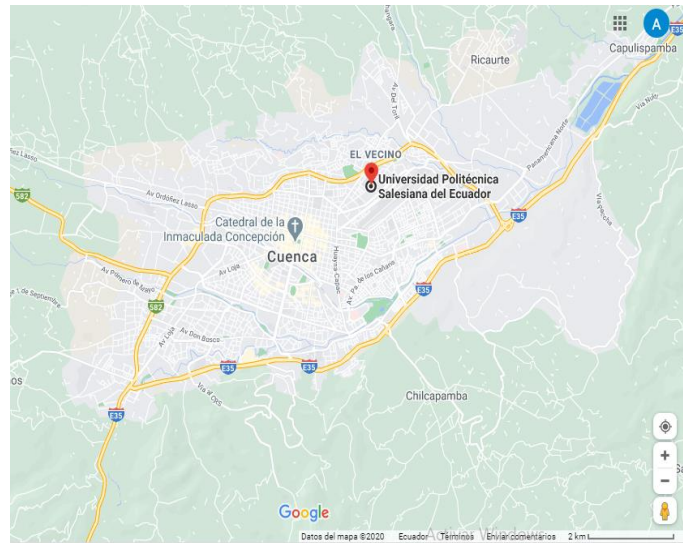
La vigente investigación tendrá una duración de tiempo de 400 horas, distribuidas en el proceso experimental y redacción del documento final.

1.2.2. Espacial.

El trabajo de investigación y evaluación se realizó en Cuenca en condiciones de altitud de 2550msnm, en el laboratorio de CIENCIAS DE LA VIDA 2 de la Universidad Politécnica Salesiana, empleando muestras sanguíneas las cuales obtuvimos de las diferentes Cantones ubicadas en los sectores; Del Valle, Cumbe, Sigsig, Gualaceo, Tarqui de la Ciudad de Cuenca.

Provincia: Azuay

Figura 1. Mapa de la ciudad de Cuenca y sus parroquias.



Fuente: Google Maps.

1.2.3. Académica

La presente propuesta investigativa cubre el área de Laboratorio Clínico, la cual será aplicado a la especie de Ovinos "*Ovis aries*", obteniéndose valores de referencia óptimos para mejorar la interpretación de los resultados de laboratorio tanto estudiantes y Médicos Veterinarios en la zona.

1.2 Explicación del Problema

Esta investigación tiene la finalidad de obtener valores de los niveles de cortisol en ovinos "*Ovis aries*" aparentemente sanos, mediante la utilización de la técnica de 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 lo cual 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 del 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 ende se pretende determinar si mediante la prueba de Elisa cuantitativa nos indicara los valores de los niveles de cortisol en la especie mencionada.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General.

Valoración de los niveles de cortisol en Ovinos (*Ovis aries*) aparentemente sanos mediante la técnica de ELISA CUANTITATIVA a condiciones de altitud.

1.4.2. Objetivos Específicos.

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

Evaluar la relación de los niveles de cortisol y estrés en los Ovinos.

Obtener valores referenciales de cortisol sanguíneo en Ovinos.

1.5 Hipótesis

1.5.1. Hipótesis Alternativa.

Los Resultados de los niveles de cortisol Ovinos (*Ovis aries*), aparentemente sanos obtenidos en la investigación, varían de los valores referenciales.

1.5.2. Hipótesis Nula.

Los resultados de los niveles de cortisol en Ovinos (*Ovis aries*), aparentemente sanos obtenidos en la investigación, no varían de los valores referenciales.

1.6. Fundamentación Teórica.

La actual investigación va a tener como fundamentos principales obtener valores referenciales en los niveles de cortisol en ovinos hembras y machos de las zonas geográficas de altitud por la cual podremos obtener resultados de laboratorios y diagnósticos más precisos.

Hoy en día los análisis de laboratorio son muy utilizados por los médicos veterinarios como una herramienta que es necesaria de trabajo para poder establecer un diagnóstico más confiable y administrar un tratamiento farmacológico eficaz al paciente.

Tomando en cuenta que esta investigación servirá como información científica para consultas en el área de laboratorio clínico veterinario.

2. REVISIÒN Y ANÀLISIS BIBLIOGRÀFICO DOCUMENTAL

2.1 Origen e Historia de los Ovinos.

En cuanto al origen e historia de los ovinos (Deng et al., (2020) menciona que la domesticación y posterior dispersión mundial de las ovejas es un acontecimiento importante en la historia de la humanidad, pero la migración histórica del ganado sigue estando poco documentada. Se han identificado cuatro tipos diferentes de ovejas domésticas y se ha resuelto su origen y diferenciación de sementales a escala mundial. Entre las razas nórdicas, algunas de las cuales conservan características originales (como el pequeño tamaño y la cola corta o fina), las pruebas arqueológicas y los registros históricos sugieren que la primera expansión de las primeras ovejas domésticas de lana y la posterior expansión de las ovejas de cola gruesa se produjeron entre 11800 y 9000 a.C. y entre 5300 y 1700 a.C., respectivamente. Estos resultados aportan información importante sobre la historia de la migración y el pastoreo de las ovejas del Viejo Mundo en relación con los distintos fines de cría durante la revolución agrícola neolítica.

2.2 Clasificación Taxonómica

En 1758, Linneo clasificó la oveja doméstica como una especie de oveja blanca. Sin embargo, más tarde se demostró que la oveja doméstica moderna y su antepasado salvaje, (*Ovis orientalis*), pertenecían a la misma especie y debían recibir un único nombre científico. En 2003, la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica determinó en su Dictamen 2027 que las ovejas, al igual que otras 17 especies domésticas, debían llamarse por su especie salvaje, (*Ovis orientalis*), para evitar la contradicción de que antiguos linajes salvajes se llamaran subespecies de sus descendientes. El nombre dominante para ovejas y visones es, por tanto, *Ovis orientalis*, dejando la palabra *Aries* como nombre tricotómico para las subespecies doméstica (Gentry, 2003).

Reino	Animalia
<hr/>	
Filo	Chordata
Clase	Mammalia
Orden	Artiodactyla
Familia	Bovidae
Subfamilia	Caprinae
Género	Ovis
Especie	Ovis orientalis
Subespecie	<i>Ovis aries</i>
	(Linnaeus, 1758)

2.3. Glándulas Suprarrenales.

Las glándulas suprarrenales están situadas en el espacio retroperitoneal, por encima o medial a la columna suprarrenal. Pesan aproximadamente entre 8 y 10 gramos. La corteza externa representa el 90% del peso y el 10% restante es la médula. La corteza suprarrenal está bien vascularizada, y la principal irrigación arterial procede de la arteria subfrénica, la arteria renal y la aorta. El drenaje venoso se realiza a través de la vena central hacia cada glándula. La vena renal derecha desemboca directamente en la vena cava y la vena renal izquierda en la vena renal izquierda. Debido a esta diferencia, el cateterismo de la vena suprarrenal izquierda es más fácil (González-Albarrán y Fraile, 2000, pp, 1097-1101).

2.3.1. Definición de ACTH.

Históricamente se pensaba que los efectos del estrés fisiológico sobre la función inmunitaria eran directamente atribuibles a la intensa secreción de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) por la hipófisis. Por lo tanto, se propuso que los efectos de la ACTH sobre las células inmunitarias se producen indirectamente a través de la producción de la hormona adrenocorticotrópica. Estudios recientes han demostrado que la relación entre los sistemas neuroendocrino e inmunitario es bidireccional e implica mensajeros, receptores y vectores comunes. La adrenocorticotropina, un neuropéptido de origen hipofisario es el primer mediador endocrino producido endógenamente por las células inmunitarias. La proteína es producida por células leucémicas humanas y macrófagos esplénicos de ratón y es similar en peso molecular y secuencia de aminoácidos a la ACTH hipofisaria. Los macrófagos producen ACTH continuamente, mientras que los linfocitos de mamíferos sólo la producen tras la estimulación. La ACTH puede ser producida por infecciones virales, productos bacterianos (por ejemplo,

lipopolisacárido, LPS), células tumorales, y puede ser inducida por diversos estímulos, incluyendo la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la hormona del estrés arginina y oxitocina (Alves, Robazzi, y Mendonç, 2008, pp 192-202).

2.3.2 Definición de la CRH.

La CRH es un polipéptido d 41 aminoácidos que es secretado por la eminencia media del hipotálamo. Se encuentra en zonas del cerebro. La CRH es transportada por los vasos hipofisarios portales a la adenohipófisis, donde estimula la secreción de ACTH y los péptidos de su familia (B-endorfinas). Los receptores de CRH se encuentran principalmente en los corticotrofos y en menor cantidad en la medula adrenal y los ganglios simpáticos. (Alves, Robazzi, y Mendon, 2008, pp 192-202).

2.4. Transporte de Cortisol en la Sangre.

Alrededor del 80% del cortisol se transporta en el plasma sanguíneo unido a una proteína denominada globulina fijadora de corticosteroides (CRG) o transtiretina y, en menor medida, alrededor del 10% se une a la albúmina. El cortisol unido a proteínas es biológicamente inactivo y, por lo tanto, sólo funciona como reserva. En cambio, la fracción libre o no unida a proteínas, que representa el 10% del cortisol total, es la que se une a los receptores en el citoplasma y desempeña su función biológica. La concentración plasmática de cortisol libre es de aproximadamente 1 µg/dl y está regulada por las hormonas adrenocorticotrópica, mientras que la concentración de cortisol unido a la transtiretina es de 13 µg/dl (Dalin, *et al.*,1993,pp59-68).

La globulina fijadora de corticosteroides se produce en el hígado y fija el cortisol con gran afinidad. Esta proteína es capaz de fijar hasta 25 µg/dl de cortisol; sin embargo, si las concentraciones de cortisol aumentan por encima de este valor, la fracción libre de la hormona aumenta rápidamente y supera su porcentaje normal del 10%. La hormona

progesterona compite con el cortisol por el sitio de unión de corticosteroides en la globulina fijadora de corticosteroides, por lo que un aumento de los niveles de progesterona, si se produce en el tercer trimestre, puede inhibir la unión de cortisol de hasta el 25% del sitio de unión de corticosteroides en la globulina fijadora de corticosteroides, lo que resulta en un aumento de la fracción libre de cortisol. (Dalin, *et al.*, 1993,pp59-68).

2.5 Cortisol

2.5.1 Definición

El cortisol es el glucocorticoide más importante en respuesta a ACTH por parte de la hipófisis desde la zona fascicular y reticular de la corteza adrenal cuyos valores sanguíneos son ampliamente reconocidos como biomarcadores del estrés agudo, a pesar de su variabilidad y corta vida. El aumento de su concentración plasmática solo sería un indicador neuroendocrino primario. El cortisol se sintetiza a partir del colesterol a través de una serie de pasos mediados enzimáticamente por la corteza suprarrenal. (Peñuela, Uribe-Velásquez y Sánchez Valencia, 2011).

2.5.2. Función del Cortisol

En cuanto a la función del cortisol en las ovejas, se ha observado que, a pesar de su variabilidad y corta duración, sigue siendo uno de los indicadores más utilizados. Como indicadores de estrés se utilizan el volumen celular acumulado (VCA), la concentración de glucosa, la actividad de la enzima creatina cinasa (CK), el ácido β -hidroxibutírico y la concentración de lactato. La medición de estos biomarcadores es una forma práctica de controlar el bienestar animal en la producción de vacuno de carne. (Peñuela, Uribe-Velásquez y Sánchez Valencia, 2011).

2.5.3 Secreción de glucocorticoides

Los glucocorticoides son segregados por las glándulas suprarrenales y se consideran esenciales para los procesos de adaptación y homeostasis del organismo. La liberación de ACTH por la hipófisis es el principal estímulo para la secreción de glucocorticoides. Esta secreción tiene un ritmo diurno con diferentes niveles en función de la actividad y se considera una de las principales manifestaciones de la respuesta al estrés.

Los niveles sanguíneos de corticosteroides se consideran importantes para inhibir la secreción de ACTH (Lexen *et al.* , 2007, pp 8-14).

2.5.4. Metabolismo de Cortisol

El cortisol es metabolizado por la 11- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11- β -HSD), que consta de dos enzimas: 11- β HSD1 y 11- β HSD2. La 11- β HSD1 utiliza la coenzima NADPH para convertir la cortisona biológicamente inactiva en cortisona biológicamente activa. La 11- β HSD2 utiliza NAD⁺ como cofactor para convertir el cortisol en cortisona. En conjunto, el efecto neto es que la 11- β -HSD1 aumenta la concentración local de cortisol bioactivo en determinados tejidos, mientras que la 11- β -HSD2 actúa disminuyendo la concentración local de cortisol bioactivo. (Peñueña, Uribe –Velásquez y Sánchez Valencia, 2011, pp 71-87).

El cortisol también se metaboliza en 5-a-tetrahydrocortisol (5-a-THF) y 5-beta-tetrahydrocortisol (5-beta-THF), siendo la 5-a-reductasa y la 5-beta-reductasa los factores que limitan la velocidad de estas reacciones. La 5-beta-reductasa también convierte la cortisona en cortisol como factor limitante en la conversión del cortisol en tetrahydrocortisona (THE). Se ha sugerido que las alteraciones de la 11-beta-HSD1 pueden estar implicadas en afecciones como la obesidad, la hipertensión y la resistencia

a la insulina, el denominado síndrome metabólico. (Romero Peñueña, Uribe –Velásquez y Sánchez Valencia, 2011, pp 71-87).

2.5.5 Valor de Cortisol en Ovinos

En cuanto a la importancia del cortisol este permite tener el control de los procesos que permiten a los animales adaptarse a los cambios del entorno (ayuda a mantener la homeostasis). Se encarga de suministrar glucosa al sistema nervioso central. Durante la lactancia, ayudan a movilizar las reservas utilizadas para la síntesis de la leche. Los glucocorticoides desempeñan un papel sintético en la inducción del gluconeogénesis en el hígado y los riñones y en la estimulación de la biosíntesis de fosfolípidos en los pulmones. Son catabólicas y favorecen la degradación de las proteínas o macromoléculas lipídicas de las células musculares, adiposas, linfáticas, del tejido conjuntivo, de la piel y de los huesos. Es un modulador de las respuestas inflamatorias y estimula el sistema nervioso central (López *et al*, 2012, pp213-223).

2.5.6. Acciones de Cortisol

El cortisol es una importante hormona del estrés que aumenta el azúcar en sangre (glucosa), incrementa el uso de glucosa en el cerebro y aumenta la disponibilidad de sustancias para la reparación de tejidos. El cortisol también limita funciones irrelevantes o perjudiciales en situaciones de combate o huida. Altera las respuestas del sistema inmunitario e interfiere en los procesos de digestión, reproducción y crecimiento. Este complejo sistema de señalización física también interactúa con las partes del cerebro que controlan las emociones, la motivación y el miedo (Nandam *et al*., 2020).

2.6 Regulación de la secreción de cortisol: Eje Hipotalamo-Hipofisis- Adrenal.

La hormona liberadora de adrenocorticotropina secretada por el hipotálamo llega a la hipófisis anterior a través de la vena porta hipofisaria y favorece la síntesis y secreción de adrenocorticotropina. La proadrenocorticotropina es una molécula precursora de la adrenocorticotropina que sufre una proteólisis por la enzima convertasa para producir la hormona adrenocorticotropina, la melanocortina y las endorfinas grasas. La hormona adrenocorticotropina se libera en la sangre. Debido a su efecto trófico sobre las glándulas suprarrenales, la síntesis de cortisol se estimula en la zona de la fascia y, cuando aumentan los niveles de cortisol en sangre, la retroalimentación negativa inhibe la secreción de la hormona adrenocorticotropina. (Palacio, Gonzales y Maya, 2020, pp,111-125).

La liberación de cortisol es estimulada por los nociceptores superiores del sistema nervioso y se activa en condiciones de estrés. Por lo tanto, el cortisol puede elevarse en respuesta al estrés físico, la cirugía, las quemaduras, la hipoglucemia, la hipotensión y el ejercicio, en respuesta a la liberación local de citoquinas inflamatorias (factor de necrosis tumoral- α , interleucina 6), en respuesta a neurotransmisores adrenérgicos (epinefrina, noradrenalina). La secreción de cortisol también puede aumentar en respuesta a la liberación local de adrenalina. Del mismo modo, la secreción de cortisol sigue un ritmo circadiano, alcanzando su máximo por la mañana (entre las 7 y las 9 horas) y disminuyendo por la noche (entre las 10 y las 12 horas (Alves, Robazzi, y Mendon, 2008, pp 192-202).

2.7 Ritmo Circadiano y Ritmo Ultradiano del cortisol

El cortisol tiene un ritmo circadiano típico, con episodios ocultos que se producen a lo largo de 24 horas en individuos sanos con horarios estables de sueño-vigilia. Los ritmos circadianos (24 horas) son fenómenos con un periodo de unas 24 horas; los circadianos son aquellos en los que se registran fluctuaciones regulares durante periodos superiores a 24 horas, mientras que los ultradianos son aquellos en los que estas fluctuaciones se registran durante periodos inferiores a 24 horas (Torres, Amézquita, y López, 2013).

2.7.1 Estrés

El bienestar de los animales es cada vez más importante, y la ausencia de estrés crónico es uno de sus requisitos. Cuando hay estrés, se producen varias respuestas endocrinas para mejorar la condición física del animal. Los glucocorticoides y las catecolaminas son hormonas de primera línea para hacer frente a las situaciones de estrés. Estas hormonas se definen como indicadores de la actividad suprarrenal y, por lo tanto, están alteradas. (Möstl y Palme, 2002, pp 67-74)

2.7.2. Definición de Estrés

El estrés puede definirse como una amenaza real o percibida para la integridad física o psicológica de una persona que provoca una respuesta fisiológica o conductual. En términos médicos, el estrés se define como un nivel elevado de glucocorticoides o catecolaminas en la circulación (Farfán Bellido *et al.*, 2023, pp 61- 77).

2.7.3. El estrés en Ovinos

El estrés crónico se produce cuando un animal no responde a un factor estresante estable de la manera típica de la especie o cuando están presentes varios factores estresantes simultáneamente. El estrés crónico se considera con mayor frecuencia en los sistemas intensivos, pero también puede ser un problema de bienestar en especies ampliamente gestionadas, como las ovejas. Las respuestas neuroendocrinas al estrés crónico son difíciles de interpretar, ya que parecen normalizarse tras una respuesta inicial. Así, el cortisol y las catecolaminas durante el estrés crónico pueden estar en los niveles previos al estrés o por debajo de ellos, pero esto depende de una serie de factores de estrés. El estrés crónico también puede afectar a la función reproductora, al crecimiento del cuerpo y del pelo, a la calidad de la carne, reducir la función inmunitaria y también puede estar asociado a una mayor carga de parásitos en las ovejas. (Darawany *et al.* , 2007,pp 1-12)

El estrés crónico también puede alterar los patrones de comportamiento, en particular la actividad y la alimentación, así como el ritmo circadiano del comportamiento. Sin embargo, el comportamiento sedentario de las ovejas es poco frecuente y sólo puede darse en condiciones experimentales de aislamiento social. Las pruebas fisiológicas y de comportamiento sugieren que la manipulación brusca y el destete pueden causar estrés crónico en las ovejas. La subordinación social y el destete también actúan como estresores crónicos, provocando un aumento del parasitismo y respuestas adicionales al estrés en estos animales. La cojera y el parasitismo están asociados a respuestas fisiológicas y conductuales, lo que sugiere que se trata de formas graves de estrés crónico en el ganado ovino. Se desconoce si los factores de estrés ambiental, como el clima y la disponibilidad de alimentos, desempeñan un papel en el estrés crónico de las ovejas. Sin embargo, la desnutrición puede ser un problema de bienestar, ya que afecta a la supervivencia de los

corderos. Dado que en la ganadería ovina se dan muchos factores de estrés crónico, el bienestar de las ovejas debe tenerse más en cuenta de lo que se hace actualmente (Dwyer y Bornett, 2004, pp 293-304)

2.7.4 Medición del estrés inmediato.

La evaluación de la angustia y el malestar requiere la medición de las respuestas fisiológicas y conductuales. Los indicadores conductuales de angustia incluyen intentos de huida, gritos, patadas y peleas. Los indicadores externos de cómo perciben los animales los métodos de manipulación incluyen pruebas de selección y aversión. Entre los marcadores habituales del estrés fisiológico se encuentran el cortisol, las betaendorfinas y la frecuencia cardíaca. El cortisol es un indicador útil del estrés directo causado por los procedimientos de manipulación y manejo de los animales (por ejemplo, la castración). Los investigadores deben tener en cuenta que el cortisol es un indicador variable en el tiempo que tarda entre 10 y 20 minutos en alcanzar su punto máximo. Una revisión de varios estudios ha demostrado que los niveles de cortisol en el ganado vacuno se dividen en tres categorías (Kovács, 2008, pp 665-672).

Nivel normal.

Niveles que se producen cuando la cabeza queda atrapada en una trampa para ganado ovino.

Altos niveles de estrés.

2.8. Efectos Metabólicos

El estrés se utiliza como indicador del bienestar animal entre los procesos metabólicos este provoca cambios en la actividad de los sistemas hipotalámico-hipofisario-suprarrenal-cortical (HPA) y simpático-suprarrenal-intestinal y altera la homeostasis interna del animal. La activación endocrina contribuye a la liberación de catecolaminas, en particular epinefrina y norepinefrina, hormona liberadora de adrenalina (CRH), hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y cortisol. Diferentes autores utilizan distintos componentes sanguíneos para determinar el estrés. El cortisol sigue siendo uno de los marcadores más utilizados, a pesar de su variabilidad y corta duración. También se utilizan como indicadores de estrés el volumen celular agregado (VCA), la concentración de glucosa, la actividad de la enzima creatina fosfoquinasa (CK), el B-hidroxitirato y la concentración de lactato (Peñueña, Uribe –Velásquez y Sánchez Valencia, 2011, pp 71-87).

2.8.1 Fisiopatología del Estrés

El estrés, sea cual sea su naturaleza, se define como el resultado de reacciones biológicas y psicológicas desencadenadas en el organismo cuando éste se ve expuesto a factores adversos. Los factores estresantes pueden desencadenar reacciones orgánicas y también alterar el equilibrio de los mecanismos reguladores homeostáticos, provocando una pérdida de la capacidad de mantener la homeostasis fisiológica dentro de los límites normales (Coello, 2012).

2.8.2 Indicadores de Estrés

Algunos de los principales indicadores del estrés animal son los cambios en el peso corporal y las concentraciones de cortisol, glucosa y ácidos grasos libres (Larios-Cueto *et al.*, 2019).

2.9. Tipos y Técnicas de Elisa.

2.9.1 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 enzimas siendo las más comunes, la peroxidasa o la fosfatasa alcalina” (Stanchi, 2010)

Las ventajas de la medición del cortisol fecal mediante ELISA son que no es invasiva, no produce estrés al animal que se está controlando y es relativamente segura para la persona que la realiza (Rodríguez Álvarez y Arias Bernal, 2010, pp. 53-54).

2.9.2 Elisa Cuantitativa

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).

2.9.3 Tipos de Elisa

2.9.3.1 ELISA Directo

El ELISA directo es un método de detección en el que un antígeno se fija al fondo de los pocillos de una placa de micro titulación y se añade un anticuerpo específico del antígeno que se une a una molécula, por ejemplo, una enzima (Kubota *et al.* , 2008).

2.9.3.2 ELISA Indirecto

En el ELISA indirecto, se fija un antígeno a la placa de pocillos y se añade un anticuerpo específico para ese antígeno. A continuación, se añade al anticuerpo primario un anticuerpo secundario conjugado con una enzima u otra molécula de detección (Kubota *et al.*, 2008).

2.9.3.3 ELISA Competitivo

En el ELISA competitivo el antígeno de referencia se fija al fondo de la placa de micro titulación. La muestra y el anticuerpo se añaden a los pocillos y si el antígeno está presente en la muestra, se une al anticuerpo para competir con el antígeno de referencia. El material no ligado se elimina mediante lavado. Cuanto mayor sea el antígeno presente en la muestra, menor será la señal, ya que menos anticuerpo se une al antígeno de referencia en el fondo del pocillo. (Kubota, *et al.*,2008).

2.9.3.4 ELISA Sándwich.

Los ELISA en sándwich utilizan dos anticuerpos específicos para dos epítomos diferentes presentes en la antígena diana. El anticuerpo de captura se une al antígeno uniéndose a un epítomos del antígeno en el fondo de la placa de micro titulación. El anticuerpo de detección se une al otro epítomos del antígeno y se une a la enzima,

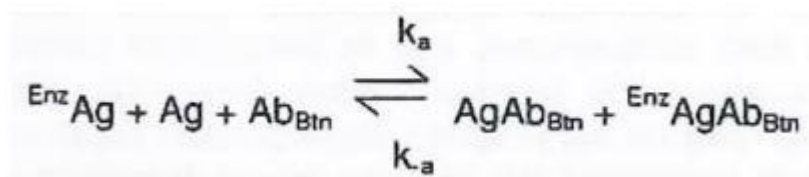
permitiendo así la detección (si el anticuerpo de detección no se une, se requiere un anticuerpo de detección secundario unido a la enzima) (Kubota *et al.*, 2008).

2.9.4 Cortisol Accubind Elisa – IFU Rev 4

El Kit ELISA Monobind Cortisol utiliza anticuerpos monoclonales específicos anti cortisol y no requiere extracción previa de muestras de suero o plasma. Colocando una serie de puntos de referencia de concentraciones séricas de cortisol conocidas, pueden trazarse curvas de actividad y concentración. Las curvas pueden compararse con una dosis-respuesta y las concentraciones de cortisol pueden relacionarse con muestras desconocidas (AccuBind, 2020).

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, 2020) Dicha interacción se presenta en la siguiente ecuación de la figura.

Figura 2. Ecuación de Inmunoensayo enzimático Competitivo.



- AcBtn= Anticuerpo marcado con biotina (Cantidad constante)
- Ag= Antígeno nativo (Cantidad variable)
- EnzAg = conjugado enzima-antígeno (cantidad constante)
- AgAcBtn= complejo antígeno-anticuerpo

- $EnzAgAcB_{tn}$ = 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, 2020)

2.9.5 Adsorción

La fase sólida debe ser fácil de manipular y mantener una buena reproducibilidad cuando se fijan Ag o Abs a la superficie. Se probaron varias fases sólidas, desde tubos de vidrio hasta micro placas de plástico de 96 pocillos. Estas placas facilitan la adsorción de moléculas y tienen un fondo ópticamente transparente, lo que permite realizar mediciones espectrofotométricas en la placa, conocidas como mediciones Elisa. Las micro placas de 360 μ l y 96 pocillos pueden manejar un gran número de muestras y, una vez recubiertas, las muestras pueden almacenarse en un lugar seco a bajas temperaturas, son válidas durante un largo periodo de tiempo cuando se almacenan a bajas temperaturas (Cultek, 2006)

2.9.5. Unión y Lavados

Estos dos pasos importantes sirven para eliminar todas las partes libres y sin reaccionar de la molécula en los pasos de lavado individuales, evitando así interferencias innecesarias y garantizando una unión adecuada sin perturbar las partes libres (Suárez, 2017).

2.9.6. Tiempos de incubación y temperatura

En estas pruebas, es importante asegurarse de que los tiempos de incubación y las temperaturas de cada paso son precisos, ya que incluso pequeñas desviaciones pueden suponer una gran diferencia en los resultados. Por lo tanto, es importante utilizar equipos, incubadoras y refrigeradores bien calibrados, trabajar a temperaturas definidas con precisión y sin la más mínima desviación, y tener mucho cuidado al terminar una prueba y empezar la siguiente (Suárez, 2017).

2.9.7. Enzimas y sustratos

Las enzimas se han convertido en un elemento básico de los marcadores debido a su enorme capacidad catalítica, su alta especificidad, la diversidad de sustratos que pueden unir y, en última instancia, su gran estabilidad (Ochoa, 2008).

2.9.8 Anticuerpos y Antígenos Empleados

Con el método ELISA, deben especificarse los Abs y Ags para garantizar la calidad y la pureza. Si se adquieren con fines comerciales, deben ir acompañados de un certificado de análisis que contenga los datos pertinentes del producto e indique el lote de producción (Suárez, 2017).

2.9.9 Detectores.

El lector ELISA es un lector espectrofotométrico capaz de tomar lecturas continuas de cada pocillo de la placa ELISA. Así como los espectrofotómetros convencionales son capaces de medir todas las longitudes de onda de la luz ultravioleta y visible, el lector ELISA, más potente, está equipado con un sistema de filtros que le permite medir sólo una determinada gama de longitudes de onda. Se encarga de medir la adsorción de los cromóforos más utilizados. Existen detectores colorimétricos, fluorescentes y de luminiscencia (Coello, 2012).

3.MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Materiales.

3.1.1. Físicos Tabal. Materiales Físicos.

Descripción	Unidad	Cantidad
Lector de Micro placas Elisa	Unidad	1
Pipeta Multicanal	Unidad	1
Micro pipeta Automática	Unidad	5
Puntas para Pipetas de 200 ug	Paquete (1000)	1
Guantes	Caja	1
Mascarilla	Unidad	1
Mandil	Unidad	1
Pocillos	Unidad	3
Cuaderno	Unidad	1
Esfero	Unidad	1
Registro de Datos	Unidad	1
Cámara de celular	Unidad	1
Computador	Unidad	1
Papel Periódico	Unidad	1

3.1.2. Biológicos

Tabla 2. Materiales Biológicos

Descripción	Unidad	Cantidad
Animales	Unidad	200
Agua Destilada	Litro	1

3.1.3. Recursos Humanos.

Tabla 3 Recursos Humanos.

Nombre	Descripción
Dr. Juan Masache Masache	Tutor de Tesis.
Ing. Mauricio Salas	Laboratorista.
Daniel Lazo	Tesista

3.1.4. Recursos Químicos.

Tabla 4. Recursos Químicos.

Descripción	Unidad	Cantidad
Calibradores de Cortisol	Unidad	3
Reactivo enzimático de cortisol	Unidad	3
Reactivo de cortisol biotina	Unidad	3
Placa recubierta de estreptavidina -96 posillos	Unidad	3
Concentrado de solución lavado	Unidad	3
Sustrato A – Contiene tetrametilbencidina (TMB) en tampón	Unidad	3
Sustrato B – Contiene Peróxido de hidrogeno (H2O2) en búfer.	Unidad	3

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 grafica interpretativa.

3.4. Población y muestra.

Se trabajará con un total de 200 animales, entre ellos 100 hembras y 100 machos aparentemente sanos del cual se extrajo sangre y se utilizó para obtener el suero sanguíneo del cual se realizó la prueba de ELISA cuantitativa y la utilización de un pocillo y un tester. Cuya práctica se realizó a cabo en el laboratorio de Biotecnología 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 ovejas, se trabajó con lo que es un error admisible de 5% es decir 0,005%, entonces si el universo es de 200 ovejas, el tamaño de la muestra es de 133.5593 ovejas.

3.5. Obtención de la Muestras.

Para la toma de muestras sanguíneas se utilizaron agujas hipodérmicas de 20 G x 1 ½ estériles al localizar la vena yugular en cada tubo vacutainer sin anticoagulante (tapa roja) se extrajo 6ml de sangre, luego se centrifugo la muestra a 3500 revoluciones por minuto durante 5 minutos con el fin de obtener el suero para prueba de cortisol.

3.6. 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 utilizo es de la marca AccuBind® ELISA importado de Lake Forest de condado de Orange, California, USA.

El procedimiento de prueba se realizó por personas capacitadas y profesionales capacitadas.

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

1. Se formateo los pocillos de la micro placa para que cada referencia, control y muestra de paciente se analicen por el número de pacientes hembras y machos.
2. Se pipetea 0.025ml (25 µl) del calibrador apropiado así se controla las muestras dentro del pozo asignado.

3. Se agregó 0.05ml (50 μ l) de reactivo enzimático de cortisol listo para usar todos los pocillos.
4. Se agita de manera suave la micro placa por 20-30 segundos para mezclar.
5. Luego se añadió 0.050ml (50 μ l) de reactivo cortisol biotina a todos los pocillos.
6. Nuevamente se agito la micro placa suavemente durante 20 – 30 segundos para mezclar.
7. Se cubre y se lleva a incubar por 60 minutos en temperatura ambiente.
8. Se descarta los contenidos de la micro placa por medio decantación (golpear y sacar). Si se hace decantación se debe golpear la placa sobre un papel absorbente.
9. Además, 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 agrega 0.100ml (100 μ l) de solución de sustrato a todos los pocillos.
NO SE DEBE MEZCLAR LA MICROPLACA DESPUÈS DE LA ADICIÓN DE SUSTRATO.
11. Se procedió a incubar en temperatura ambiente en un lapso de 15 minutos.
12. Luego se coloca 0.050ml (50 μ l) de solución de parada a cada pocillo y se mezcla suavemente durante 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 micro placas estos resultados deben ser leídos en un lapso de 30 minutos después de haber colocado la solución de parada.

3.7. Operacionalización de Variables.

3.7.1. Variables Independientes.

Tabla 5. Variables Independientes Suero

Concepto	Categorías	Indicadores	Índice
Ovinos que se encuentran aparentemente sanos	Ovinos	Numero Hembras Número de Machos	Número Número

3.7.2. Variables Dependientes.

Tabla 6. Variable Dependiente Reactivo.

Concepto	Categoría	Indicadores	Índice
Valores de Cortisol que se medran por medio de pruebas de laboratorio	Química Sanguínea	Cortisol-	Ng/ml

3.8. Toma y Registro de datos.

Para la toma de muestras se utilizó el lector de micro placas de absorbancia de 450nm fueron registradas en una hoja de Excel para el procedimiento de análisis estadístico.

3.9. Consideraciones Éticas.

En esta investigación se tomó en cuenta algunos aspectos importantes como la asepsia en todos los procedimientos que se realizaron y a su vez mantener todos los materiales físicos en condiciones óptimas y siempre estériles para evitar contagios o contaminación en las muestras.

Por ende las ciencias biológicas se caracterizan por utilizar sobre la base de un marco teórico la observación y la experimentación con los organismo para la construcción de conocimiento, señalando el valor de una biología escolar que en sintonía con la ciencia realiza trabajos prácticos de laboratorio incluyendo observaciones, disecciones, diferentes tipos de experimentaciones con los animales y la importancia de promover el respeto, la conservación de la vida y el no sufrimiento de los diferentes tipos de organismos que constituyen los ecosistemas. (Silva,2017)

Llevando una propuesta de configurar estas actividades como prácticas generosas mediante una planificación didáctica que incluya una guía de observación del material, cuyo trabajo práctico traerá a luz las concepciones que se tienen e ir conectando conocimientos previos y generando explicaciones que permiten la construcción colectiva de conocimiento científico. (Silva, 2017)

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

4.1 Resultados.

Para análisis del cortisol en plasma de ovinos se midió la fracción de cortisol marcado unido al anticuerpo mediante la adición del sustrato y se lee la absorbancia del color desarrollado a 450nm que se realiza una lectura bicromática eliminando el color producido por una posible reacción de fondo. En el cálculo de resultados se utilizó la “curva dosis respuesta” para hallar la concentración de Cortisol de la absorbancia obtenidas en el lector de micro placas.

Tabla 7 Registro de la absorbancia del lector de micro placas.

Pocillo	1
A	1,841
B	1,325
C	0,839
D	0,439
E	0,282
F	0,151

4.1.1 Valores de Cortisol en Machos

En el análisis del cortisol en plasma de ovinos obtuvimos la siguiente tabla:

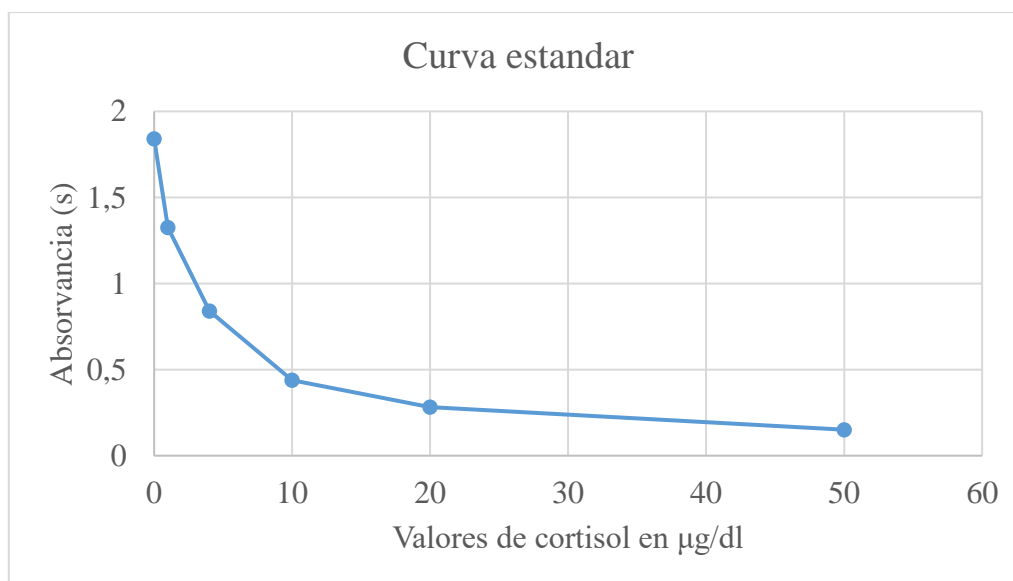
Tabla 8. Primera placa de micro titulación analizadas en Lector automático de Micro placas Elisa. Absorbancia a 450nm; plasma de ovinos machos (100/100).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	1,706	1,352	1,373	0,514	1,127	1,621	1,611	1,115	1,350	1,634	1,222	0,998	0,819
B	1,197	0,929	1,477	0,763	0,879	1,042	1,127	0,672	1,464	1,493	1,387	1,342	1,524
C	0,348	0,976	1,008	1,038	1,056	1,601	1,460	1,016	1,620	1,425	1,074	1,181	1,262
D	0,967	1,084	1,590	0,801	0,826	1,264	0,967	0,785	1,173	1,090	1,366	0,952	1,096
E	1,153	1,063	1,258	1,183	0,803	1,648	1,473	1,117	1,407	1,278	1,353	1,053	
F	1,087	0,676	1,115	0,701	1,052	1,352	1,336	0,967	0,670	1,431	1,385	1,287	
G	1,068	0,915	1,565	1,389	1,093	1,259	1,144	1,494	1,690	1,054	1,290	1,455	
H	1,114	1,299	1,438	1,346	1,106	1,305	1,842	1,379	1,502	1,538	0,803	1,136	

Los datos obtenidos de la absorbancia para la curva de referencia de esta investigación en ovinos machos se representan en la siguiente figura.

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

(Machos)



Los datos obtenidos en el equipo de Elisa nos dan 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 de $\mu\text{g}/\text{DL}$.

Para obtener los Resultados de la absorbancia 450 a $\mu\text{g}/\text{dl}$ 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.

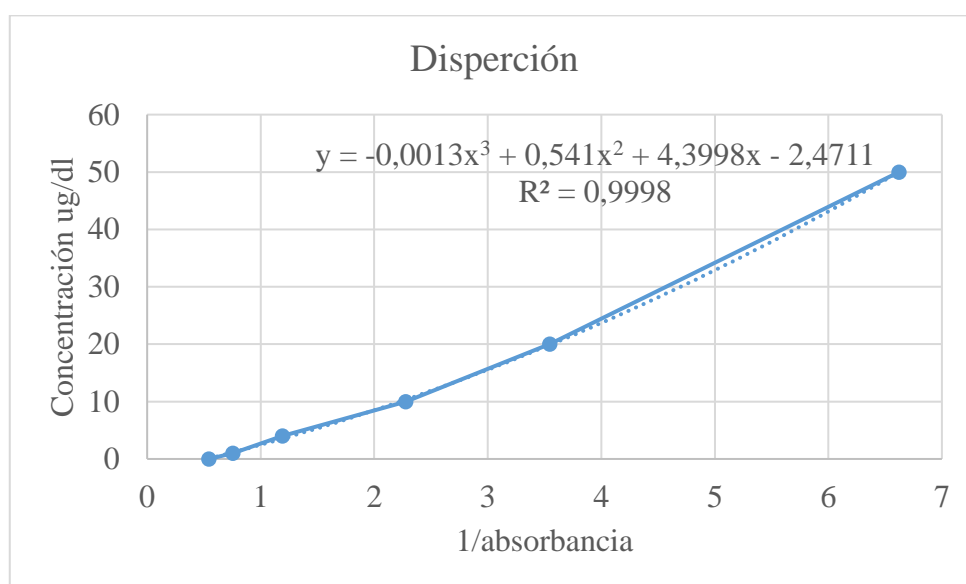
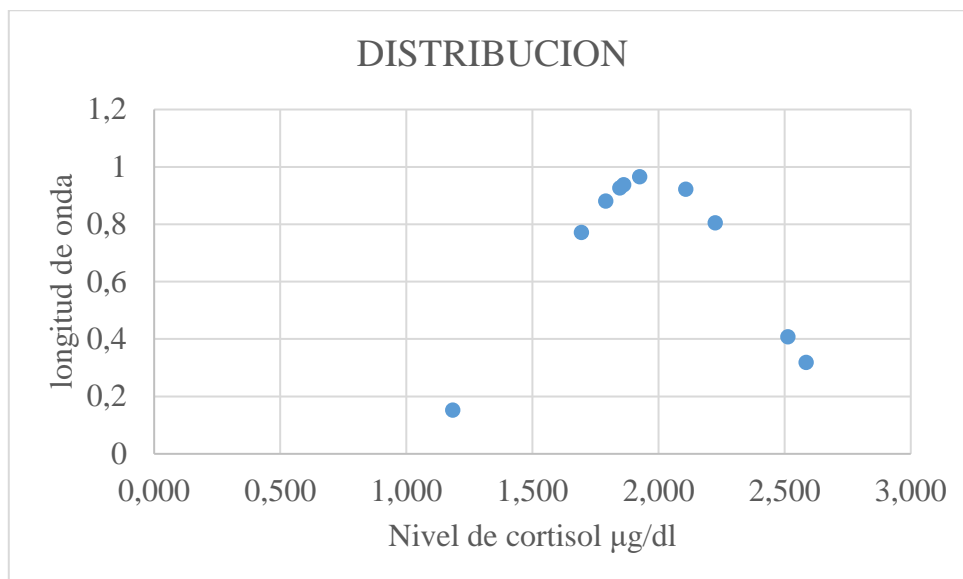


Figura 5. Distribución Normal: construidas en torno a la media y a la desviación estándar referente de datos obtenidos de 100 ovinos machos.



En la figura 5 observamos la representación gráfica de la media de los niveles de cortisol 1,973 ug/dL y la desviación estándar 5,036 referente de datos obtenidos de plasma de ovinos machos, indica que la densidad está dispersa 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 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 9. Niveles de Cortisol: Machos.

Concentración de cortisol en $\mu\text{g/dL}$									
0,294	2,603	1,368	0,976	0,449	0,796	1,901	0,321	1,491	1,641
1,581	2,047	1,909	1,096	2,248	2,656	2,656	0,698	0,982	2,746
14,608	2,146	0,561	1,858	0,488	0,765	0,716	0,424	2,094	2,194
2,656	5,217	0,850	3,233	1,348	1,125	1,003	0,718	1,039	1,274
1,751	2,982	8,127	2,179	0,398	1,787	1,084	0,882	1,076	0,808
2,033	1,236	4,222	3,646	1,079	0,077	0,786	2,020	0,987	1,820
2,122	1,020	2,269	3,845	1,364	1,909	0,451	1,302	1,264	3,705
1,913	0,755	3,862	2,199	1,217	5,270	1,672	0,867	3,845	0,648
1,079	2,425	1,634	2,006	0,468	2,382	0,929	2,189	2,479	1,354
2,890	0,510	4,903	1,948	1,858	4,009	5,297	0,618	1,107	1,993

4.1.1.2. Datos Obtenidos en el análisis estadístico en Machos.

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

Tabla 10. Análisis Estadístico en Machos.

MACHOS	VALOR
MEDIA	1,973
RANGO	12,464
MEDIANA	1,790
MODA	2,656
VARIANZA	25,358
DESVIACION	5,036
COEFICIENTE	3,909

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 12,464 en machos expresa la diferencia entre valor mínimo y máximo en cada variable de estudio.

La mediana es de 1,790 en machos.

La moda 2,656 números se repiten dentro del conjunto de datos.

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 25,358 está disperso 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 5,036 está disperso con respecto a la media aritmética en cada variable.

El coeficiente de variación en machos es de 3,909 % de lo que nos da la confiabilidad de los datos en términos porcentuales.

4.1.1.3 Discusión.

En el análisis de los niveles de cortisol en plasma de 100 machos ovinos, se obtuvo una media de 1,790 $\mu\text{g/dL}$ esto se relaciona dentro del rango de $12,9 \pm 19,6 \mu\text{g/dL}$ según el estudio de los siguientes autores (SOUZA *et al.*, 2006) tiene un rango aproximado dando por entender que los individuos estudiado se encontraban en su hábitat natural con un óptimo estado de salud frente a esto también realizamos una comparación del autor (LEME *et al.*, 2009) que mide concentraciones de cortisol plasmáticas al transportar en un camión ovejas con las ventanas abiertas y cerradas que da como media de 2,89 $\mu\text{g/dL}$ que está un poco por encima de este dato referencial.

Otro autor (Lier *et al.*, 2008) evaluó los niveles de cortisol post- esquila fueron muy variables ya que los niveles en los días previos fue una media $0,35 \pm 6,26 \mu\text{g/dL}$ haciendo como referencia que nuestro resultado de la media está dentro del rango de referencia y que existe un grado de respuesta rápido al aumento de secreción en respuesta de la esquila.

4.1.2. Valores de Cortisol en Hembras.

En el análisis del cortisol en plasma de ovinas hembras obtuvimos la siguiente tabla.

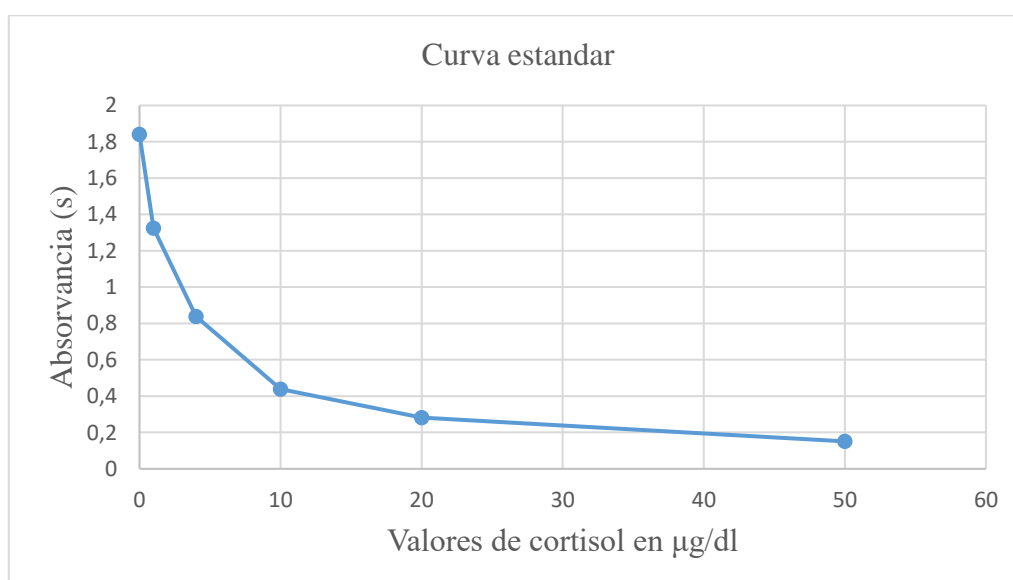
Tabla 11. Segunda Placa de Micro titulación analizadas en el Lector de Micro placas Elisa: Plasma de ovinas hembras (100/100)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	2,467	1,158	1,124	1,661	1,342	1,644	1,176	1,167	1,457	1,419	1,417	1,422	0,845
B	1,816	1,279	1,045	1,352	1,696	1,196	1,724	1,344	0,946	1,576	1,411	1,767	0,616
C	1,098	1,592	0,990	1,547	1,632	1,641	1,414	1,205	0,982	1,260	1,520	1,506	0,399
D	0,687	1,485	1,336	1,493	1,432	1,471	1,643	1,665	0,421	1,529	1,276	1,514	0,987
E	0,476	1,475	1,193	1,821	1,217	1,605	1,610	1,633	1,704	1,363	1,248	1,447	
F	0,224	1,175	1,484	1,210	1,465	1,450	1,654	1,347	1,448	1,486	1,272	1,361	
G	1,135	0,654	1,548	0,383	1,609	1,659	1,576	1,456	1,474	1,268	1,582	1,186	
H	1,782	1,517	1,096	1,423	1,624	1,150	1,089	1,365	1,380	1,283	1,337	1,647	

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 obtuvimos la ecuación de la siguiente gráfica de dispersión de líneas rectas y marcadores.

Figura 7. Dispersión de Líneas rectas y Marcadores (Hembras)

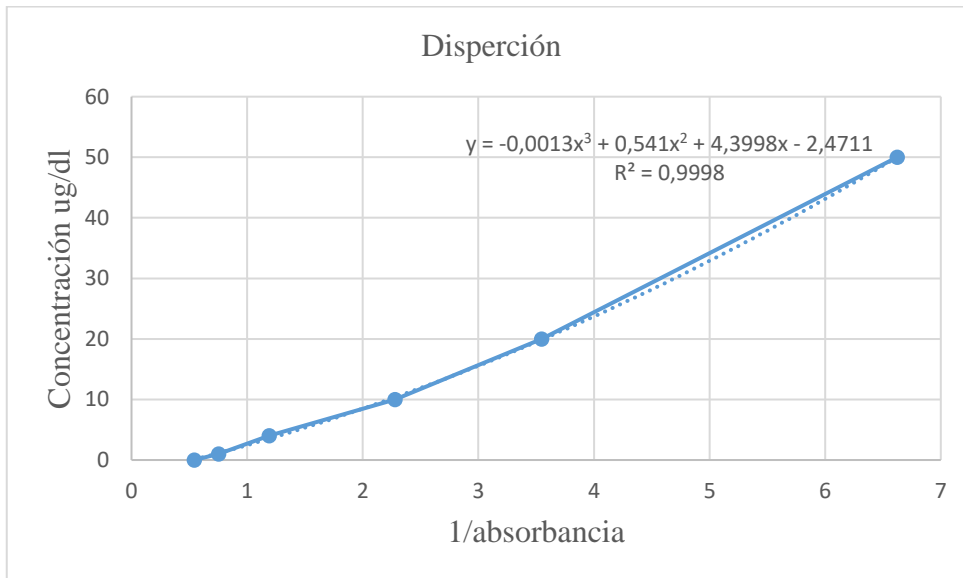
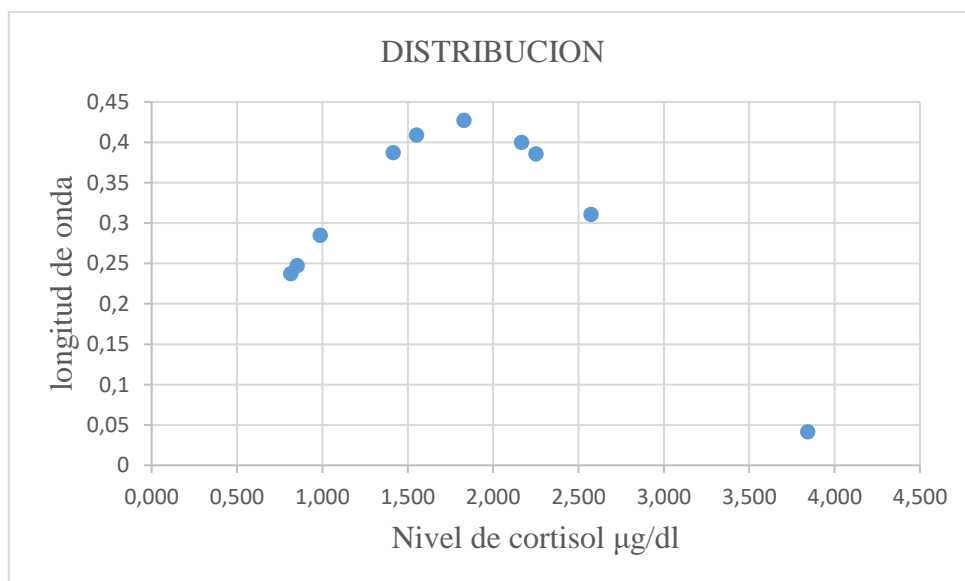


Figura 8. Distribución normal: Construidas en torno a la media y la desviación estándar de datos obtenidos de 100 ovinas hembras.



En la figura 8 observamos la representación gráfica de la media de los niveles de cortisol 1,828 $\mu\text{g/dL}$ y la desviación estándar 22,512 referente de datos obtenidos del plasma de ovinas hembras, indica que la densidad está disperso 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 12. Niveles de Cortisol: Hembras.

Concentración cortisol en $\mu\text{g/dL}$									
-0,599	0,506	1,596	12,682	0,405	0,911	0,426	0,762	0,903	0,689
0,116	0,737	0,739	0,888	1,585	0,407	1,093	1,001	0,918	0,671
1,984	0,760	0,597	1,107	0,411	0,470	0,806	0,898	0,657	0,827
5,076	1,664	1,993	0,311	0,770	0,386	1,042	0,538	1,309	1,053
9,148	5,517	0,374	0,428	0,480	0,538	0,803	1,361	1,401	1,623
27,837	0,664	1,079	0,865	0,820	2,024	2,783	0,638	1,322	0,399
1,824	1,871	0,599	1,509	0,377	1,696	2,569	1,048	0,526	3,491
0,168	2,234	0,718	0,784	1,763	1,102	11,015	0,734	1,122	6,092
1,731	2,524	0,108	0,472	1,661	1,552	0,297	1,335	0,890	11,934
1,299	1,125	1,534	0,443	0,263	0,366	0,825	1,286	0,192	2,541

Los datos negativos que tenemos en la tabla pueden estar relacionado a tomas de muestras de sangre alterada al momento de la toma, también puede estar relacionado al estrés crónico motivo de alguna enfermedad parasitaria denominada oestrosis ovina o

miasis de la nariz la cual es originada por las larvas de la mosca *Oestrus Ovis* que afectan las cavidades nasales de los ovinos y caprinos.

4.1.2.1. Datos Obtenidos en el análisis estadístico en ovinas hembras.

Tabla 13. Análisis Estadístico en Hembras.

HEMBRAS	VALOR
MEDIA	1,828
RANGO	27,613
MEDIANA	0,922
MODA	0,538
VARIANZA	506,812
DESVIACION	22,512
COEFICIENTE	5,292

En la tabla 13 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 27,613 en hembras expresa la diferencia entre valor mínimo y máximo en cada variable de estudio.

La mediana es de 0,922 en hembras

La moda 0,538 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 506,812 lo cual demuestra una dispersión.

La desviación típica brinda información sobre la dispersión media de una variable obteniendo en hembras de 22,512 corroborando su dispersión.

El coeficiente de variación en hembras es 5,292 % de lo que nos da la confiabilidad de los datos en términos porcentuales.

4.1.2.2 Discusión.

En el análisis de los niveles de cortisol en plasma de 100 hembras ovinas, se obtuvo una media de 0,922 $\mu\text{g/dL}$ que está dentro del rango $3,52 \pm 0,17 \mu\text{g/dL}$ según (TAPIA *et al.*, 2007) determinó las concentraciones sanguíneas de cortisol mediante radioinmunoensayo (RIA) a corderos transportados por 12 horas hacia una planta faenadora de carnes, tomando en cuenta el resultado de la media y el estudio comparado se da entender que las ovinas tienen un adecuado bienestar de salud, frente a eso también hacemos una comparación con la referencia dada (SOUZA *et al.*, 2001) obtuvo una media de 0,68 $\mu\text{g/dL}$ y 1.35 $\mu\text{g/dL}$ este estudio se basó en medir concentraciones plasmáticas y ritmo circadiano de cortisol y prolactina en ovejas durante el anestro emocional, se torna que la media de 0,922 $\mu\text{g/dL}$ está dentro del rango del dato referencial.

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 14. Análisis de Medias en Ovinos machos y hembras.

	Niveles de Cortisol de esta investigación $\mu\text{g/dL}$	Niveles de Cortisol referenciado por (SOUZA <i>et al.</i> , 2006)	Niveles de Cortisol referenciado por (LEME <i>et al.</i> , 2009)	Niveles de Cortisol referenciado por (Lier <i>et al.</i> ., 2008)	Niveles de Cortisol referenciado por (TAPIA <i>et al.</i> , 2007)	Niveles de cortisol referenciado por (SOUZA <i>et al.</i> , 2001)
Machos	1,973	$12,9 \pm 19,6$	2,89	$0,35 \pm 6,26$	$3,52 \pm 0,17$	$0,68 \pm 1,35$
Hembras	1,828	$12,9 \pm 19,6$	2,89	$0,35 \pm 6,26$	$3,52 \pm 0,17$	$0,68 \pm 1,35$

Las Medias de 1,973 $\mu\text{g/dL}$ y 1,828 $\mu\text{g/dL}$ en machos y hembras respectivamente están dentro del rango $12,9 \pm 19,6$ $\mu\text{g/dL}$ según el estudio de (SOUZA *et al.*, 2006) por lo que las medias obtenidas en esta investigación son valoradas como datos referenciales de cortisol en plasma de ovinos para diagnósticos en condiciones de altitud, dado por entender que los animales de este estudio están en un entorno de bienestar.

En comparación con los niveles de cortisol referenciado por (LEME *et al.*, 2009) los resultados obtenidos en esta investigación mantienen un índice superior balanceado respecto a las medias de la investigación.

De acuerdo a los demás estudios referenciados por (Lier *et al.*, 2008), (TAPIA *et al.*, 2007), (SOUZA *et al.*, 2001), se mantiene rangos variables debido a que cada estudio es diferente y además es un dato de referencia de cortisol en plasma de ovinos en condiciones de altitud y se da a entender que los individuos estudiados están en un entorno de bienestar

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

5.1 Conclusión.

En esta investigación se determinó la concentración de cortisol con un promedio en machos 1,973 µg/dL que está dentro de los parámetros de referencia el cual está en 2.89 µg/dL y en hembras 1,828 µg/dL por lo cual es un valor coherente y significativo con información científica para referencias en laboratorios clínicos veterinarios ubicados en zonas geográficamente de altitud para un diagnóstico más certero y para que el Médico Veterinario tenga mejores resultados con tratamiento adecuados en Ovinos.

5.2. Recomendaciones.

Recomiendo clasificar en variables como edad, peso, sexo, raza, alimentación, hora del día, genética y ovinos para investigar alguna alteración en los niveles de cortisol.

Recomendaría seguir realizando 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.

Es preferible 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.

- AccuBind, F. T. y Test, E. L. I.S. A (2020).. Product Code: 5325-300.
- Alves, C., Robazzi, T. C., y Mendonç, M. (2008). Withdrawal from glucocorticosteroid therapy: clinical practice recommendations. *Jornal de Pediatria*, 84(3), 192–202.
- Coello, D. (2012). *Técnica de Elisa (Enzyme Linked inmunoabsorvent assay) Método de Elisa y micro Elisa*. . Escuela Superior Politécnica del Litoral definiciones médicas.
- Cultek. (2006). *Soluciones Elisa protocolo y técnicas*.
- Dalin, A.-M., Magnusson, U., Häggendal, J., & Nyberg, L. (1993). The Effect of Transport Stress on Plasma Levels of Catecholamines, Cortisol, Corticosteroid-Binding Globulin, Blood Cell Count, and Lymphocyte Proliferation in Pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 34(1), 59-68.
- Deng, J., Xie, X.-L., Wang, D.-F., Zhao, C., Lv, F.-H., Li, X., & Li, M.-H. (2020). Paternal Origins and Migratory Episodes of Domestic Sheep. *Current Biology*, 30(20), 4085-4095.
- Dwyer, C., y Bornett, H. (2004). Chronic stress in sheep: assessment tools and their use in different management conditions. *Animal Welfare*, 13(3), 293–304.
- Farfán Bellido, R., Llantoy Quispe, F., Quintanilla Reyes, C., & León Peralta, M. J. (2023). Programa Mindfulness para prevenir el estrés académico en estudiantes de Educación Superior. *Revista Educación*, 21(21), 61-77.
- Gentry, A. (2003). Usage of 17 specific names based on wild species which are predated by or contemporary with those based on domestic animals

(Lepidoptera, Osteichthyes, Mammalia): conserved. *Bull. Zool. Nom*, 60, 81–84.

- González y Albarrán, O., y Fraile, J. (2000). Fisiología de las glándulas suprarrenales. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 8(21), 1097–1101.
- Kovács, K. J. (2008). Measurement of Immediate-Early Gene Activation- c-fos and Beyond. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 665–672.
- Kubota, N., Sakata, y., Miyazaki, N., Itamoto, K., Bannai, H., Nishikawa, & Inokuma, H. (2008). Serological Survey of Neospora caninum Infection among Dogs in Japan through Species-Specific ELISA. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70(8), 869–872.
- Larios-Cueto, S., Ramírez-Valverde, R., Aranda-Osorio, G., Ortega-Cerrilla, M. E., & García-Ortiz, J. C. (2019). Indicadores de estrés en bovinos por el uso de prácticas de manejo en el embarque, transporte y desembarque. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 10(4), 885–902.
- Leme, T., Amadeu, C., Vilela, R., Fantianto, P., Esteves, S., & Pereira A. (2009). *CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOTECNIA*. Obtenido de <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/576955/1/PROCI2009.00091.pdf>
- Lexen, E., Nissel, H., Gaggl, G., & Grohmann, K. H. (2007). ¿Puede la acupuntura láser reducir la elevación post estrés de los metabolitos de glucocorticoides en las heces de ovino? . *Revista Internacional de Acupuntura*, 1(1), 8-14.
- Lier, V., Villegas, N., Carracelas, B., Minutti, A., Rodriguez - Blanquet, J., & Petrocelli, H. (2008). *Jornadas Uruguayas de Buiatría*. Obtenido de

https://bibliotecadigital.fvet.edu.uy/bitstream/handle/123456789/162/JB2008_255-256.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- López, G., Lona Díaz, V., Anguiano Serrano, B., Luna Muñoz, M., Morato Cartagena, T., & Romero Ramírez, C. M. (2012). Niveles sanguíneos de cortisol y receptores a glucocorticoides en hígado y placenta de cabras en diferentes etapas de la gestación. *Veterinaria México*, 43(3), 213–223.
- Marai, I. F., El-Darawany, A. A., Fadiel, A., & Abdel-Hafez, M. A. (2007). Physiological traits as affected by heat stress in sheep—A review. *Small Ruminant Research*, 71(1-3), 1-12.
- Möstl, E., & Palme, R. (2002). Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*, 23(1-2), 67-74.
- Nandam, L. S., Brazel, M., Zhou, M., & Jhaveri, D. J. (2020). Cortisol and Major Depressive Disorder—Translating Findings From Humans to Animal Models and Back. *Frontiers in Psychiatry*, 10.
- Ochoa, R. (2008). *Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicas*. La Habana: Finlay ediciones.
- Palacio, A. V., González, V. B., & Maya, G. C. (2020). Evaluación de la función del eje hipotálamohipófisis-adrenal en niños tratados con esteroides. *Medicina & Laboratorio*, 19(0304), 111–125.
- Rodríguez Álvarez, C., & Arias Bernal, L. (2005). Validación y aplicación de la prueba 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*, 1, 53-64.

- Romero Peñuela, M. H., Uribe-Velásquez, L. F., & Sánchez Valencia, J. A. (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.
- Silva, J. (03 de Julio de 2017). *Universidad de Cadiz*. Obtenido de Universidad de Cadiz :
<https://doi.org/https://dx.doi.org/10.25267/RevEurekaensendivulgcienc.2018.v15.i1.1104>
- SOUZA, Lenz, M., Uribe-Velasquez , y Ramos, L. (2001). *Universidad Estadual Paulista. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Reproducción Animal y Radiología Veterinaria. Botucatu. BR*. Obtenido de <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-306400>
- SOUZA, M., Uribe - Velásquez , L. F., y de Amorim, R. (2006). *Ciencia Animal Brasileira*. Obtenido de Souza, M. I. L., Uribe-Velásquez, L. F., de Amorim Ramos, A., & Oba, E. (2006). Níveis plasmáticos de colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (HDL) e cortisol, e sua biorritmicidade, em carneiros Ideal-Polwarth. *Ciência Animal Brasileira*, 7(4),
- Stanchi, N. (2010). Microbiología Veterinaria . En N. Stanchi, *Microbiología Veterinaria* (pág. 150). Argentina: Intermedica .
- Suárez, I. (2017). *Metodología ELISA para estudiar la estabilidad de medicamentos biotecnológicos. (Tesis doctoral)*. Universidad de Granada.
- TAPIA, K., Gallo, C., Manríquez, P., Raty, P., & Tadich, N. (2007). *Resúmenes del XXXII Congreso de la Sociedad Chilena de Producción Animal*. Obtenido de http://puntoganadero.cl/imagenes/upload/_5cc89ef91a846.pdf

Torres, J. S., Amézquita, C. A., & López, J. A. (2013). Ritmo circadiano: el reloj maestro. Alteraciones que comprometen el estado de sueño y vigilia en el área de la salud. *Morfología*, 5(3).

7. ANEXOS

7.1. Datos Obtenidos en esta investigación.

Tabla de datos obtenidas en el lector de micro placas a 450nm Ovinos Machos y Hembras.

Machos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	1,706	1,352	1,373	0,514	1,127	1,621	1,611	1,115	1,350	1,634	1,222	0,998	0,819
B	1,197	0,929	1,477	0,763	0,879	1,042	1,127	0,672	1,464	1,493	1,387	1,342	1,524
C	0,348	0,976	1,008	1,038	1,056	1,601	1,460	1,016	1,620	1,425	1,074	1,181	1,262
D	0,967	1,084	1,590	0,801	0,826	1,264	0,967	0,785	1,173	1,090	1,366	0,952	1,096
E	1,153	1,063	1,258	1,183	0,803	1,648	1,473	1,117	1,407	1,278	1,353	1,053	
F	1,087	0,676	1,115	0,701	1,052	1,352	1,336	0,967	0,670	1,431	1,385	1,287	
G	1,068	0,915	1,565	1,389	1,093	1,259	1,144	1,494	1,690	1,054	1,290	1,455	
H	1,114	1,299	1,438	1,346	1,106	1,305	1,842	1,379	1,502	1,538	0,803	1,136	

Hembras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	2,467	1,158	1,124	1,661	1,342	1,644	1,176	1,167	1,457	1,419	1,417	1,422	0,845
B	1,816	1,279	1,045	1,352	1,696	1,196	1,724	1,344	0,946	1,576	1,411	1,767	0,616
C	1,098	1,592	0,990	1,547	1,632	1,641	1,414	1,205	0,982	1,260	1,520	1,506	0,399
D	0,687	1,485	1,336	1,493	1,432	1,471	1,643	1,665	0,421	1,529	1,276	1,514	0,987
E	0,476	1,475	1,193	1,821	1,217	1,605	1,610	1,633	1,704	1,363	1,248	1,447	
F	0,224	1,175	1,484	1,210	1,465	1,450	1,654	1,347	1,448	1,486	1,272	1,361	
G	1,135	0,654	1,548	0,383	1,609	1,659	1,576	1,456	1,474	1,268	1,582	1,186	
H	1,782	1,517	1,096	1,423	1,624	1,150	1,089	1,365	1,380	1,283	1,337	1,647	

Tabla de Cortisol: Ovinos Machos

Concentración de cortisol en µg/dL									
0,294	2,603	1,368	0,976	0,449	0,796	1,901	0,321	1,491	1,641
1,581	2,047	1,909	1,096	2,248	2,656	2,656	0,698	0,982	2,746
14,608	2,146	0,561	1,858	0,488	0,765	0,716	0,424	2,094	2,194
2,656	5,217	0,850	3,233	1,348	1,125	1,003	0,718	1,039	1,274
1,751	2,982	8,127	2,179	0,398	1,787	1,084	0,882	1,076	0,808
2,033	1,236	4,222	3,646	1,079	0,077	0,786	2,020	0,987	1,820
2,122	1,020	2,269	3,845	1,364	1,909	0,451	1,302	1,264	3,705
1,913	0,755	3,862	2,199	1,217	5,270	1,672	0,867	3,845	0,648
1,079	2,425	1,634	2,006	0,468	2,382	0,929	2,189	2,479	1,354
2,890	0,510	4,903	1,948	1,858	4,009	5,297	0,618	1,107	1,993

Tabla de Cortisol Hembras.

Concentración cortisol en µg/dL									
-0,599	0,506	1,596	12,682	0,405	0,911	0,426	0,762	0,903	0,689
0,116	0,737	0,739	0,888	1,585	0,407	1,093	1,001	0,918	0,671
1,984	0,760	0,597	1,107	0,411	0,470	0,806	0,898	0,657	0,827
5,076	1,664	1,993	0,311	0,770	0,386	1,042	0,538	1,309	1,053
9,148	5,517	0,374	0,428	0,480	0,538	0,803	1,361	1,401	1,623
27,837	0,664	1,079	0,865	0,820	2,024	2,783	0,638	1,322	0,399
1,824	1,871	0,599	1,509	0,377	1,696	2,569	1,048	0,526	3,491
0,168	2,234	0,718	0,784	1,763	1,102	11,015	0,734	1,122	6,092
1,731	2,524	0,108	0,472	1,661	1,552	0,297	1,335	0,890	11,934
1,299	1,125	1,534	0,443	0,263	0,366	0,825	1,286	0,192	2,541

7.2. Fotos.

Fotos 1. Muestras de Suero Plasmático de 200 Animales 100 Machos y 100 Hembras.

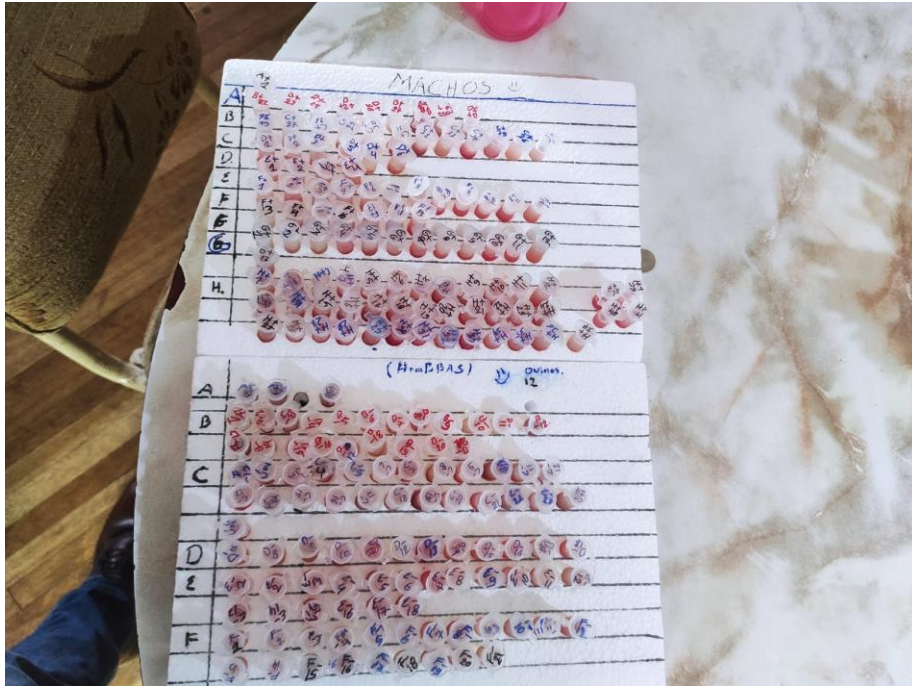


Foto 2. Kits de Elisa para medición de cortisol.

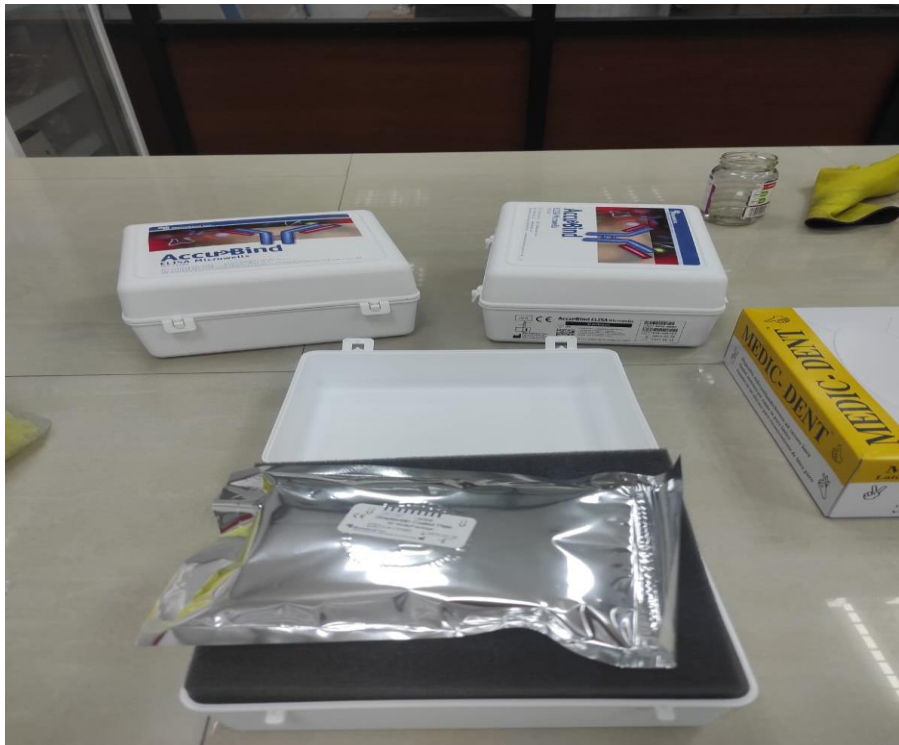


Foto 3. Pipeteo de Cada muestra de plasma en pocillos.



Foto 4. Preparación para Lavados de la muestra.



Foto 5. Equipo de Elisa con la primera micro placa

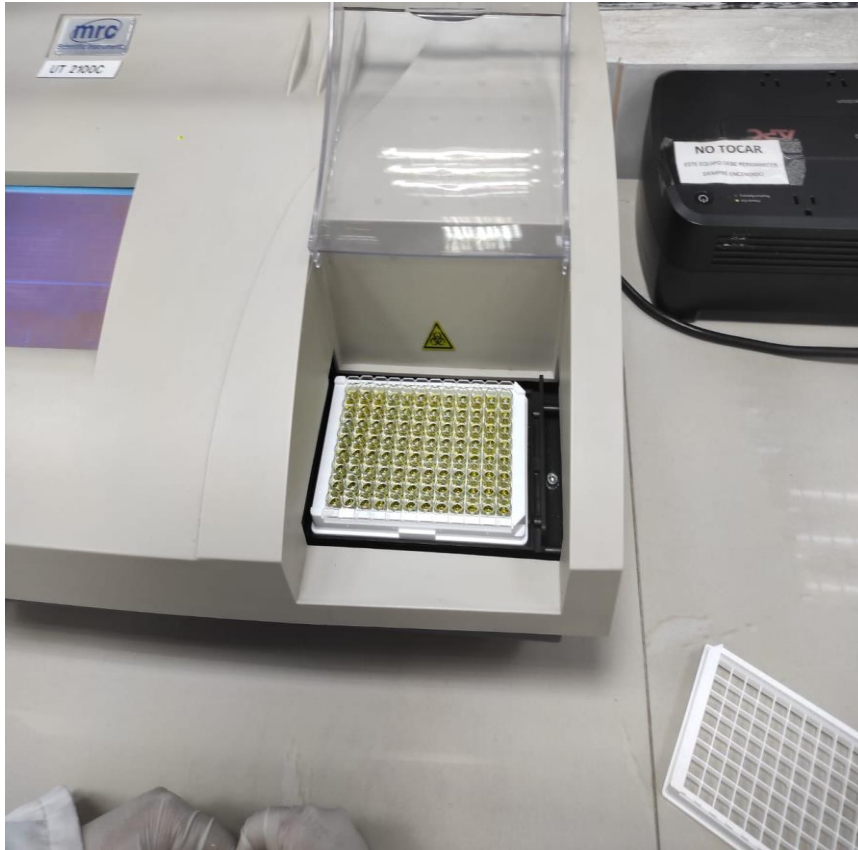


Foto 6. Tres Micro Placas de Cortisol con suero de Ovinos.

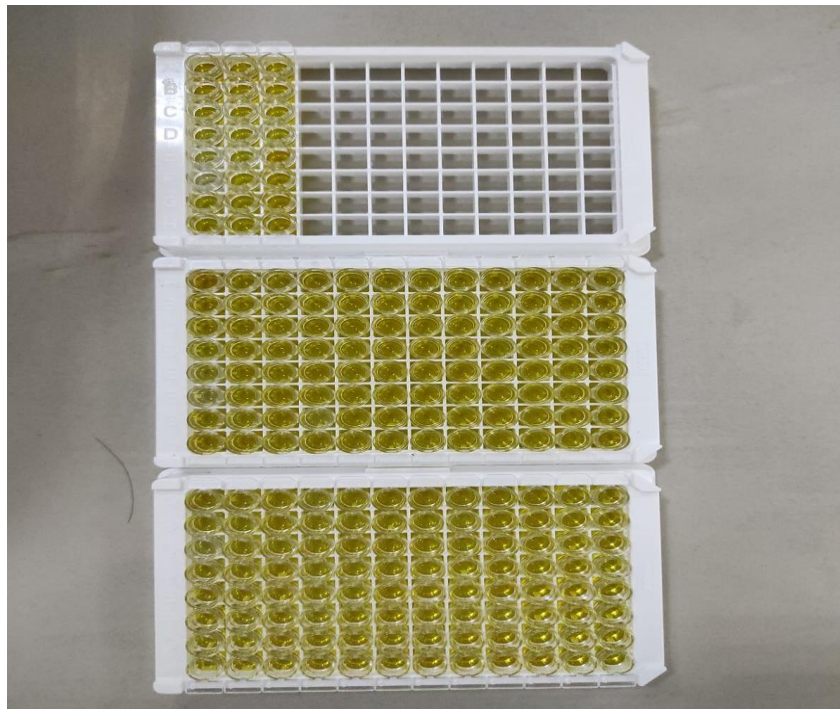


Foto 7. Ovino de Raza Merino.

