



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES SANGUÍNEOS DE CORTISOL EN EQUINOS
(EQUUS CABALLUS) APARENTEMENTE SANOS EN CONDICIONES DE ALTITUD

Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Médica Veterinaria Zootecnista

AUTORA: BERNARDA GONZÁLEZ CARVALLO

TUTOR: DR. JUAN LEONARDO MASACHE MASACHE, Mgtr.

Cuenca - Ecuador

2023

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

Yo, Bernarda González Carvallo con documento de identificación N° 0106435522, manifiesto que:

Soy la autora 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, 23 de mayo del 2023

Atentamente,



Bernarda González Carvallo

0106435522

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

Yo, Bernarda González Carvallo con documento de identificación N° 0106435522, 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 autora del Trabajo experimental: “Determinación de los niveles sanguíneos de cortisol en equinos (Equus caballus) aparentemente sanos en condiciones de altitud”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Médica Veterinaria 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, 23 de mayo del 2023

Atentamente,



Bernarda González Carvallo

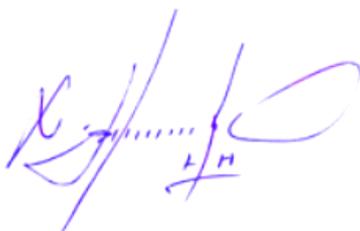
0106435522

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 LOS NIVELES SANGUÍNEOS DE CORTISOL EN EQUINOS (EQUUS CABALLUS) APARENTEMENTE SANOS EN CONDICIONES DE ALTITUD, realizado por Bernarda González Carvallo con documento de identificación N° 0106435522, 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, 23 de mayo del 2023

Atentamente,

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

Dr. Juan Leonardo Masache Masache, Mgtr.

1103109003

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres y hermanas, que me apoyaron durante toda mi carrera, y en especial a mis abuelos Alejandrino y Clemencia que, sin la ayuda de ellos, la culminación de esta etapa no habría sido posible.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis profesores a lo largo de toda mi carrera universitaria, de manera especial a mi director de tesis MVZ. Juan Leonardo Masache Masache, por ser un guía en el proceso de este trabajo de grado.

Un especial agradecimiento a la hacienda “Ondococha” propiedad de Bernardo González Merino, que ha abierto sus puertas en todo mi periodo universitario en donde he podido realizar prácticas y obtener conocimientos adicionales con relación a mi carrera universitaria.

A mi compañera Kenya Noemí Cabrera Machuca, que estuvo conmigo desde el inicio de la carrera hasta el final de la misma por su ayuda y gran persona que es.

INDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 14 |
| ABSTRACT..... | 15 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 16 |
| 1.1 Problema..... | 16 |
| 1.2 Delimitación | 17 |
| 1.2.1 Temporal | 17 |
| 1.2.2 Espacial | 17 |
| 1.2.3 Académica..... | 18 |
| 1.3 Explicación del problema..... | 18 |
| 1.4 Objetivos | 18 |
| 1.4.1 Objetivo general..... | 18 |
| 1.4.2 Objetivos específicos | 18 |
| 1.5 Hipótesis | 18 |
| 1.5.1 Hipótesis alternativa..... | 18 |
| 1.5.2 Hipótesis nula..... | 18 |
| 1.6 Fundamentación teórica | 19 |
| 2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO DOCUMENTAL..... | 20 |
| 2.1 Equinos | 20 |
| 2.2 Cortisol..... | 20 |
| 2.2.1 Niveles altos de cortisol | 22 |
| 2.2.2 Metabolismo del cortisol..... | 22 |

| | |
|--|----|
| 2.2.4 Regulación de la secreción de cortisol: Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal | 23 |
| 2.3 Hiperadrenocorticismo..... | 24 |
| 2.3.1 Concepto | 24 |
| 2.3.1.1 Enfermedad de Cushing..... | 24 |
| 2.3.1.2 Diagnostico de la enfermedad de Cushing..... | 24 |
| 2.3.2 Epidemiología..... | 24 |
| 2.4 Estrés..... | 25 |
| 2.4.1 Definición de estrés..... | 25 |
| 2.4.2 Estrés en el equino. | 26 |
| 2.4.3 Factores que articulan la respuesta de estrés..... | 26 |
| 2.5 Técnicas para determinar el cortisol | 28 |
| 2.5.1 Técnica de ELISA..... | 28 |
| 2.5.2 ELISA cuantitativa..... | 28 |
| 2.6. Tipos de ELISA | 29 |
| 2.6.1 ELISA indirecta | 29 |
| 2.6.2 ELISA directa | 29 |
| 2.6.3 ELISA sándwich | 29 |
| 2.6.4 ELISA Competitivo | 30 |
| 2.7 Cortisol accubind ELISA- IFU rev 4 | 30 |
| 2.8 Factores clave en el desarrollo de ELISA..... | 31 |
| 2.8.1 Adsorción..... | 31 |

| | |
|--|----|
| 2.8.2 Unión y lavados | 32 |
| 2.8.3 Tiempos de incubación y temperatura | 32 |
| 2.8.4 Enzimas y sustratos..... | 32 |
| 2.8.5 Anticuerpos y antígenos empleados..... | 32 |
| 2.8.6 Detectores | 33 |
| 2.9 Resumen del estado del arte del problema..... | 33 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 34 |
| 3.1 Materiales..... | 34 |
| 3.1.1 Físicos | 34 |
| 3.1.2 Biológicos | 35 |
| 3.1.3 Químicos | 35 |
| 3.1.4. Recursos humanos | 35 |
| 3.2 Método | 36 |
| 3.3 Diseño estadístico | 36 |
| 3.4 Población y muestra..... | 36 |
| 3.5 Obtención de muestras sanguíneas | 37 |
| 3.6 Procedimiento para realizar la técnica de ELISA cuantitativa | 37 |
| 3.7 Procedimiento para realizar la prueba de cortisol..... | 37 |
| 3.8 Variables | 39 |
| 3.8.1 Variables independientes | 39 |
| 3.8.2 Variables dependientes | 39 |

| | |
|---|----|
| 3.9 Toma y registro de datos..... | 39 |
| 3.10 Consideraciones éticas..... | 39 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | 43 |
| 4.1. Resultados..... | 43 |
| 4.1.1. Valores de cortisol en Machos..... | 43 |
| 4.1.1.1. Datos obtenidos en el análisis estadístico en machos..... | 47 |
| 4.1.1.2. Discusión..... | 48 |
| 4.1.2. Valores de cortisol en Hembras..... | 48 |
| 4.1.2.1. Datos obtenidos en el análisis estadístico en equinos hembras..... | 51 |
| 4.1.2.2. Discusión..... | 52 |
| 4.1.3. Media aritmética..... | 52 |
| 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 54 |
| 5.1. Conclusión..... | 54 |
| 5.2. Recomendaciones..... | 54 |
| 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 56 |
| 7. ANEXOS..... | 62 |
| 7.1. Datos obtenidos en esta investigación..... | 62 |
| 7.2. Fotos..... | 64 |

ÍNDICE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ubicación: Universidad Politécnica Salesiana, Sede-Cuenca | 17 |
| Figura 2. Corteza suprarrenal..... | 20 |
| Figura 3. Ritmo circadiano. | 21 |
| Figura 4. Ruta crítica del estrés en la reproducción..... | 25 |
| Figura 5. Ecuación de inmunoensayo enzimático competitivo. | 31 |
| Figura 6. Ilustración de la curva estándar (ejemplo)..... | 41 |
| Figura 7. Curva estándar de los datos de absorbancia y valores de cortisol en $\mu\text{g/dL}$ (machos) | 44 |
| Figura 8. Dispersión de líneas rectas y marcadores. (Machos)..... | 44 |
| Figura 9. Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 100 equinos machos. | 45 |
| Figura 10. Curva estándar de los datos de absorbancia y valores de cortisol en $\mu\text{g/dL}$ (hembras). | 49 |
| Figura 11. Dispersión de líneas rectas y marcadores. (Hembras)..... | 49 |
| Figura 12. Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 100 equinos hembras..... | 50 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Materiales físicos | 34 |
| Tabla 2. Biológicos | 35 |
| Tabla 3. Químicos | 35 |
| Tabla 4. Recursos humanos | 35 |
| Tabla 5. Variables independientes: Animales..... | 39 |
| Tabla 6. Variables dependientes: ELISA Cuantitativa | 39 |
| Tabla 7. Primera placa de microtitulación analizadas en el Lector automático de Microplacas ELISA: absorbancia a 450nm: curva de absorbancia (6/6); plasma de equinos machos (100/100)..... | 43 |
| Tabla 8. Niveles de cortisol: Machos..... | 46 |
| Tabla 9. Análisis estadístico en machos | 47 |
| Tabla 10. Segunda placa de microtitulación analizadas en el Lector de Microplacas ELISA: absorbancia a 450nm: curva de absorbancia (6/6); plasma de equinos hembras (100/100). ... | 48 |
| Tabla 11. Niveles de cortisol: Hembras | 51 |
| Tabla 12. Análisis estadístico en hembras | 51 |
| Tabla 13. Análisis de medias en equinos machos y hembras. | 53 |

RESUMEN

En la Ciudad de Cuenca se realizó la valoración de los niveles de cortisol en equinos aparentemente sanos mediante la técnica de ELISA cuantitativa, cuya práctica se llevó a cabo en el laboratorio de la Clínica Veterinaria Polivet de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede-Cuenca. La muestra fue de 200 equinos, 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 equinos de 6,731 ug/dL y 7.117 ug/dL en hembras siendo un valor referencia útil en laboratorios clínicos veterinarios a nivel de altura.

ABSTRACT

In the city of Cuenca, the assessment of cortisol levels in apparently healthy horses was carried out using the quantitative ELISA technique, which was carried out in the laboratory of the Polivet Veterinary Clinic of the Salesian Polytechnic University, Headquarters-Cuenca. The sample consisted of 200 horses, 100 males and 100 females, respectively. 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 of 6,731 ug/dL in horses and 7,117 ug/dL in females was obtained, being a useful reference value in veterinary clinical laboratories at high altitude.

1. INTRODUCCIÓN

A nivel de altura se tiene poca información actualizada en respecto a valores referenciales del cortisol a diferencia de valores que se tiene a nivel del mar lo cual podría llevar a diagnósticos erróneos, la valoración del cortisol realizada en esta tesis brinda una ventaja al médico veterinario que buscan actualizarse en este tipo de conocimiento para poder interpretar mejor los resultados de estudios médicos y tomar decisiones con más criterio.

El mantenimiento de la salud de los equinos constituye un factor esencial y un pilar fundamental en las explotaciones o lugares en donde se mantienen estos animales por lo que, al ser una especie muy sensible al estrés, una respuesta aguda de estrés induce un aumento en las concentraciones de cortisol plasmáticas (Alexander et al., 1996).

El análisis de cortisol en equinos es limitada en nuestras localidades geográficamente en altitud si no se tienen valores referenciales propios de la localidad donde se encuentren nuestros pacientes debido a factores como: raza, sexo, edad, sanidad, nutrición, actividad física, estado de excitación, momento de la toma de muestra, temperatura ambiental y la altitud de la zona.

En el siguiente trabajo de investigación nos permitirá obtener valores totalmente propios como referencia en zonas con condiciones de altitud cuyo análisis se dará mediante la prueba de ELISA cuantitativo.

1.1 Problema

El análisis del cortisol en equinos como indicador de estrés nos da información sobre las alteraciones de la producción en la adaptación por estrés fisiológico, patológico y ambiental. El análisis de cortisol hoy en día es muy utilizada para la prevención de enfermedades críticas, también como indicador del nivel de acondicionamiento y rendimiento atlético.

La provincia del Azuay se encuentra en la zona de la cordillera de los andes y no contamos con valores referenciales de los niveles de cortisol en plasma de equinos en condiciones de altitud lo cual podría variar en los resultados de laboratorio y la interpretación de las mismas.

El cortisol es un biomarcador del estrés lo cual en términos de bienestar animal que refiere al estado de salud de nuestro paciente equino en condiciones de su entorno de bienestar se está sano, cómodo, bien alimentado, con buena condición corporal, buen comportamiento y que no padezca de miedo y desasosiego.

1.2 Delimitación

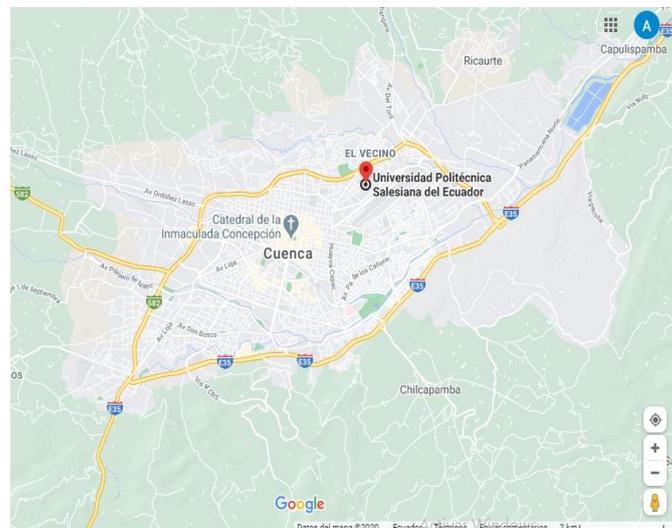
1.2.1 Temporal

El proceso de investigación 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 $2^{\circ}39'$ a $3^{\circ}00'$ de latitud sur y $78^{\circ}54'$ a $79^{\circ}26'$ 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 Sígsg (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, lo cual será aplicado en equinos (*Equus caballus*), obteniéndose valores de referencia óptimos para mejorar la interpretación de los resultados de laboratorio tanto para estudiantes y Médicos Veterinarios de la zona.

1.3 Explicación del problema

La prueba del cortisol aporta a obtener un diagnóstico más preciso en nuestros pacientes equinos, cuyas pruebas son muy limitadas en nuestro medio debido a la falta de valores referenciales en condiciones de altitud.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

- Determinar los niveles de cortisol en equinos (*Equus caballus*) aparentemente sanos mediante la técnica de ELISA cuantitativo en condiciones de altitud.

1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de cortisol sanguíneo de equinos (*Equus caballus*) en condiciones de altitud sobre los 2500 m.s.n.m.
- Evaluar la relación de los niveles de cortisol y estrés en los equinos.
- Obtener promedios de valores referenciales de cortisol sanguíneo en equinos.

1.5 Hipótesis

1.5.1 Hipótesis alternativa

Los resultados de los niveles de cortisol en equinos (*Equus caballus*) aparentemente sanos obtenidos en la investigación, varían de los valores referenciales.

1.5.2 Hipótesis nula

Los resultados de los niveles de cortisol en equinos (*Equus caballus*) 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 conocer la valoración de los niveles de cortisol en equinos (*Equus caballus*), 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 los niveles de cortisol y cómo influye en la salud de los equinos (*Equus caballus*).

2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO DOCUMENTAL

2.1 Equinos

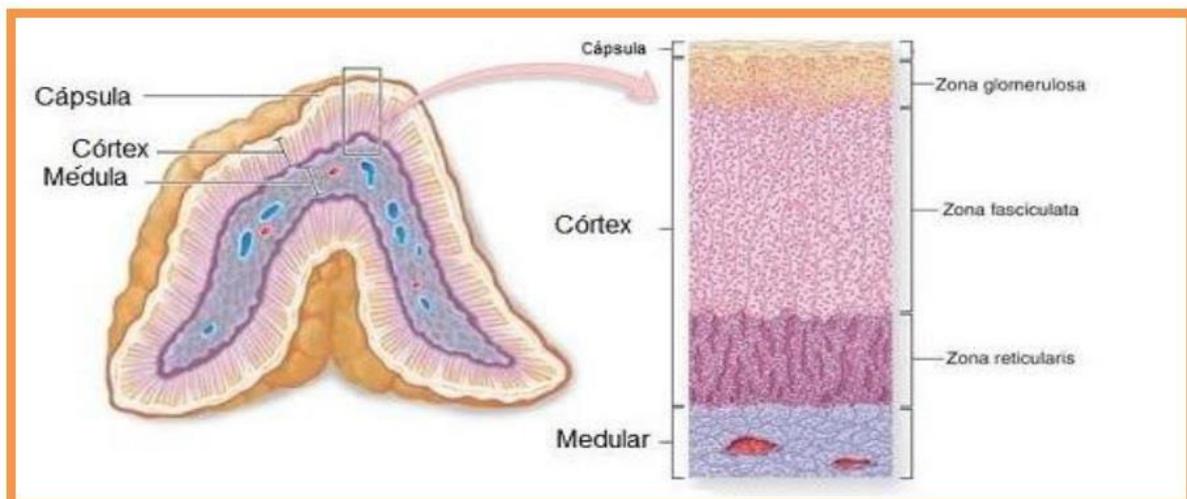
Los equinos son uno de los animales que tienen gran relevancia en la producción agrícola desde que fueron domesticados hace miles de años han servido en el beneficio para la humanidad por lo que son utilizados para el trabajo, deporte, terapia o crianza por cariño a estos animales.

2.2 Cortisol

El cortisol es el esteroide circulante más abundante y el glucocorticoide más importante secretado por la corteza suprarrenal. El cortisol es fisiológicamente efectivo en la mantención de la presión sanguínea y la actividad anti inflamatoria. La medición del cortisol en la sangre puede utilizarse como un indicador de la función suprarrenal y el diagnóstico diferencial entre la enfermedad de Addison y la enfermedad de Cushing así como la hiperplasia suprarrenal y el carcinoma.

La corteza suprarrenal consta de tres zonas, la primera es la zona glomerulosa sintetiza aldosterona, el mineralocorticoide, la segunda es la zona fascicular produce cortisol, y la zona reticular sintetizan las hormonas sexuales suprarrenales, principalmente andrógenos.

Figura 2. Corteza suprarrenal



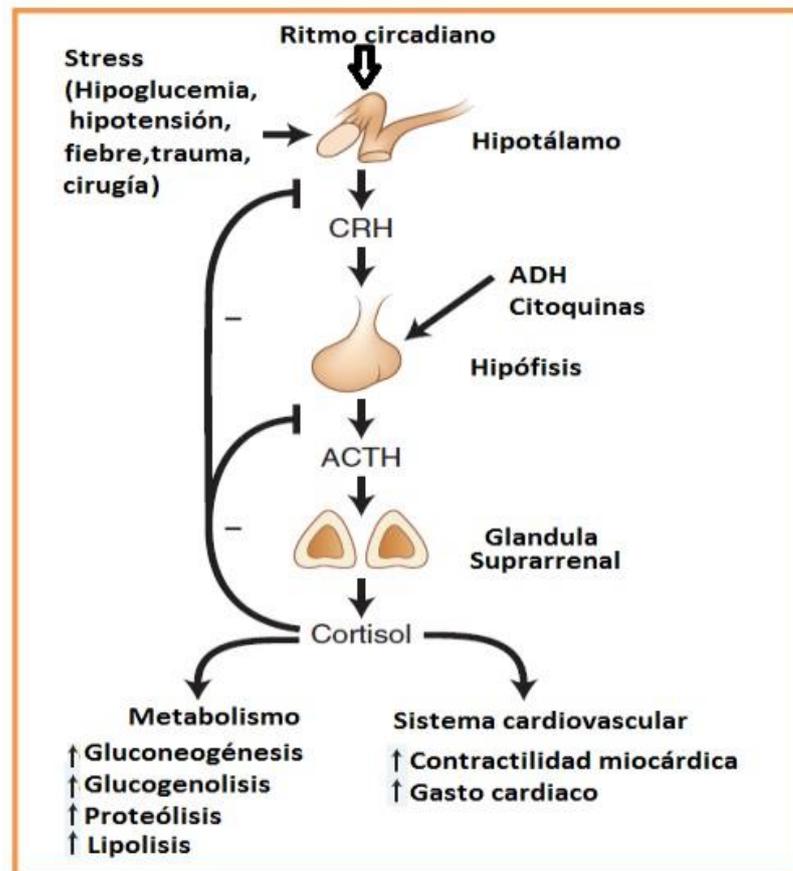
Fuente: (Brandan, 2014)

La vida media del cortisol es de unos 90 minutos y su concentración en plasma es de 10-20 μ g/dL.

El cortisol circula en su mayoría unido a una proteína transportadora transcortina CBG (corticosteroid-binding globulin) y sólo un 5% circula libre (0,2- 0,5 μ g/dL), pero se une a la albúmina si su concentración es muy alta. La CBG aumenta con los estrógenos, en la hepatitis y en la preñez, la nefrosis y el hipertiroidismo. Su función no es esencial para las acciones del cortisol, ya que cuando aumenta o disminuye o incluso si está ausente el cortisol libre permanece normal, que es el verdaderamente activo.

El cortisol posee un ritmo circadiano, el primero de los descritos, con pico al amanecer y disminuye a las 23:00h, algo posterior al de la ACTH, de la que es secundario, que a su vez está controlado por el hipotálamo y el SNC.

Figura 3. Ritmo circadiano.



Fuente: (Brandan, 2014)

2.2.1 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).

“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).

En el día a día de la clínica médica deportiva son frecuentes los periodos de descanso para la recuperación de los caballos enfermos, lo que invariablemente conduce a la pérdida de la condición física. De esta forma, cuando estos atletas regresan a las pistas, el descuido en determinar su condición atlética puede llevar a una reducción de la vida útil del atleta, ocasionando pérdidas económicas (Ferraz et al., 2007)

2.2.2 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).

La sensibilización del eje EHHA libera cortisol, el principal glucocorticoide producido por los caballos, que controla un amplio espectro de funciones metabólicas. Entre ellos destaca el metabolismo energético a través de la gluconeogénesis, hormona que inhibe la utilización de la glucosa por los tejidos, priorizando la movilización al sistema nervioso central (SNC) y permitiendo, durante el ejercicio, que la glucemia se mantenga constante. Según Wilmore y Costill (1994), este efecto previene la aparición de fatiga central.

.2.2.3 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).

2.2.4 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).

2.3 Hiperadrenocorticismo

2.3.1 Concepto

Síndrome de Cushing en caballos también llamada disfunción de la porción media de la glándula pituitaria, consiste en las consecuencias de la elevación crónica de cortisol. (Sgorbini M, 2004)

2.3.1.1 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).

El síndrome de Cushing en caballos se considera una enfermedad neurodegenerativa, con hiperplasia, hipertrofia o adenoma en la hipófisis.

Esta disfunción progresa lentamente, con el alto grupo de edad del animal considerado como el mayor factor de riesgo. Los signos clínicos son comúnmente vistos en caballos adultos y ancianos, con raras informes en caballos menores de 10 años. En estudios realizados en diferentes países, la prevalencia en caballos mayores de 10 años fue del 9,3% ; mayor de 15 años fue 21% y entre la población equina general fue 0.075-0.5% .

2.3.1.2 Diagnóstico de la enfermedad de Cushing

El diagnóstico definitivo requiere la asociación de la historia y los signos clínicos junto con los resultados de laboratorio. Entre las principales evaluaciones de laboratorio se encuentran el hemograma, la bioquímica, el análisis de orina y sobre todo la medición hormonal. (Messer N. 2006)

2.3.2 Epidemiología.

Puede ser un hiperadrenocorticismo iatrogénico o espontáneo. El primero Es la causa menos común y se da como consecuencia de un tratamiento farmacológico con glucocorticoides, corticoesteroides y medicamentos con progesterona o derivados mal pautado

y el segundo hiperadrenocorticismo espontáneo se da entre el 80% y el 90% de los casos y se deben a un tumor o una hipertrofia en la hipófisis.

2.4 Estrés

El término estrés describe el estado de un organismo bajo la influencia de factores externos e internos, que amenazan o alteran la homeostasis, y los cambios adaptativos que se producen como consecuencia de estos estímulos son cognitivos, conductuales y corporales. Una vez superado un determinado umbral de esfuerzo físico, se producirá un efecto sistémico con implicación de los sistemas nerviosos periférico y central, y especialmente se activa el sistema nervioso autónomo simpático y el eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal (HPA) (Graaf-Roelfsema et al., 2012). al., 2007).

Figura 4. Ruta crítica del estrés en la reproducción.

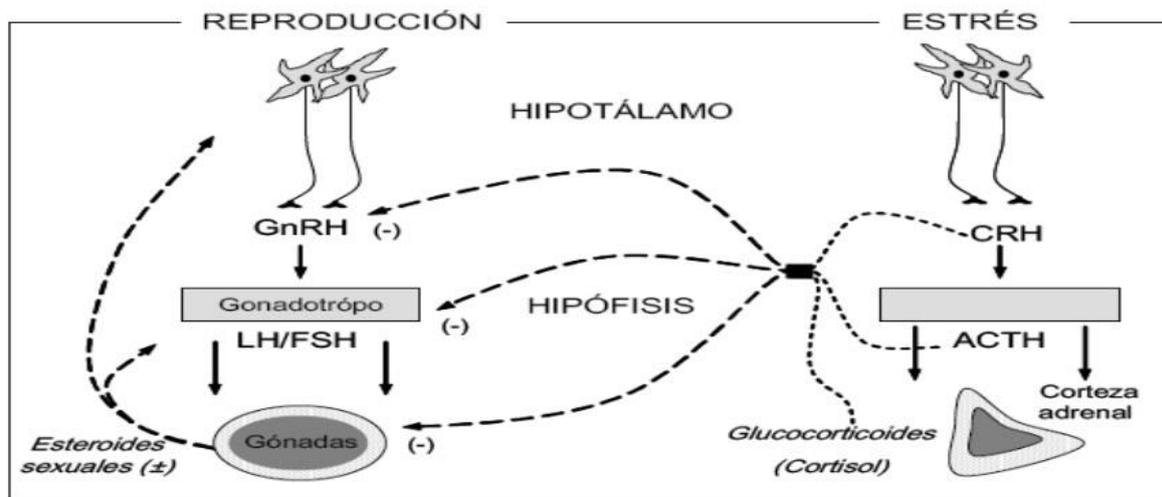


Figura 1. Sitios del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHA) en que el estrés puede afectar negativamente la secreción de GnRH, gonadotropinas y esteroides sexuales. La activación del eje (HHA) influye en la actividad de neuronas GnRH hipotalámicas, además de alterar la respuesta de los gonadotropos (hipófisis) a la acción de la GnRH. Además, el estrés puede afectar la retroalimentación de los esteroides sexuales en hipotálamo e hipófisis. Adaptado de Chrousos et al. (1998) y otros. (Negative effects of stress on the hypothalamus-pituitary-gonadal (HPG) axis. Activation of the HPG axis affects the activity of GnRH neurons and the response of the gonadotrophs to the action of GnRH. In addition, stress can affect the feedback of sexual steroids in hypothalamus and pituitary. Adapted from Chrousos et al. (1998)).

Fuente: (Córdova A. 2017)

2.4.1 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).

2.4.2 Estrés en el equino.

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).

Los resultados de algunos estudios (Lindner et al., 2002; Graaf-Roelfsema et al., 2007) indicaron que el entrenamiento puede afectar la concentración de cortisol plasmático antes, durante y después del ejercicio. Así, esta variable fisiológica podría contribuir como un indicador confiable para la evaluación de la aptitud física (Ferlazzo et al., 2006). La mayoría de las investigaciones científicas, que utilizan la especie equina como modelo experimental, comparan animales bien adiestrados y experimentados con aquellos que se inician en un adiestramiento específico para una determinada modalidad ecuestre. Cayado et al. (2006), al estudiar caballos ecuestres, demostraron que había una respuesta de estrés estándar, con diferentes etapas de entrenamiento que inducían diferentes efectos en el EHHA.

2.4.3 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).

El mecanismo exacto por el cual una respuesta de estrés crónica puede deprimir la producción de cortisol es incierto, pero una serie de recientes estudios en el caballo han

postulado la producción de un factor inhibidor relacionado con la ACTH central (Alexander et al. 1988, 1996).

2.4.4 Enfermedades causadas por estrés

En un estudio realizado en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Murcia se utilizaron 180 caballos remitidos con diversas patologías. En el grupo de inflamaciones agudas la media fue de 151.071 $\mu\text{g/dl}$. En los casos de diarrea la concentración media de cortisol plasmático fue de 22.277 $\mu\text{g/dl}$. En los casos de anemia crónica la concentración media de cortisol plasmático fue de 27.203 $\mu\text{g/dl}$. En el grupo de animales con anorexia también aparece disminuida la concentración media de cortisol (21.997 $\mu\text{g/dl}$) por causas similares al caso anterior. En los caballos sometidos a castración la concentración media de cortisol plasmático era de 25.053 $\mu\text{g/dl}$. En los casos diagnosticados como babesiosis la concentración media de cortisol plasmático era de 26.438 $\mu\text{g/dl}$. El grupo de animales con síndrome de Horner tiene una concentración media de cortisol plasmático de 36.476 $\mu\text{g/dl}$. Los casos de hernias umbilicales tuvieron una concentración media de cortisol plasmático de 36.638 $\mu\text{g/dl}$. En los animales que se trataron para reducir hernias postoperatorias de línea alba, la concentración media de cortisol plasmático era de 17.552 $\mu\text{g/dl}$. En los procesos de laminitis crónicas el valor medio cortisol plasmático fue 34.346 $\mu\text{g/dl}$. En los casos de enteritis proximal, la concentración media de cortisol plasmático es de 35.658 $\mu\text{g/dl}$. En los caballos con desplazamiento de colon mayor la concentración media de cortisol plasmático es de 49.400 $\mu\text{g/dl}$. En los casos de impactación de intestino grueso la concentración media de cortisol plasmático es de 70.935 $\mu\text{g/dl}$. En los casos de íleo idiopático la concentración media de cortisol plasmático es de 49.867 $\mu\text{g/dl}$. En los caballos con obstrucción estrangulada de intestino delgado la concentración media de cortisol es de 53.019 $\mu\text{g/dl}$. En caballos con obstrucción estrangulada de intestino grueso la concentración de cortisol era de 455.150 $\mu\text{g/dl}$. (Martos et al. 2003)

Una respuesta de estrés agudo induce un aumento en las concentraciones de cortisol plasmático por activación del eje hipotálamo-hipofisis-adrenal (HAP) (Alexander et al. 1996).

2.5 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).

2.5.1 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).

2.5.2 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).

2.6. Tipos de ELISA

2.6.1 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).

2.6.2 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).

2.6.3 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.).

2.6.4 ELISA Competitivo

“En esta técnica, el antígeno marcado con la enzima compete 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 enzimoanálisis competitivo la detectabilidad depende en gran medida de la constante de afinidad del anticuerpo para con su antígeno” (Castiñeiras & Queraltó, 1997, pp. 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).

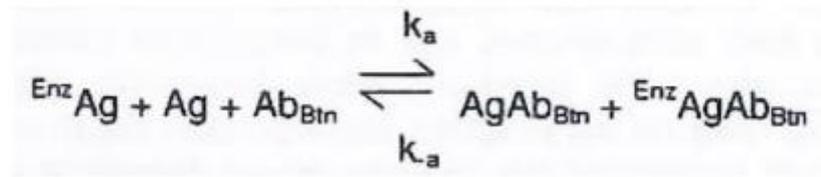
2.7 Cortisol accubind ELISA- IFU rev 4

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 5.

Figura 5. Ecuación de inmunoensayo enzimático competitivo.



Fuente: (AccuBind®ELISA 2019).

- Ac_{Btn} = Anticuerpo marcado con biotina (Cantidad constante)
- Ag = Antígeno nativo (Cantidad variable)
- Enz Ag = conjugado enzima-antígeno (cantidad constante)
- AgAc_{Btn} = complejo antígeno-anticuerpo
- $\text{Enz AgAc}_{\text{Btn}}$ = 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).

2.8 Factores clave en el desarrollo de ELISA

2.8.1 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).

2.8.2 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).

2.8.3 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, pueden 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).

2.8.4 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).

2.8.5 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).

2.8.6 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).

2.9 Resumen del estado del arte del problema

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).

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 |
| Equipo Lector de ELISA | Unidad | 1 |
| Tubos vacutainer | Caja | 1 |
| Kit de ELISA | Caja | 3 |

3.1.2 Biológicos

Tabla 2. *Biológicos*

| Descripción | Cantidad |
|--------------------|----------|
| Animales (equinos) | 200 |
| Sangre | 1ml |

3.1.3 Químicos

Tabla 3. *Químicos*

| Descripción | Unidad | Cantidad |
|--------------|--------|----------|
| Calibradores | Unidad | 1 |
| Reactivos | Unidad | 1 |

3.1.4. Recursos humanos

Tabla 4. *Recursos humanos*

| Nombre | Descripción |
|----------------------------|----------------|
| Dr. Juan Masache Masache | Tutor de tesis |
| Bernarda González Carvallo | 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 abarcó conceptos de media, rango, mediana, moda, varianza, desviación típica y coeficiente de variación, así como gráfica interpretativa.

3.4 Población y muestra

La investigación se inició mediante un examen clínico general para identificar pacientes sanos, es decir en 200 equinos, 100 hembras y 100 machos respectivamente, de los cuales se tomaron muestras sanguíneas para poder obtener el plasma y proceder a analizar mediante la técnica de ELISA cuantitativa y posterior a esto analizar los resultados. La siguiente practica tuvo lugar en el laboratorio de la Clínica Veterinaria Polivet de la Universidad Politécnica Salesiana., Sede Cuenca.

La fórmula utilizada en población infinita es la siguiente:

$$n = \frac{z^2 * p * q}{d^2}$$

- z = nivel de confianza 95%=1.96
- p = Probabilidad de que ocurra el evento
- $q=1- p$, probabilidad de que no ocurra el evento
- d = Error estimado 5%

$$n = \frac{(1.96)^2(0.15)(0.84)}{(0.05)^2} = 195.92 = 196$$

La población de ganado caballar en Azuay es de 29625 cabezas (INEC, 2014), se realizará la medición de células sanguíneas en 196 a 200 caballos machos y hembras aparentemente sanos ubicados en el Cantón Cuenca como muestras de la investigación.

3.5 Obtención de muestras sanguíneas

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular, utilizando una jeringa de 5 ml, por tal razón se depiló la zona del cuello luego de limpiar el surco yugular del caballo con una gasa empapada de alcohol, enseguida se procedió a realizar la punción en la vena para extraer 1ml de sangre que se colocó en un tubo vacutainer tapa roja sin anticoagulante.

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 Clínica Veterinaria Polivet 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 Variables

3.8.1 Variables independientes

Tabla 5. *Variables independientes: Animales*

| Concepto | Categorías | Indicadores | Variables |
|---|---|---|--|
| Equinos aparentemente sanos mediante la valoración de los niveles de cortisol | -Biológica: -Muestra de sangre -Hembra Macho | -Número de hembras de -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 |
|--------------------------------|--------------------|-------------------------|---|
| Cuantificación de anticuerpos. | -Muestra de sangre | de -Niveles de cortisol | de - Aumento de los niveles de cortisol - Disminución de los niveles de cortisol |

3.9 Toma y registro de datos

Se utilizaron fichas clínicas en donde se registró el género, el número de muestra, también se realizó el etiquetado y en una hoja de datos la absorbancia a 450nm que nos da el equipo 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 (Cardozo de Martínez y Osorio, 2008, p.50).

3.11. Valores referenciales de la bibliografía.

La media del Cortisol Sérico general determinada por ELISA tipo sándwich fue $13,3 \pm 7,4$ $\mu\text{g/dL}$. No hubo diferencias significativas atribuibles a género, edad o desempeño. (Zuluaga et al, 2017)

El cortisol plasmático fisiológico tomado como referencia es de $35 \mu\text{g/dl}$ (Santschi et al, 1991).

La concentración plasmática de cortisol varían dentro de un rango normal en mamíferos de alrededor de 4 a $16 \mu\text{g/dL}$, y muestran un ritmo circadiano, con concentraciones normales que aumentan durante las horas de sueño. (Larry E. 2012, p.45).

La concentración de cortisol sérico (SC) determinada por radioinmunoensayo e informado por Mair et al. (2014) en caballos con cirugía de cólicos ($15,68 \pm 8,27 \mu\text{g/dL}$) estuvo cerca de la media y rango obtenidos por sándwich ELISA en el “Colombian creole horse” CCH sin manifestación de abdomen agudo ni antecedente de enfermedad reciente. Este patrón confirma la necesidad de utilizar valores de referencia ajustados a poblaciones con diferentes condiciones de manejo, medio ambiente y tipo de actividad. Además, el trabajo realizado

requiere patrones particulares (es decir, se induce un cierto grado de hiperflexión dorsoventral del cuello para una mayor vistosidad y elegancia en CCH).

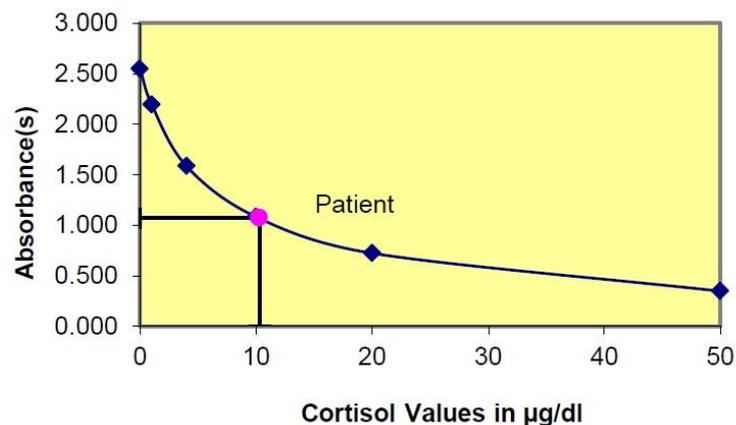
3.12. Unidades utilizadas para el cálculo de resultados

Las unidades que se utilizan para medir el cortisol son en ng/ml y en $\mu\text{g/dl}$, 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 $\mu\text{g/dl}$.

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 6. Ilustración de la curva estándar (ejemplo).



Fuente: AccuBind® ELISA 2019.

La figura 6 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 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 ug/dl en el eje horizontal de la gráfica.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

4.1. Resultados.

El análisis del cortisol en plasma de equinos 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.

4.1.1. Valores de cortisol en Machos.

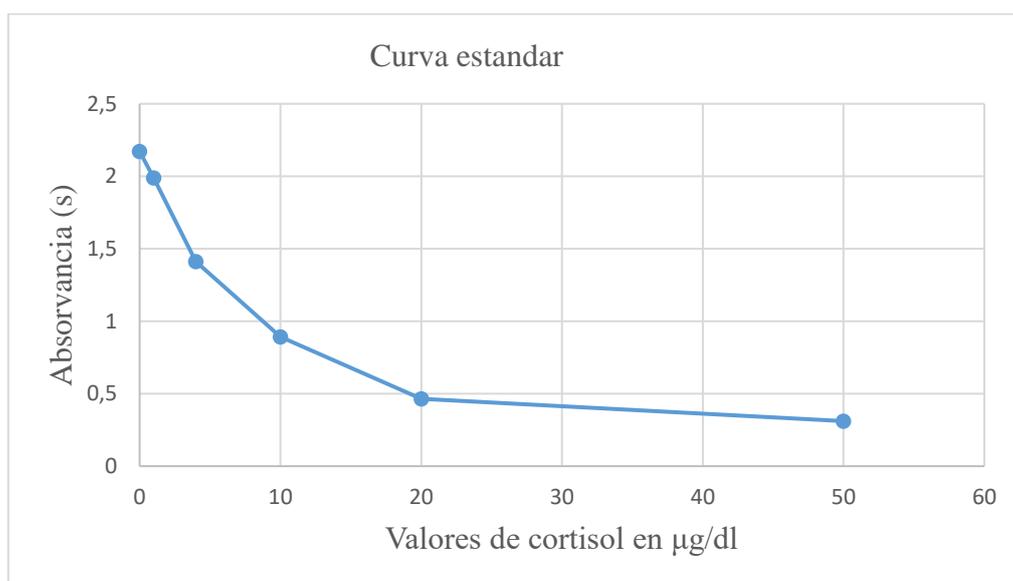
En el análisis del cortisol en plasma de equinos machos obtuvimos la siguiente tabla:

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

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 2,171 | 1,388 | 1,115 | 0,939 | 0,404 | 0,240 | 0,400 | 2,199 | 2,101 | 1,867 | 2,095 | 2,166 | 2,197 | 2,293 |
| B | 1,989 | 1,135 | 1,230 | 1,174 | 0,681 | 0,680 | 0,497 | 2,185 | 2,117 | 2,131 | 2,106 | 2,088 | 2,142 | 2,333 |
| C | 1,411 | 1,179 | 1,293 | 1,283 | 0,623 | 0,674 | 0,618 | 2,225 | 2,016 | 1,897 | 1,446 | 2,030 | 2,256 | |
| D | 0,892 | 1,028 | 0,900 | 0,816 | 0,793 | 0,617 | 0,307 | 2,260 | 2,229 | 2,097 | 1,982 | 2,015 | 2,255 | |
| E | 0,465 | 1,238 | 1,173 | 1,363 | 0,840 | 0,743 | 0,440 | 2,177 | 2,145 | 1,991 | 2,096 | 1,961 | 2,220 | |
| F | 0,311 | 1,462 | 1,105 | 1,114 | 0,613 | 0,583 | 0,802 | 2,310 | 2,156 | 2,049 | 2,077 | 2,239 | 2,261 | |
| G | 1,236 | 1,479 | 1,059 | 0,998 | 0,501 | 0,877 | 2,250 | 2,076 | 1,690 | 2,188 | 2,341 | 2,378 | 2,335 | |
| H | 1,592 | 1,189 | 0,966 | 0,588 | 0,727 | 0,394 | 2,266 | 2,286 | 2,174 | 2,168 | 2,020 | 2,242 | 2,209 | |

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

Figura 7. 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 8. Dispersión de líneas rectas y marcadores. (Machos).

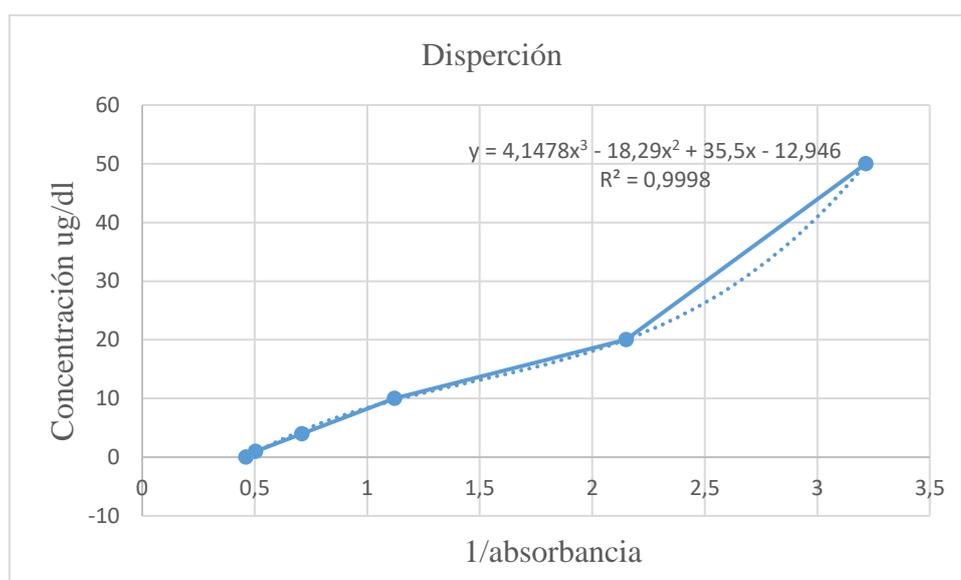
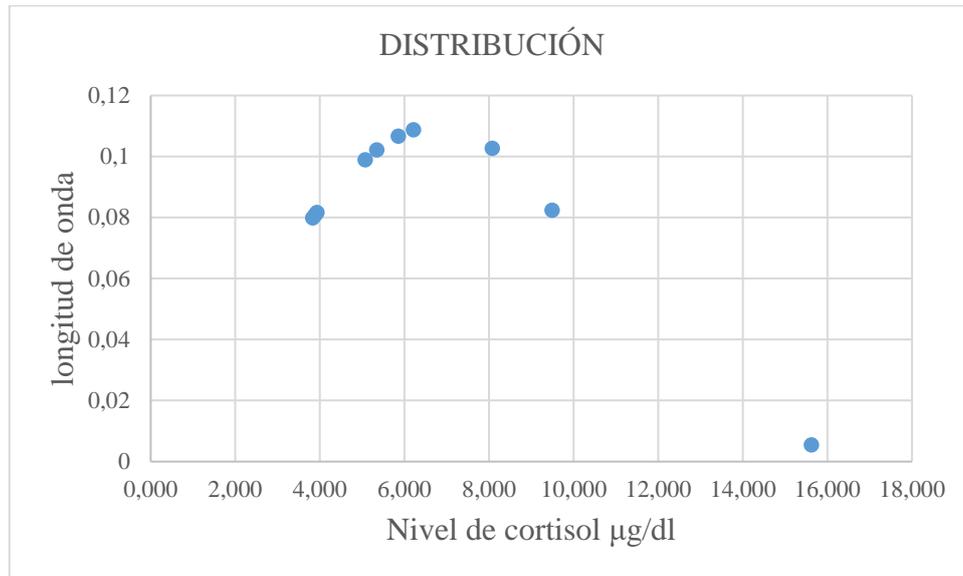


Figura 9. Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 100 equinos machos.



En la figura 9 observamos la representación gráfica de la media de los niveles de cortisol 6.731 µg/dL y la desviación estándar 3.62 referente de datos obtenidos del plasma de equinos 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 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 8. *Niveles de cortisol: Machos*

| Concentración de cortisol en µg/dL | | | | | | | | | |
|------------------------------------|-------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 6,000 | 7,173 | 5,576 | 10,393 | 9,902 | -0,195 | 0,669 | 0,796 | -0,796 | -0,186 |
| 3,164 | 6,055 | 10,724 | 14,299 | 27,150 | -0,132 | -0,326 | 0,505 | 0,649 | 0,063 |
| 4,688 | 5,488 | 4,892 | 18,028 | 26,301 | -0,309 | 0,049 | -0,146 | -0,047 | -0,443 |
| 6,971 | 9,608 | 7,183 | 12,074 | 18,224 | -0,460 | -0,001 | -0,056 | 0,316 | -0,438 |
| 6,537 | 6,595 | 8,435 | 117,479 | 14,182 | -0,096 | 2,515 | 0,283 | 0,599 | -0,287 |
| 8,098 | 7,276 | 14,930 | 12,897 | 51,980 | -0,669 | -0,083 | 0,231 | 0,674 | -0,464 |
| 5,982 | 7,760 | 25,769 | 13,010 | 21,955 | 0,374 | 1,459 | 4,229 | 0,951 | -0,771 |
| 4,106 | 8,805 | 12,878 | 14,205 | 10,923 | -0,569 | 0,114 | 0,842 | -0,370 | -0,239 |
| 3,977 | 9,126 | 14,066 | 11,814 | -0,417 | 0,255 | 1,293 | 0,278 | -0,943 | -0,599 |
| 6,441 | 6,586 | 11,053 | 15,066 | -0,485 | 0,179 | 0,273 | 0,369 | -0,383 | -0,763 |

Los datos negativos que tenemos en la tabla pueden estar relacionado a tomas de muestra de sangre alterada al momento de la toma, también puede estar relacionado al estrés crónico motivo de alguna enfermedad, al aumento del tamaño de la glándula adrenal por presencia de masas tumorales o disminución del tamaño de la glándula en equinos con hipoadrenocorticismos.

Sí es posible, que otras formas de respuesta de estrés crónico, como puede ser la inducida por cojeras prolongadas o ambientes de estabulación adversos puedan deprimir la producción de cortisol en el caballo y, más importante, inhibir el aumento natural de cortisol durante periodos subsecuentes de estrés agudo. Los niveles de cortisol total pueden aumentar o disminuir durante el estrés crónico, lo cual sugiere que la variación puede estar relacionada con factores propios de cada especie animal o la naturaleza de los estímulos. Por ejemplo, la secreción de ACTH requiere de AVP y CRH en el ganado, mientras que la AVP (arginina vasopresina) fue menos importante en el hombre y en el caballo (Alexander et al., 1996).

4.1.1.2. Datos obtenidos en el análisis estadístico en machos.

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

Tabla 9. *Análisis estadístico en machos*

| MACHOS | VALOR |
|------------|---------|
| Media | 6,731 |
| Rango | 106.252 |
| Mediana | 3,158 |
| Moda | #N/A |
| Varianza | 191,230 |
| Desviación | 13,829 |
| Coficiente | 5,725 |

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 106.252 en machos expresa la diferencia entre valor mínimo -0,943 y máximo 117,479 en cada variable de estudio.

La mediana es de 3,158 en machos.

La moda no existe si ningún número se repite 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 191,230 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 13,829 está disperso con respecto a la media aritmética en cada variable.

El coeficiente de variación en machos es de 5,725 % 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 equinos, se obtuvo una media de 6,731 $\mu\text{g/dL}$ que está dentro del rango de $13,3 \pm 7,4 \mu\text{g/dL}$ según Zuluaga (2017) estudio realizado con el mismo kit utilizado en esta investigación, dando por entender que los caballos del estudio gozan de bienestar y buena salud en condiciones de altitud, frente a esto también hacemos una comparación con la referencia dada por Santschi en 1991 con una media de 35 $\mu\text{g/dL}$ que está por debajo de este dato referencial.

4.1.2. Valores de cortisol en Hembras.

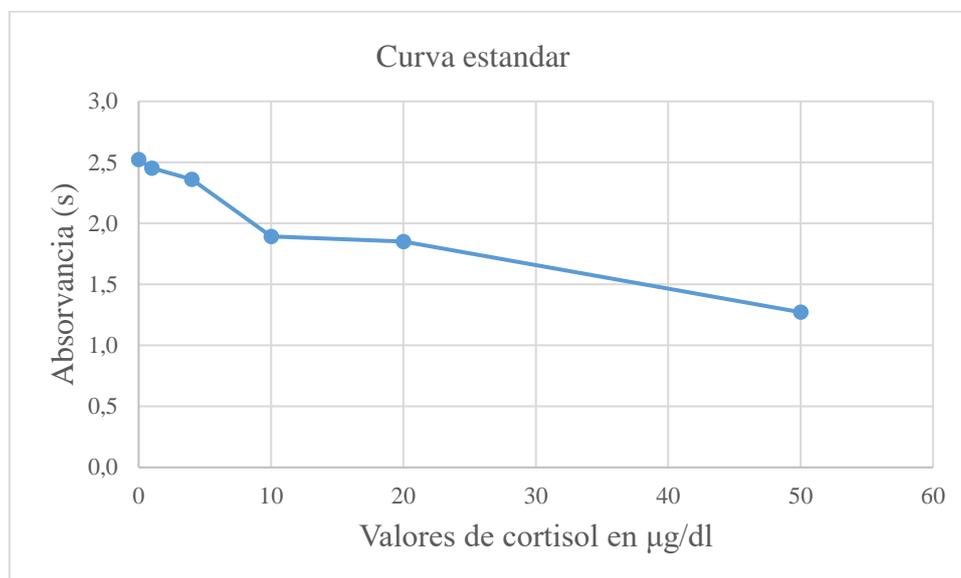
En el análisis del cortisol en plasma de equinos hembras obtuvimos la siguiente tabla

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

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 2,171 | 1,388 | 1,115 | 0,939 | 0,404 | 0,240 | 0,400 | 2,199 | 2,101 | 1,867 | 2,095 | 2,166 | 2,197 | 2,293 |
| B | 1,989 | 1,135 | 1,230 | 1,174 | 0,681 | 0,680 | 0,497 | 2,185 | 2,117 | 2,131 | 2,106 | 2,088 | 2,142 | 2,333 |
| C | 1,411 | 1,179 | 1,293 | 1,283 | 0,623 | 0,674 | 0,618 | 2,225 | 2,016 | 1,897 | 1,446 | 2,030 | 2,256 | |
| D | 0,892 | 1,028 | 0,900 | 0,816 | 0,793 | 0,617 | 0,307 | 2,260 | 2,229 | 2,097 | 1,982 | 2,015 | 2,255 | |
| E | 0,465 | 1,238 | 1,173 | 1,363 | 0,840 | 0,743 | 0,440 | 2,177 | 2,145 | 1,991 | 2,096 | 1,961 | 2,220 | |
| F | 0,311 | 1,462 | 1,105 | 1,114 | 0,613 | 0,583 | 0,802 | 2,310 | 2,156 | 2,049 | 2,077 | 2,239 | 2,261 | |
| G | 1,236 | 1,479 | 1,059 | 0,998 | 0,501 | 0,877 | 2,250 | 2,076 | 1,690 | 2,188 | 2,341 | 2,378 | 2,335 | |
| H | 1,592 | 1,189 | 0,966 | 0,588 | 0,727 | 0,394 | 2,266 | 2,286 | 2,174 | 2,168 | 2,020 | 2,242 | 2,209 | |

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

Figura 10. 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 11. Dispersión de líneas rectas y marcadores. (Hembras)

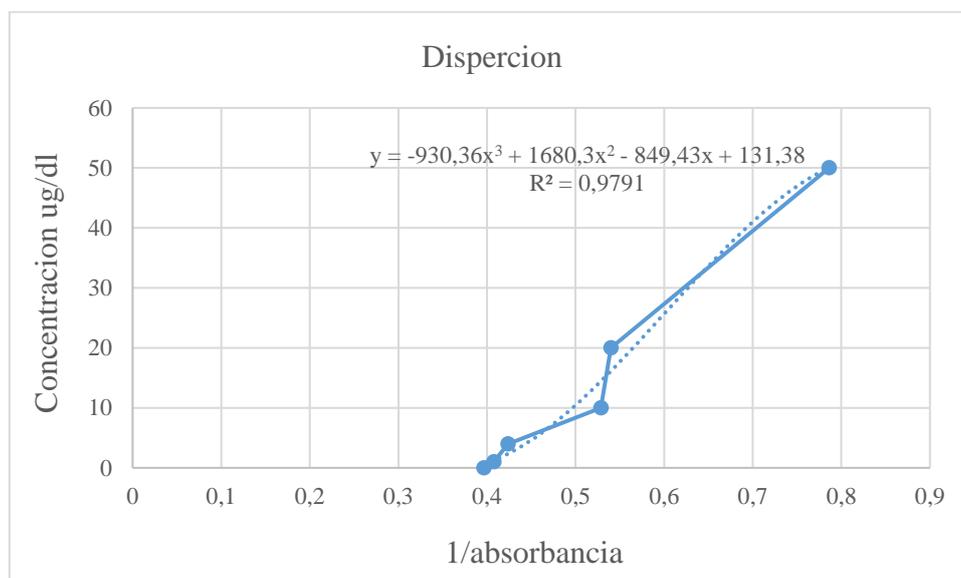
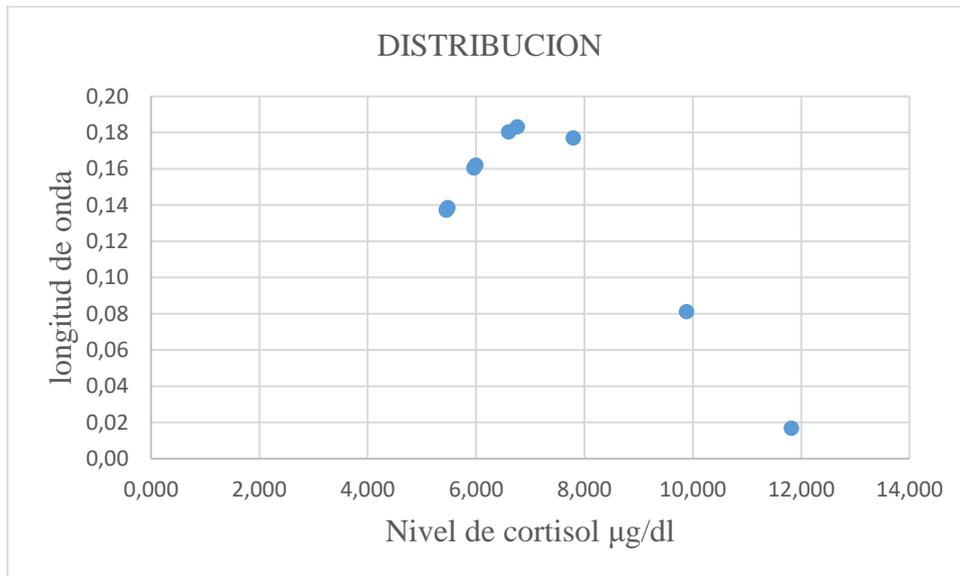


Figura 12. Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 100 equinos hembras.



En la figura 12 observamos la representación gráfica de la media de los niveles de cortisol 7.117 µg/dL y la desviación estándar 2.14 referente de datos obtenidos del plasma de equinos 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 equinos hembras.

Tabla 12. *Análisis estadístico en hembras*

| HEMBRAS | VALOR |
|-------------|--------|
| Media | 7.117 |
| Rango | 34.331 |
| Mediana | 5.353 |
| Moda | 3,980 |
| Varianza | 29,495 |
| Desviación | 5,431 |
| Coeficiente | 3.334 |

En la tabla 12 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 34.331 en hembras expresa la diferencia entre valor mínimo 1,927 y máximo 39,852 en cada variable de estudio.

La mediana es de 5.353 en hembras

La moda 3,980 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 29,495 lo cual demuestra una dispersión.

La desviación típica brinda información sobre la dispersión media de una variable obteniendo en hembras de 5,431 corroborando su dispersión.

El coeficiente de variación en hembras es 3.334 % 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 equinos, se obtuvo una media de 7.117 $\mu\text{g/dL}$ que está dentro del rango de $13,3 \pm 7,4 \mu\text{g/dL}$ según Zuluaga 2017 estudio realizado con el mismo kit utilizado en esta tesis, dando por entender que las yeguas del estudio gozan de bienestar y buena salud en condiciones de altitud influyendo en el sexo hembra en dichos niveles de cortisol, frente a esto también hacemos una comparación con la referencia dada por Santschi en 1991 con una media de 35 $\mu\text{g/dL}$ que está por debajo de este 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 13. *Análisis de medias en equinos machos y hembras.*

| | Niveles de cortisol de esta investigación en $\mu\text{g/dL}$ | ELISA cuantitativo referenciado por Zuluaga (2017) en $\mu\text{g/dL}$ | Niveles de cortisol referenciado por Santschi et al, 1991 |
|---------|---|--|---|
| Machos | 6,731 | $13,3 \pm 7,4$ | 35 |
| Hembras | 7.117 | $13,3 \pm 7,4$ | 35 |

Las medias de 6.731 $\mu\text{g/dL}$ y 7.117 $\mu\text{g/dL}$ en machos y hembras respectivamente están dentro del rango de $13,3 \pm 7,4$ $\mu\text{g/dL}$ según el estudio de Zuluaga (2017), por lo que las medias obtenidas en esta investigación son valorados como datos referenciales de cortisol en plasma de equinos 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 Santschi et al, 1991, los resultados obtenidos en esta investigación si varía por debajo de 35 $\mu\text{g/dL}$.

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 valores promedio en machos de 6.731 μ g/dL y en hembras 7.117 μ g/dL datos que están dentro del rango de referencia de 13,3 \pm 7,4 μ g/dL, por lo cual es un valor útil y sirve como 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 tratamientos adecuados en equinos.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda realizar mediciones de cortisol a nivel de altura en equinos para deportes ecuestres con tomas de muestras sanguíneas antes y después del esfuerzo físico, de la misma manera se podría hacer mediciones de cortisol en plasma de equinos criollos antes y después del trabajo.

Se recomienda hacer mediciones de testosterona a nivel de altura que es útil para determinar la madurez sexual en el macho, condiciones de criptorquidismo y tumores ováricos en yeguas, los resultados de estos análisis brindan evidencia adicional de la existencia de esta enfermedad y la necesidad de una intervención quirúrgica.

Se recomienda hacer medición de estrógenos compuestos producidos por la placenta o el feto, y no por la madre, tendría ventajas en el diagnóstico de gestación y como indicador de la viabilidad fetal en animales domésticos. La estrona es producida por el embrión bovino y concentraciones de Sulfato de estrona (E1S) aumentan en plasma maternal desde aproximadamente el día 70 de gestación.

Se recomienda también realizar investigaciones en condiciones de altitud en especial de los distintos niveles de biomarcadores como hidrocortisona, glucosa, lactato con distintas técnicas y kits de distintos fabricantes.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abyntek. (2019). *Tipos de ELISA*. Recuperado en: <http://www.abynetek.com/tipos-de-elisa/>
- AccuBind® Elisa. (2019). Cortisol Test System. Lake Forest, EE.UU. Monobind Inc.
- Alexander J., Irvine C.H. 1988. The effect of social stress on adrenal axis activity in horses: the importance of monitoring corticosteroidbinding globulin capacity. *J. Endocrinol.*3: 425-32.
- Alexander J., Irvine C.H., Donald R.A. 1996. Dynamics of the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis determined using a nonsurgical method for collecting pituitary venous blood from horses. *Neuroendocrinol.*17: 1-50.
- Álvarez L. 2008. Efecto negativo del estrés sobre la reproducción en animales domésticos. *Arch Zootec:* 57:39-59.
- Álvarez, A., (2012). Fisiología del estrés. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia, 288-255. Recuperado de <https://biblioteca.ihatuey.cu/link/libros/veterinaria/fe.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
- 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
- Brandan, N., Llanos, C., Miño, C., Ragazzoli, M. A., & Ruiz Díaz, D. A. N. (2008). Principios de endocrinología. Cátedra De Bioquímica. Facultad De Medicina.
- Brandan, N., Llanos, I., Horak, F., Tannuri, H., & Rodríguez, A. (2014). Hormonas de la corteza adrenal. Trabajo de Investigación. Argentina. Universidad Nacional del Nordeste-Facultad de Medicina.

- 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.
- Cardozo de Martínez, C. A., & de Osorio, A. M. (2008). Ética en investigación con animales: una actitud responsable y respetuosa del investigador con rigor y calidad científica. *Revista Latinoamericana de Bioética*, 8(2), 50.
- 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=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Cayado, P.; Muñoz-Escassi, B.; Domã-Nguez, C. et al. Hormone response to training and competition in athletic horses. *Equine Vet. J.*, v.36, suppl., p.274-278, 2006.
- 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_biologica
- Coello, D. (2012). Técnica de Elisa (Enzyme Linked inmunoabsorvent 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>
- Ferlazzo, A.; Medica, P.; Fazio, E. Hormonas y ejercicio. In: BOFFI, F.M. Fisiología del ejercicio Buenos Aires: Inter-Médica, 2006. p.153-164.

- 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
- Fernández, S., (2008). Hiperadrenocorticismo en felinos (tesis de grado). Universidad de la República. Uruguay.
- Ferraz, G.C.; Escodro, P.B.; Queiroz Neto, A. Fisiologia do exercício equino: ferramenta para o desempenho atlético de cavalos atletas. *Braz. J. Equine Med.*, v.12, p.6-8, 2007.
- 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
- Graaf-Roelfsema, E.; Keizer, H.A.; Breda E.V. et al. Hormonal responses to acute exercise, training and overtraining: *A review with emphasis on the horse*. *Vet. Q.*, v.29, p.82-101, 2007.
- Grandin, T. (1997). Evaluación del estrés durante el manejo y transporte. *J. Anim Sci*, 75, pp. 6-7.
- Larry Engelking 2012. *Metabolic and Endocrine Physiology*; by Teton NewMedia, third edition, p. 45
- 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>

- Lindner, A.; Fazio, E.; Medica, P. et al. Effect of age, time record and V4 on plasma cortisol concentration in Standardbred racehorses during exercise. *Pferdeheilkunde*, v.18, p.51-56, 2002.
- 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
- Mair TS, Sherlock CE, Boden LA. Cortisol concentrations in horses with colic. *Vet J* 2014; 201:370-377
- Martos, N., Ayala, J., Hernández, J., & Gutiérrez, C. (2003). Determinación de los niveles plasmáticos de cortisol en diferentes patologías de los équidos. *In Anales de Veterinaria de Murcia* (Vol. 19, pp. 129-140).
- 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>
- Messer, N. T. (2006). Endocrin dysfunction in the aged horse. *Equine Geriatric Medicine and Surgery. St. Louis: Elsevier*, 59-67.
- Ochoa, R. (2012). *Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos*. Finlay ediciones. La Habana.
- Protocol Place. (productor). (2014). Competitive ELISA Tutorial 3: Analyzing Typical Competitive ELISA Data in Excel. YouTube. De <https://www.youtube.com/watch?v=s2t0jiWxiDI>
- Rojas., O., (2006). *Inmunología (de memoria)*. México: Editorial Panamericana. Recuperado en: <https://books.google.com.ec/books?id=CtWACreo->

[BkC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](#)

- Ruiz, G., Espada, I & Peñalba, B., (2003). *Medicina interna de pequeños animales*. notas de clase (Vol. 121). Univ. Autònoma de Barcelona.
- Santschi E.M. LeBlanc M.M., Weston P.G. 1991. Progestagen, oestrone sulphate and cortisol concentrations in pregnant mares during medical and surgical disease. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 44:627-34.
- Sgorbini M., Panzini D., Maccheroni M. & Corazza M. 2004. Equine Cushing-like syndrome: diagnosis and therapy in two cases. *Veterinary Research Communications.* 28(3): 377-380.
- Stanchi, N., (2010). *Microbiología Veterinaria*. Buenos Aires: Editorial Intermédica.
Recuperado en:
https://www.academia.edu/37283154/Stanchi_Microbiologia_Veterinaria
- Suárez, I., (2017). *Metodología ELISA para estudiar la estabilidad de medicamentos biotecnológicos*. (Tesis doctoral). Universidad de Granada.
- Tizard, I., (2009). *Inmunología Veterinaria*. Madrid, España: Editorial Elsevier.
Recuperado en:
https://www.academia.edu/35951470/Inmunologia_Veterinaria_Tizard_pdf
- 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.
- 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 ETI
CAS SOBRE EL USO DE ANIMALES NO HUMANOS EN INVESTIGAC
ION

Wilmore, J. H., & Costill, D. L. (1994). Hormonal regulation of exercise. *Physiology of sport and exercise*, 122-143.

Zuluaga, A. M., & Martínez, J. R. (2017). Serum cortisol concentration in the Colombian creole horse. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 30(3), 231-238.

7. ANEXOS

7.1. Datos obtenidos en esta investigación.

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

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 2,171 | 1,388 | 1,115 | 0,939 | 0,404 | 0,240 | 0,400 | 2,199 | 2,101 | 1,867 | 2,095 | 2,166 | 2,197 | 2,293 |
| B | 1,989 | 1,135 | 1,230 | 1,174 | 0,681 | 0,680 | 0,497 | 2,185 | 2,117 | 2,131 | 2,106 | 2,088 | 2,142 | 2,333 |
| C | 1,411 | 1,179 | 1,293 | 1,283 | 0,623 | 0,674 | 0,618 | 2,225 | 2,016 | 1,897 | 1,446 | 2,030 | 2,256 | |
| D | 0,892 | 1,028 | 0,900 | 0,816 | 0,793 | 0,617 | 0,307 | 2,260 | 2,229 | 2,097 | 1,982 | 2,015 | 2,255 | |
| E | 0,465 | 1,238 | 1,173 | 1,363 | 0,840 | 0,743 | 0,440 | 2,177 | 2,145 | 1,991 | 2,096 | 1,961 | 2,220 | |
| F | 0,311 | 1,462 | 1,105 | 1,114 | 0,613 | 0,583 | 0,802 | 2,310 | 2,156 | 2,049 | 2,077 | 2,239 | 2,261 | |
| G | 1,236 | 1,479 | 1,059 | 0,998 | 0,501 | 0,877 | 2,250 | 2,076 | 1,690 | 2,188 | 2,341 | 2,378 | 2,335 | |
| H | 1,592 | 1,189 | 0,966 | 0,588 | 0,727 | 0,394 | 2,266 | 2,286 | 2,174 | 2,168 | 2,020 | 2,242 | 2,209 | |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 2,171 | 1,388 | 1,115 | 0,939 | 0,404 | 0,240 | 0,400 | 2,199 | 2,101 | 1,867 | 2,095 | 2,166 | 2,197 | 2,293 |
| B | 1,989 | 1,135 | 1,230 | 1,174 | 0,681 | 0,680 | 0,497 | 2,185 | 2,117 | 2,131 | 2,106 | 2,088 | 2,142 | 2,333 |
| C | 1,411 | 1,179 | 1,293 | 1,283 | 0,623 | 0,674 | 0,618 | 2,225 | 2,016 | 1,897 | 1,446 | 2,030 | 2,256 | |
| D | 0,892 | 1,028 | 0,900 | 0,816 | 0,793 | 0,617 | 0,307 | 2,260 | 2,229 | 2,097 | 1,982 | 2,015 | 2,255 | |
| E | 0,465 | 1,238 | 1,173 | 1,363 | 0,840 | 0,743 | 0,440 | 2,177 | 2,145 | 1,991 | 2,096 | 1,961 | 2,220 | |
| F | 0,311 | 1,462 | 1,105 | 1,114 | 0,613 | 0,583 | 0,802 | 2,310 | 2,156 | 2,049 | 2,077 | 2,239 | 2,261 | |
| G | 1,236 | 1,479 | 1,059 | 0,998 | 0,501 | 0,877 | 2,250 | 2,076 | 1,690 | 2,188 | 2,341 | 2,378 | 2,335 | |
| H | 1,592 | 1,189 | 0,966 | 0,588 | 0,727 | 0,394 | 2,266 | 2,286 | 2,174 | 2,168 | 2,020 | 2,242 | 2,209 | |

Tabla de cortisol: equinos machos

| Concentración de cortisol en µg/dL | | | | | | | | | |
|------------------------------------|-------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 6,000 | 7,173 | 5,576 | 10,393 | 9,902 | -0,195 | 0,669 | 0,796 | -0,796 | -0,186 |
| 3,164 | 6,055 | 10,724 | 14,299 | 27,150 | -0,132 | -0,326 | 0,505 | 0,649 | 0,063 |
| 4,688 | 5,488 | 4,892 | 18,028 | 26,301 | -0,309 | 0,049 | -0,146 | -0,047 | -0,443 |
| 6,971 | 9,608 | 7,183 | 12,074 | 18,224 | -0,460 | -0,001 | -0,056 | 0,316 | -0,438 |
| 6,537 | 6,595 | 8,435 | 117,479 | 14,182 | -0,096 | 2,515 | 0,283 | 0,599 | -0,287 |
| 8,098 | 7,276 | 14,930 | 12,897 | 51,980 | -0,669 | -0,083 | 0,231 | 0,674 | -0,464 |
| 5,982 | 7,760 | 25,769 | 13,010 | 21,955 | 0,374 | 1,459 | 4,229 | 0,951 | -0,771 |
| 4,106 | 8,805 | 12,878 | 14,205 | 10,923 | -0,569 | 0,114 | 0,842 | -0,370 | -0,239 |
| 3,977 | 9,126 | 14,066 | 11,814 | -0,417 | 0,255 | 1,293 | 0,278 | -0,943 | -0,599 |
| 6,441 | 6,586 | 11,053 | 15,066 | -0,485 | 0,179 | 0,273 | 0,369 | -0,383 | -0,763 |

Tabla de cortisol: equinos 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. Auscultación de la frecuencia cardíaca.



Foto 2. Toma de muestra sanguínea.



Foto 3. Muestras de plasma sanguíneo.



Foto 4. Material de laboratorio



Foto 5. Kits y las muestras de plasma.



Foto 6. Incubación de 60 minutos con control de biotina.

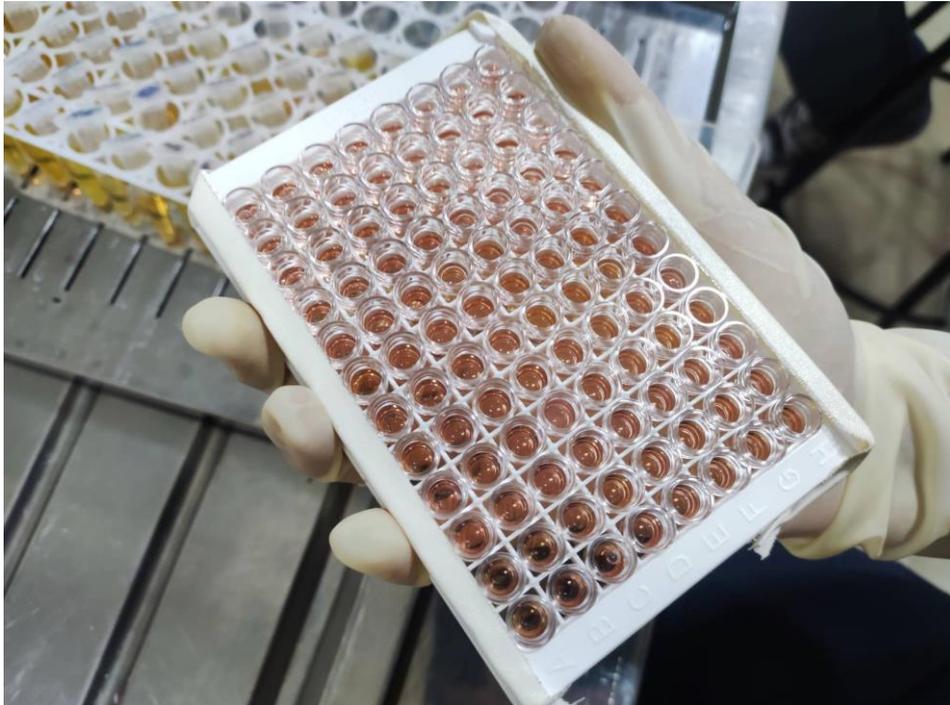


Foto 7. Pipeteo de cada muestra de plasma en posillos.



Foto 8. Lector de microplacas se lee la absorvancia a 450nm

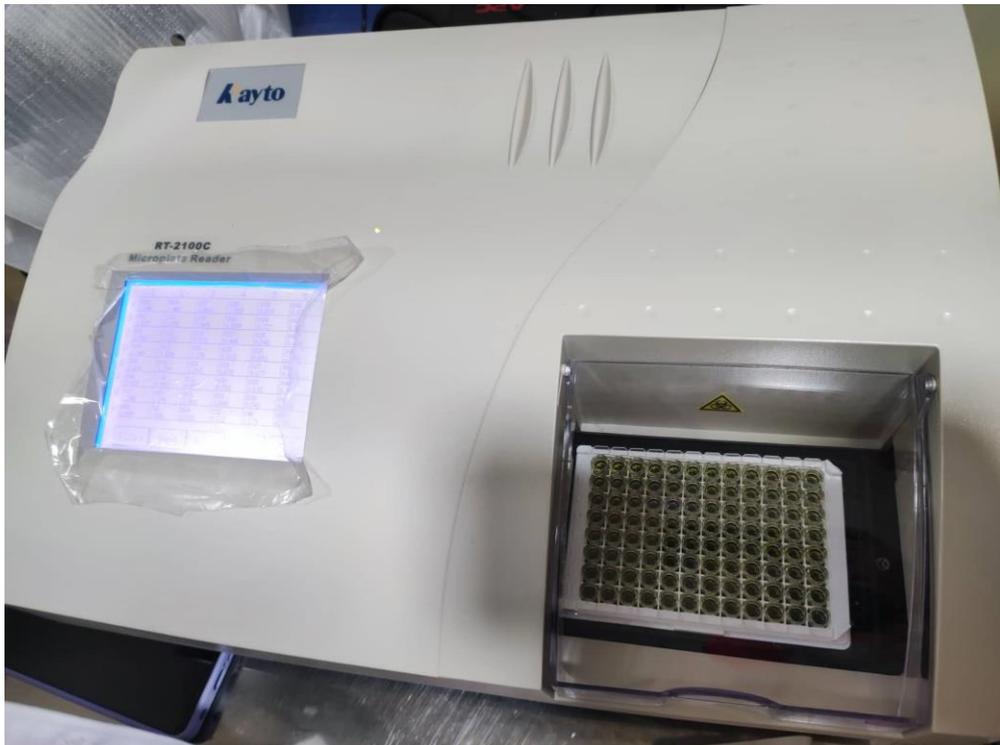


Foto 9. Placa con los primeros datos en 450 nm de absorbancia.

RT-2100C
Microplate Reader

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| A | 001 2.523 | 009 2.395 | 017 2.268 | 025 2.335 | 033 2.260 | 041 2.285 |
| B | 002 2.453 | 010 2.270 | 018 2.380 | 026 2.256 | 034 2.046 | 042 2.362 |
| C | 003 2.361 | 011 2.239 | 019 2.059 | 027 2.176 | 035 1.659 | 043 2.280 |
| D | 004 1.892 | 012 2.082 | 020 2.194 | 028 2.165 | 036 2.031 | 044 2.150 |
| E | 005 1.852 | 013 2.115 | 021 2.191 | 029 2.105 | 037 1.793 | 045 2.234 |
| F | 006 1.272 | 014 2.280 | 022 2.215 | 030 2.086 | 038 2.152 | 046 2.225 |
| G | 007 2.256 | 015 2.069 | 023 2.049 | 031 2.167 | 039 1.876 | 047 2.159 |
| H | 008 2.319 | 016 2.241 | 024 2.177 | 032 2.225 | 040 2.039 | 048 2.302 |

7-12>> Send Result Print Exit