

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA**

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

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

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**“VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTISOL EN BOVINOS
APARENTEMENTE SANOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA
CUANTITATIVO EN CONDICIONES DE ALTITUD”**

AUTOR:

JAIME PATRICIO LÓPEZ IÑIGUEZ

TUTOR:

DR. JUAN LEONARDO MASACHE MASACHE

CUENCA - ECUADOR

2021

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Jaime Patricio López Iñiguez con documento de identificación N° 0105239487, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación: **“VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTISOL EN BOVINOS APARENTEMENTE SANOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA CUANTITATIVO EN CONDICIONES DE ALTITUD”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Médico Veterinario y Zootecnista*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

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

Cuenca, abril del 2021.



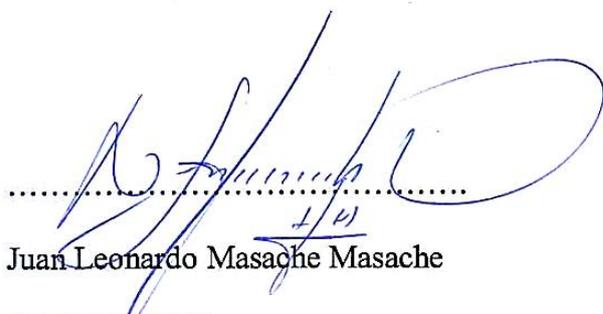
.....
Jaime Patricio López Iñiguez

C.I. 0105239487

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTISOL EN BOVINOS APARENTEMENTE SANOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA CUANTITATIVO EN CONDICIONES DE ALTITUD”**, realizado por Jaime Patricio López Iñiguez, obteniendo el *Trabajo Experimental*, que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, abril del 2021.



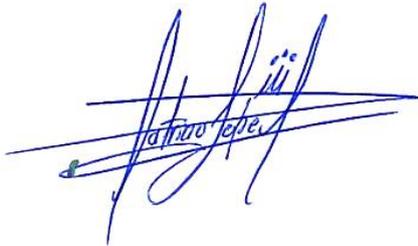
Juan Leonardo Masache Masache

C.I.1103109003

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Jaime Patricio López Iñiguez con documento de identificación N° 0105239487, autor del trabajo de titulación: “**VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTISOL EN BOVINOS APARENTEMENTE SANOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA CUANTITATIVO EN CONDICIONES DE ALTITUD**”, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental* es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, abril del 2021.



.....
Jaime Patricio López Iñiguez

C.I. 0105239487

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo lo dedico principalmente a Dios por brindarnos la energía para la existencia y darnos la oportunidad de un proceso de desarrollo y formación. Dedico también a mi madre María, por su apoyo y ser principal pilar en mi vida, a mi papa Jaime por enseñarme el esfuerzo del trabajo y sacrificio. A mis hermanos Carlos Christian y Andrés por ser apoyo moral y ayuda en momentos difíciles. A mi abuela Imelda Fernández por ser ejemplo de fuerza y perseverancia. A mis abuelitos José y Elvia por compartir bellos momentos durante mi vida universitaria y ser ejemplo de amor.

AGRADECIMIENTO

Agradezco de corazón a muchas personas que son parte de mi formación durante toda mi vida universitaria. En primer lugar agradezco al tutor de mi tesis Dr. Juan Masache por haber compartido sus conocimientos y orientado en cada práctica médica y por sus consejos.

Agradezco también al docente de la carrera Ing. Mauricio Salas por brindarme conocimientos en el uso correcto del laboratorio, y a todas las personas que laboran en los laboratorios de ciencias de la vida de la universidad.

También agradezco de manera muy especial a todos los docentes de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia que durante toda mi carrera universitaria impulsaron el desarrollo de mi formación profesional.

INDICE GENERAL

Resumen	13
Abstract	14
1. Introducción	15
1.1. Problema.....	16
1.2. Delimitación	16
1.2.1. Temporal	16
1.2.2. Espacial	16
1.2.3. Académica.....	17
1.3. Explicación del problema	17
1.4. Objetivos.....	18
1.4.1. Objetivo general	18
1.4.2. Objetivos específicos.....	18
1.5. Fundamentación teórica.....	18
2. Revisión y análisis bibliográfico y documental	19
2.1. Cortisol	19
2.2. Secreción de los glucocorticoides.....	19
2.3. Transporte del cortisol	20
2.4. Ritmo circadiano y ritmo ultradiano del cortisol.....	20
2.5. El estrés en bovinos	21
2.5.1. Mediciones del estrés inmediato	22

2.6.	Efectos metabólicos.....	25
2.7.	Glándulas suprarrenales.....	25
2.7.1.	Glomerular	26
2.7.2.	Fascicular.	26
2.7.3.	Reticular	26
2.8.	Fisiología de la corteza adrenal	26
2.8.1.	Papel de la CRH	27
2.8.2.	Papel de la ACTH	27
2.9.	Transporte de cortisol en la sangre	28
2.10.	Fisiopatología del estrés.....	29
2.10.1.	Bienestar en vacas lecheras	30
2.10.2.	Sistema inmune, glucocorticoides.....	30
2.10.3.	Indicadores de estrés	31
2.11.	Técnicas para determinar el cortisol	33
2.11.1.	Técnica de Elisa	33
2.11.2.	Principales tipos de Elisa.....	34
3.	Materiales y métodos.....	43
3.1.	Materiales.	43
3.2.	Métodos	45
3.2.1.	Diseño estadístico.....	45
3.2.2.	Selección y tamaño de muestra	46
3.2.3.	Obtención de las muestras sanguíneas	46

3.2.4.	Procedimiento para realizar la prueba de cortisol	46
3.2.5.	Variables de estudio	48
3.2.6.	Toma y registro de datos	48
3.3.	Consideraciones éticas.....	48
4.	Resultados y discusiones.....	50
5.	Conclusiones y recomendaciones	55
5.1.	Conclusión.....	59
5.2.	Recomendaciones	60
6.	Referencias bibliográficas.....	61
7.	Anexos.	67

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la ciudad de Cuenca y sus parroquias.....	17
Figura 2. Niveles de cortisol en ganado bovino durante el manejo.....	23
Figura 3. Promedio de valores de cortisol durante la matanza.	24
Figura 4. Fisiología de la glándula adrenal.	26
Figura 5. Fisiopatología del estrés.....	32
Figura 6. Ecuación de inmunoensayo enzimático competitivo	36
Figura 7. Enzimas usadas con mayor frecuencia en ELISAs.	41
Figura 8. Ilustración de la curva estándar (ejemplo).	52
Figura 9. Curva estándar de los datos de absorbancia y valores de cortisol en $\mu\text{g}/\text{dl}$	53
Figura 10. Dispersión de líneas rectas y marcadores.	54
Figura 11. Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 99 bovinos machos.	56
Figura 12. Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 99 bovinos hembras.	57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales Físicos.....	43
Tabla 2. Materiales Biológicos.....	44
Tabla 3. Recursos Humanos	44
Tabla 4. Recursos Químicos.....	45
Tabla 5. Variables dependientes (Suero).....	48
Tabla 6. Variables independientes (Animales).....	48
Tabla 7. Primera placa de microtitulación analizadas en el Lector de Microplacas Elisa: absorbancia a 450nm (6/6); Bovinos machos (90/100).....	50
Tabla 8. Segunda placa de microtitulación analizadas en el Lector de Microplacas Elisa: Bovinos machos (10/10); bovinos hembras (86/100).....	50
Tabla 9. Tercera placa de microtitulación analizadas en el Lector de Microplacas Elisa: Bovinos hembras (14/14).....	51
Tabla 10. Niveles de cortisol: Bovinos Machos	54
Tabla 11 Niveles de cortisol: Bovinos Machos	55
Tabla 12 Medias obtenida en esta investigación.	55

ÍNDICE DE FOTOS

Foto 1. Toma de muestra de sangre en tubo sin anticoagulante.....	69
Foto 2. Muestras de plasma de 100 hembras bovinas	69
Foto 3. Kit de Elisa reposando 20 minutos para tener los reactivos a temperatura ambiente..	70
Foto 4. Enzimas y soluciones de lavado	70
Foto 5. Calibradores de cortisol	70
Foto 6. Pipeteo de cada muestra de plasma en posillos.	71
Foto 7. Incuacion de 60 minutos con control de biotina.	71
Foto 8. Luego de añadir el tampon de lavado 3 veces.	72
Foto 9. Lector de microplacas se lee la absorvancia a 450nm.	72

Resumen

En el cantón de Cuenca a 2.560 msnm, se realizó el análisis de cortisol en plasma de bovinos en diferentes haciendas de las parroquias para la valoración de los niveles de cortisol en bovinos aparentemente sanos mediante la técnica de ELISA cuantitativo en condiciones de altitud. Se utilizó la muestra de plasma de 200 bovinos, 100 machos 100 hembras de edad adulta. Para este inmunoensayo enzimático competitivo se utilizaron reactivos que incluyen anticuerpo, conjugado enzima – antígeno y antígeno nativo. Utilizando varias referencias de suero diferentes de concentración de antígeno conocida, se genera una curva de respuesta a la dosis a partir de la cual se puede 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 referencias de suero, encontrando el punto de intersección en la curva y obteniendo una concentración de cortisol en microgramo por decilitro ($\mu\text{g}/\text{dl}$). En este estudio se obtuvo una media de concentración de cortisol en plasma sanguíneo en bovinos de 11.890 $\mu\text{g}/\text{dL}$ en machos, 8.585 $\mu\text{g}/\text{dL}$ en hembras siendo un valor referencial útil en laboratorios clínicos veterinarios ubicados geográficamente en condiciones de altitud.

Abstract

In the canton of Cuenca at 2,560 meters above sea level, the analysis of cortisol in plasma of bovines was carried out in different farms of the parishes for the assessment of cortisol levels in apparently healthy bovines by means of the quantitative ELISA technique under altitude conditions. The plasma sample of 200 bovines, 100 males, 100 females of adult age, was used. Reagents including antibody, enzyme-antigen conjugate, and native antigen were used for this competitive enzyme immunoassay. Using several different serum references of known antigen concentration, a dose response curve is generated from which the antigen concentration of an unknown concentration can 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 point of intersection in the curve and obtaining a concentration of cortisol in microgram per deciliter ($\mu\text{g} / \text{dl}$). In this study, a mean cortisol concentration in blood plasma in bovines of 11,890 $\mu\text{g} / \text{dL}$ in males, 8,585 $\mu\text{g} / \text{dL}$ in females was obtained, being a useful reference value in veterinary clinical laboratories located geographically in altitude conditions.

1. Introducción

Nuestros médicos veterinarios que laboran en altitud se basan en valores referenciales de otros países en condiciones geográficas a nivel del mar, lo que conlleva a un posible diagnóstico erróneo ya que por dicha situación influyen en los análisis de plasma.

En el Ecuador estos últimos años se ha incrementado la concientización en la defensa y los derechos de los animales, dentro del área productiva de bovinos se presenta el cortisol como un biomarcador sanguíneo utilizado para medir el estrés como un indicador de bienestar animal.

El análisis del cortisol en el plasma como biomarcador 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 entidades patológicas, siendo una prueba de laboratorio para determinar los trastornos en el cual su detección no es inmediata, y que permitiría al especialista analizar localizar y tratar la enfermedad sospechada.

El uso de esta prueba es muy limitada si no se tienen valores referenciales propios de la localidad en donde se encuentran los pacientes debidos a muchos factores como: raza, sexo, edad, estado sanitario, estado nutricional, diferencias fisiológicas como la actividad física, estado de excitación, el momento de la toma de la muestra, la temperatura ambiental y la altitud de la zona.

El presente trabajo de investigación nos permitirá cuantificar los niveles de cortisol en el suero de los bovinos, mediante la prueba de ELISA cuantitativo.

1.1. Problema

En la zona de la cordillera de los andes de nuestro país Ecuador en la provincia del Azuay no contamos con valores referenciales de los niveles de cortisol en plasma de bovinos en condiciones de altura, edad y estado de producción que son condiciones que pueden variar los resultados de laboratorio.

El tema del cortisol como biomarcador del estrés es un término de bienestar animal que se refiere al estado del paciente en condiciones de su entorno de bienestar si está sano cómodo con buena condición corporal y buenas actitudes de comportamiento y si no padece de dolor miedo o desasosiego.

1.2. Delimitación

1.2.1. Temporal

La vigente investigación tuvo 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 2550 msnm, en el laboratorio de ciencias de la vida biología II de la Universidad Politécnica Salesiana, empleando muestras sanguíneas las cuales obtuvimos de las haciendas que se encuentran en las parroquias Cumbe y Tarqui (Tutupali) de la ciudad de Cuenca.

Provincia: Azuay

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



Fuente: (Google maps, 2020).

1.2.3. Académica

La presente investigación se realizó con el fin de aportar más en el conocimiento del área de laboratorio clínico, el cual aportaría en mejorar conocimientos sobre los valores de referencia en la especie animal bovina que viven en condiciones de altitud.

1.3. Explicación del problema

La prueba de cortisol es de mucha importancia debido a que nos ayuda a tener un diagnóstico de enfermedades o patologías, que pueden padecer nuestros pacientes, cuyas pruebas son muy limitadas en nuestro medio debido a que no existen valores referenciales.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Valoración de los niveles de cortisol en bovinos aparentemente sanos mediante la técnica de ELISA cuantitativo en 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 bovinos.
- Obtener promedios de valores referenciales de cortisol sanguíneo en bovinos.

1.5. Fundamentación teórica

La presente investigación tiene como fundamento principal obtener valores referenciales en los niveles de cortisol en bovinos 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 necesaria de trabajo para poder dar un diagnóstico más confiable y así dar 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. Revisión y análisis bibliográfico y documental

El análisis del cortisol en bovinos ayudaría a profesionales veterinarios saber el nivel de estrés, siendo el cortisol un biomarcador referencial por lo cual para comprender será importante definir algunos conceptos claves en el tema de estudio entre los cuales se encuentran concepto, anatomía, fisiología y algunas teorías científicas sobre el cortisol y el método de prueba del mismo.

2.1. Cortisol

2.1.1. Definición

El cortisol es el glucocorticoide más importante secretado 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. (Romero M. H., Uribe L. F., y Sánchez J. A. 2011. p. 71-87.; AccuBind® ELISA 2019, párr. 2)

2.2. Secreción de los glucocorticoides

Existen tres procesos fundamentales en la liberación de glucocorticoides. El hipotálamo libera el factor liberador de corticotropina (CRF) que actúa sobre el lóbulo anterior de la hipófisis para estimular la producción de ACTH. La ACTH interactúa con los receptores situados en la superficie de las células de la corteza suprarrenal para estimular e incrementar el nivel de secreción de cortisol. El cortisol se libera desde la zona reticular de la corteza suprarrenal bajo influencia de la hormona adrenocorticotropa. El SNC es capaz de controlar y regular el nivel de producción de cortisol y variar esta cantidad en función de diferentes condiciones como temperatura, estrés, traumatismos etc. (Sumano y Ocampo, 2006, p. 917)

2.3. Transporte del cortisol

El transporte de cortisol producido en el organismo se encuentran unidas a proteínas plasmáticas, tales como la globulina ligante de corticoides o transcortina (75%) y albúmina (10%), el 10% restante se encuentra en forma libre. La vida media de eliminación del cortisol es de 60 minutos aproximadamente y se elimina por la orina (75%) y las heces (25%), por lo cual el hígado juega un rol importante en la modificación de esta hormona, y en menor proporción los riñones (Sumano y Ocampo, 2006. p. 919; Álvarez E. 2002. p. 11; Cunningham 1999, p. 409-429)

2.4. Ritmo circadiano y ritmo ultradiano del cortisol.

Hay que tener presente que el cortisol presenta un ritmo ultradiano y circadiano en bovinos, el ritmo ultradiano corresponde a oscilaciones en los niveles de esta variable cada 120 minutos, en cuanto al ritmo circadiano o ritmo natural de secreción de cortisol indica que los valores tanto de ACTH y de cortisol son más bajos a media noche y el nivel más alto a las 6:00 a.m. (Sumano y Ocampo, 2006. p.917; Thun, Eggenberger, Zerobin, Lüscher, y Vetter, 1981. p. 2208-2212.; Lefcourt, Bitman, Kahl, y Wood, 1993, p. 2607-2612.; Cunningham 1999, p. 409-429).

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

2.5. El estrés en bovinos

Los valores de cortisol sanguíneo han sido reconocidos como indicadores de estrés y de dolor, ya que cambios en la concentración de cortisol, si bien no miden exactamente cuánto dolor está sintiendo ese animal, entregan información acerca de la nocividad del factor (Morton y Griffiths 1985, p. 431-436.; Moberg y Mench 2005, p. 1-23).

El aumento del cortisol es fundamental para desencadenar el mecanismo de adaptabilidad del animal frente a un factor estresante, movilizando grasas y regulando la respuesta inflamatoria en el caso de alguna lesión; sin embargo, se ha visto que los aumentos sostenidos de cortisol son perjudiciales, disminuyendo el crecimiento, la producción láctea, suprimiendo el sistema inmunológico y generando atrofia de tejidos (Morrow, Kolver, Verkerk, y Matthews, 2002, p. 229-241).

La respuesta de los glucocorticoides al estrés es inmediata, las concentraciones de cortisol aumentan rápidamente hasta alcanzar, en minutos, valores varias veces superiores a los normales, siendo proporcionales a la gravedad del estrés (Ley, Waterman, A. E., y Livingston, 1996, p172-173, Cunningham1999.p409-429). Se ha visto que en la mayoría de los manejos de animales de granja se produce un aumento en las concentraciones sanguíneas de cortisol a medida que aumentan los niveles de estrés (Ley, Livingston, y Waterman, 1991 p. 45-47; Ley et al., 1996, p172-173). En los casos de laminitis crónica en vacas, los niveles de cortisol fueron significativamente mayores comparadas con vacas clínicamente sanas (Belge F., Bildik A., Belge A., Kiliçalp D., y Atasoy, N., 2004. p. 556-557).

2.5.1. Mediciones del estrés inmediato

En esta sección hablaremos del estrés causado por procedimientos de manejo son tal como el método de sujeción en una manga de compresión en la que se evaluaría el estrés o el malestar que abarcan mediciones de las reacciones tanto fisiológicas como de comportamiento tales indicadores ante el malestar serian el intento de escapar, la vocalización, las patadas y la lucha. Las medidas comunes de estrés fisiológico son el cortisol, la beta-endorfina y el pulso cardíaco. Las personas que se dedican a la investigación deben tener en cuenta que el cortisol es un indicador que varía con el tiempo y que requiere entre 10 y 20 minutos para alcanzar sus valores máximos. En el siguiente cuadro hay una recopilación de muchos estudios indicando que los niveles de cortisol en el ganado vacuno se sitúan en tres categorías. Nivel normal, nivel que se presenta cuando se sujeta la cabeza en un cepo y nivel de estrés extremo. (Grandin, T. 1997. P. 6-7).

Figura 2. Niveles de cortisol en ganado bovino durante el manejo.

Niveles de cortisol (ng/mL)	Raza	Sexo	Referencia
Normal			
0,5-2	Frisona	Toros	Tenessen y otros, 1984
2	Frisona	Vacas	Alam y Dobson, 1986
3	Cruza Angus	Terneros	Henricks y otros, 1984
6	Cruza Angus	Terneras	Henricks y otros, 1984
9	Friesland y Nuguni	Vacas	Mitchell y otros, 1988
Al sujetarle la cabeza en el cepo			
13	Holstein	Vacas (de crianza artificial)	Lay y otros, 1992a
24	Británica o continental	terneros machos y hembras (a 14 días del destete)	Crookshank y otros, 1979
27	Cruzas índicas	Novillos	Ray y otros, 1972
28	Angus x Hereford	Novillos	Zavy y otros, 1992
30	Simmental x Hereford x Brahman	83% novillos	Lay y otros, 1992b
36	Angus x Brahman	Novillos	Zavy y otros, 1992
46	Británica o continental	terneros machos y hembras (en el día del destete)	Crookshank y otros, 1979
63	Brahman x Hereford x Afrikander	Novillos y vaquillonas	Mitchell y otros, 1988
Valores extremos			
93	Británica o continental	Mezclado	Dunn, 1990

Fuente: (Grandin, T. 1997. P. 6-7).

Los niveles de cortisol son altamente variables y no se deberían hacer comparaciones absolutas entre distintos estudios, pero analizando las cifras del cortisol entre el manejo y la matanza son de muy bajo o alto estrés. Se podría concluir tentativamente que un valor medio de >70 ng/mL, tanto en novillos como en vacas, serian un indicativo de manejo rudo, mientras que los niveles más bajos cercano a los valores normales indicarían que el procedimiento seria de bajo estrés o de procedimientos rápidos antes que se empiecen a elevar los niveles de cortisol. Los toros maduros sexualmente tienen niveles de cortisol mucho más bajos que los novillos, las vacas y las vaquillonas. En un estudio hubo una media muy elevada de 93 ng/mL, porque

se invertía a los animales con sus patas hacia arriba durante 103 segundos cuya cifra muy alta no se debe a diferencias en los métodos de evaluación, porque el mismo investigador obtuvo valores más bajos de 45 ng/mL) cuando inmovilizó a los animales en posición normal. La matanza de ganado correctamente realizada no parece ser más estresante que la inmovilización con la técnica de sujeción en la manga. (Grandin, T. 1997. P. 6-7).

Figura 3. Promedio de valores de cortisol durante la matanza.

Niveles de cortisol (ng/mL)	Métodos de manejo	Referencia
Normal (Matanza en calma en laboratorio)		
15	Sujeción de cabeza en cepo, disparo inmediato con perno retráctil	Tume y Shaw, 1992
Planta de matanza comercial		
24	Sujeción calma en cajón de noqueo convencional	Ewbank y otros, 1992a
32	Desconocido	Mitchell y otros, 1988
44	Cajón de noqueo convencional	Tume y Shaw, 1992
45	Cajón de noqueo convencional	Dunn, 1990a
51	Cepo sujetador de cabeza mal diseñado, sólo el 14% entraba voluntariamente	Ewbank y otros, 1992a
63 (mediana)	Picana eléctrica a todos; el 38% resbaló; cajón de noqueo convencional	Cockram y Corley, 1991a
Estrés extremo		
93	Cuerpos invertidos durante 103 seg.	Dunn, 1990a

Fuente: (Grandin, T. 1997. P. 6-7).

2.6. Efectos metabólicos.

Los glucocorticoides influyen en el metabolismo de los carbohidratos, promueven la gluconeogénesis hepática lo que lleva a generar hiperglicemia, suprimiendo así la utilización de glucosa en la circulación periférica, causando glucosuria; deprimen la síntesis de proteínas de los tejidos periféricos; aumentan el catabolismo proteico en el tejido muscular; aumentan la utilización hepática de aminoácidos y estimulan e inducen la síntesis proteínica en este órgano; poseen una función de lipólisis, lo que resulta en liberación de ácidos grasos libres y glicerol y aumenta la grasa en tórax y abdomen. Inhiben la síntesis del DNA y la mitosis. Retienen Na y favorecen la eliminación de K, provocando polidipsia y poliuria. Inducen el adelgazamiento de la piel. Deprimen la actividad fibroblástica en el hueso; causan osteoporosis por antagonismo con la vitamina D; alteran la matriz osteoide; aumenta la excreción renal de calcio. Por otra parte, tienen un efecto negativo en el sistema inmune e interfieren en la respuesta inflamatoria. (Sumano y Ocampo, 2006, p.918; Cunningham 1999, p. 409-429).

2.7. Glándulas suprarrenales

Sumano y Ocampo, (2006) afirman: Que las glándulas suprarrenales se encuentran situadas en los polos anteriores de los dos riñones, y cada una de ellas está constituida por dos partes: la médula suprarrenal y la corteza suprarrenal. La corteza y la médula son dos porciones con origen embrionario distinto: la corteza se desarrolla a partir del mesodermo y secreta hormonas esteroideas semejantes al colesterol, mientras que la médula se origina del ectodermo y secreta adrenalina y noradrenalina, ambas catecolaminas (semejantes a la tirosina). Contrariamente a lo que mencionan muchos autores, existen pruebas de una estrecha relación entre las dos porciones. La médula está constituida por tejido cromafínico, que posee gran afinidad por tinturas o colorantes, y también se sabe que las catecolaminas influyen en el flujo sanguíneo a través de la corteza (p. 916)

La corteza consiste en tres capas o zonas que producen diferentes esteroides:

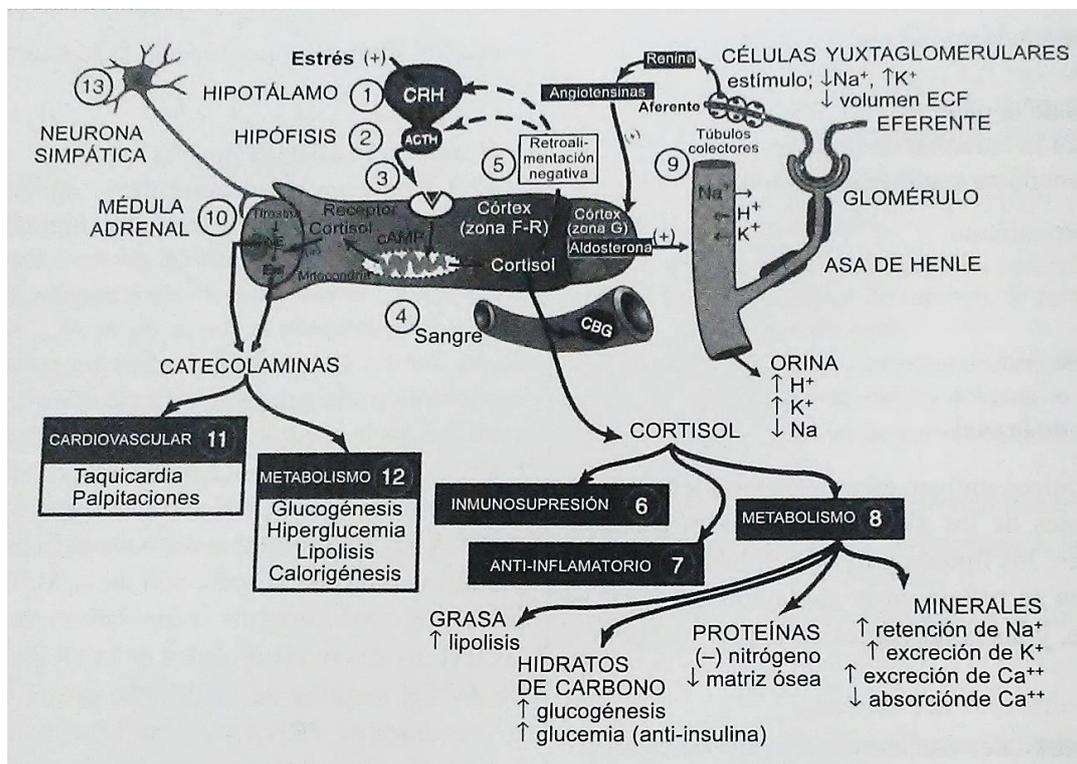
- Glomerular. Produce mineralocorticoides, corticosterona (escasa) y desoxicorticosterona
- Fascicular. Glucocorticoides, cortisol (hidrocortisona o complejo F), cortisona y corticosterona (muy escasa), denominadas de manera genérica corticoides
- Reticular. Produce esteroides sexuales, andrógenos, estrógenos y progesterona

La sección longitudinal de la glándula adrenal muestra dos áreas principales: la medula en el centro y la corteza en la periferia. La capsula adrenal cubre la glándula adrenal. La corteza adrenal representa el 80 al 90 %. (Reece, W.O., 2009, p. 754 - 760)

2.8. Fisiología de la corteza adrenal

Los aspectos más importantes de la fisiología de la glándula adrenal se resumen en el siguiente cuadro:

Figura 4. Fisiología de la glándula adrenal.



Fuente: (Reece, W.O., 2009, p. 756)

2.8.1. Papel de la CRH

Reece, W.O. (2009), afirma: “La CRH es un polipéptido de 41 aminoácidos que es secretado por la eminencia media del hipotálamo. También 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” (p. 755)

Los glucocorticoides naturales o sintéticos bloquean el efecto estimulador de la CRH sobre la secreción de ACTH. La ADH, TRH y la serotonina son también estimuladores (en menor medida) de la secreción de la ACTH, pero la CRH es la principal hormona estimuladora de la secreción de ACTH. El efecto estimulador de la TRH sobre la secreción de ACTH se pone de manifiesto por el hecho de que las inyecciones de TRH estimulan la secreción de cortisol en caballos, especialmente cuando los caballos están afectados por un adenoma en la parte intermedia de la hipófisis, que es un tumor secretor de ACTH. (Reece, W.O., 2009. p. 755)

2.8.2. Papel de la ACTH

La familia de la ACTH incluye ACTH a la dosis de máxima respuesta puede duplicar o triplicar las concentraciones de cortisol en sangre en una hora (por ejemplo 20 a 150 ng/ml). El caballo es muy sensible. Una inyección equivalente a 0,2 unidades de ACTH (dosis total por caballo) produce un aumento significativo de cortisol en plasma; la respuesta máxima se obtiene con el equivalente a 1,0 unidades (ACTH 1 A 24) por caballo. La falta de respuesta de cortisol a una dosis estándar de ACTH indica atrofia de la zona fasciculada-reticular mientras que una respuesta aumentada indica hipertrofia de la corteza. Las concentraciones de ACTH y de cortisol en la sangre aumentan durante las primeras horas de la mañana (de 6,00 a 8,00 h A.M.)

en el hombre, algunos roedores y caballos. En los cerdos hay dos oleadas, en la mañana y al final de la tarde, en los perros no hay oleadas específicas, y en el ganado bovino la oleada es variable. La vida media de la ACTH es aproximadamente de 10 minutos. El cortisol y todos los glucocorticoides inhiben las secreciones de la ACTH, probablemente por el bloqueo del reconocimiento de la CRH en los corticotrofos. (Reece, W.O., 2009. p. 755)

2.9. Transporte de cortisol en la sangre

Las glándulas adrenales secretan los esteroides adrenales a la sangre en forma libre; sin embargo, se unen rápidamente a proteínas transportadoras en la sangre. Existen dos proteínas plasmáticas para el transporte del cortisol en la sangre: globulina que une corticosteroide (CBG, también conocida como transcortina) y las albuminas. La CBG tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000, cerca de 140 veces el del cortisol. La concentración de CBG en plasma es relativamente baja (30MG/DL) y solo tiene un sitio de unión de cortisol por molécula (Reece, W.O., 2009). En consecuencia, la CBG tiene poca capacidad de unir cortisol, si bien la unión es fuerte. Los sitios de unión en la CBH se saturan cuando la concentración de cortisol del plasma es de 10 a 20 veces la normal. Cuando la capacidad de unión es sobrepasada, el cortisol adicional se encuentra en forma libre o unida a albumina. La albumina tiene mucha más capacidad de unión de cortisol (ya que hay mucha más cantidad en el plasma, pero la unión es mucho más débil. La mayor parte del cortisol en sangre (75%) está unido a CBG, aproximadamente el 15% está unido a albumina y el 10 % restante está no unido o libre. La forma libre es la fracción activa del cortisol. Las principales funciones de las proteínas transportadoras son proteger al cortisol de la excreción renal y de la inactivación hepática, proporcionarle solubilidad al cortisol, Generar un almacenaje dinámico de la hormona, y regular la disponibilidad de la hormona en tejido afecto. La vida media del aclaramiento del cortisol desde la sangre es cerca de 80 minutos. Las células hepáticas metabolizan de modo irreversible el cortisol en productos para la excreción. (p.754)

2.10. Fisiopatología del estrés

En los últimos años se está dando una importancia creciente a las normas sobre bienestar animal debido a la confluencia de varios factores, como el mayor conocimiento en distintas disciplinas relacionadas con los animales de producción (el comportamiento animal, la fisiología del estrés y el manejo correcto de los animales), la relación directa entre estos conocimientos y los niveles de producción estables y competitivos a mediano y largo plazo y una mayor concientización social sobre las necesidades de los animales, así como el rechazo hacia los abusos. De esta forma, una vez superadas las necesidades de incremento en el abastecimiento de productos, se han empezado a fijar otros parámetros para cumplir con las demandas sociales en el ámbito de la producción ganadera, uno de esos parámetros, cada día más importante, es el bienestar animal. En esta revisión se intenta destacar la importancia del bienestar de los animales, tanto por la calidad de vida de los mismos, como por su impacto sobre la producción ganadera. Se exponen los principales factores generadores de estrés en ganado, así como los efectos fisiológicos y sus impactos negativos sobre la producción. En vías de brindar una mejor vida al animal y aumentar la calidad del producto, cada vez más países y consumidores imponen exigencias legales y reglamentarias que determinan estándares de bienestar para el manejo animal. Es por todo esto que el bienestar animal adquiere cada vez mayor relevancia en todo el mundo. América Latina se encuentra actualmente atravesando un proceso de adaptación a los nuevos requerimientos internacionales. (Odeón, M. M., & Romera, S. A. 2017).

2.10.1. Bienestar en vacas lecheras

Webster (2001), describe una lista de problemas que son innatos en los sistemas de producción, la cual incluye un elemento importante que no se encuentra inserto en las 5 libertades, y corresponde al concepto de cansancio, ya que los animales deben continuar produciendo aunque se sientan físicamente agotados. Estos problemas son el apetito o enfermedades metabólicas agudas, incomodidad crónica, como malas camas, o pérdida de condición, aumento de enfermedades, por sobre exposición a patógenos o disminución de la inmunidad, ansiedad crónica o frustración, establos o pesebreras inapropiadas, cansancio metabólico y/o físico, debido a producciones prolongadas y excesivas, dolor crónico o restricción del movimiento, debido a la alteración de partes del cuerpo o de sus funciones. Ej. Enfermedades podales en vacas lecheras (p. 229-237).

El término estrés fue introducido por Hans Selye en el año 1935, quien descubrió, los estímulos que podían provocar esta condición, como la activación del Eje Hipotalámico-Hipofisiario-Adrenal; éste autor definió el estrés como “la acción de estímulos nerviosos y emocionales provocados por el ambiente sobre los sistemas nervioso, endocrino, circulatorio y digestivo de un animal, produciendo cambios medibles en los niveles funcionales de estos sistemas” (Lay y Wilson 2001. p. 1-25).

2.10.2. Sistema inmune, glucocorticoides

Los glucocorticoides aumentan la glucosa disponible en el cuerpo ya sea destruyendo proteína, glicógeno o grasa, facilitando así la gluconeogénesis y suprimiendo la utilización de glucosa en la circulación periférica. Deprimen el sistema inmune, inhibiendo la síntesis de casi todas las citoquinas conocidas y alterando el crecimiento y la diferenciación de las células inmunes (Lay y Wilson 2001. p. 1-25; Lager, Schmidt, Waran, y Otrosky, 2017, p. 12-21).

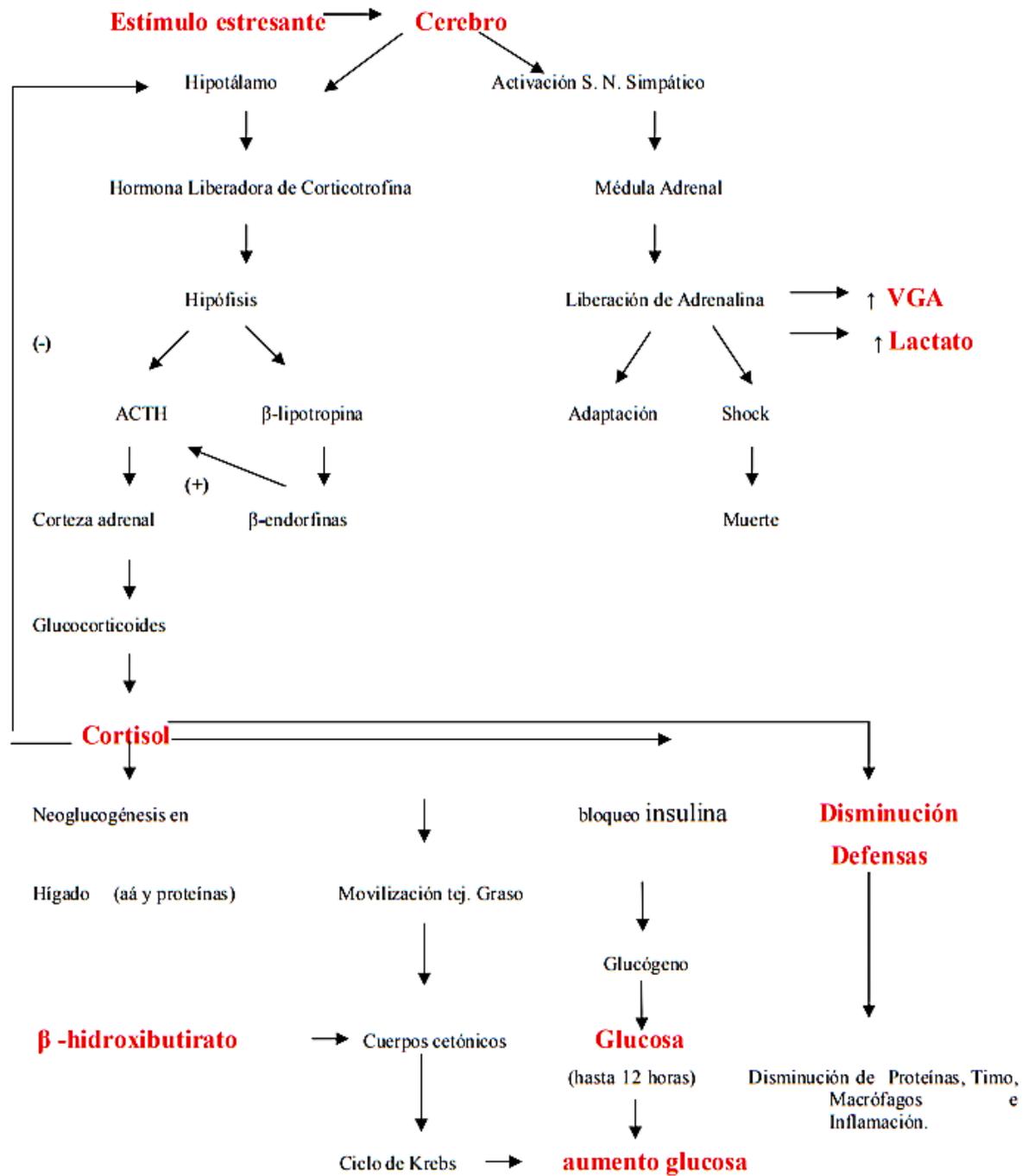
2.10.3. Indicadores de estrés

Los estados de estrés pueden ser medidos a través de variables sanguíneas sean éstas hormonas o metabolitos, la ventaja de estas mediciones es que producen resultados cuantificables y posibles de comparar (Tadich 2004, p. 32-39.).

Entre los indicadores sanguíneos de estrés más comúnmente utilizados se puede mencionar el Cortisol, Catecolaminas, Factor Liberador de corticotropina, metabolitos como Glucosa, β -Hidroxibutirato, Creatinfosfoquinasa y Lactato los que pueden ser adecuados para la evaluación del estrés, si se les correlaciona con variables fisiológicas como temperatura corporal, frecuencia cardiaca, respiratoria, hematocrito y relación neutrófilos/linfocitos (Caballero y Sumano 1993, p. 15-29.; Tadich, Gallo, y Alvarado, 2000. p. 171-183.; Tadich 2004, p. 32-39).

La capacidad de adaptación y la complejidad de las respuestas fisiológicas de un individuo se esquematiza en la figura 3, (Echeverría 2002 citado por Bastias, 2006, p. 9)

Figura 5. Fisiopatología del estrés



Fuente: (Echeverría 2002 citado por Bastias, 2006, p. 9).

2.11. Técnicas para determinar el cortisol

Hay diferentes opciones para medir los niveles de cortisol tales son como: radioinmunoanálisis (RIA), enzimoimmunoanálisis (ELISA), electroquimioluminiscencia (ECQLIA), automatizado y cromatografía líquida/espectrometría de masa en tándem (LC/MS) (Maidana, Bruno y Mesh 2013. p. 579-584).

2.11.1. Técnica de Elisa

Esta técnica está relacionada con las enzimas que se relacionan con las enzimas utilizadas como marcadores para cuantificar la formación de complejos antígeno – anticuerpo, para realizar estas pruebas se han desarrollado métodos para aplicar ELISA que tienen en común un marcador enzimático que se puede unir a un anticuerpo o a un antígeno, también en todos estos métodos en su procedimiento se lleva a cabo una separación que tiene el objetivo de eliminar el conjugado enzimático libre antes de que se determine la cantidad de conjugado enzimático enlazado, esto se logra por medio de una reacción catalítica entre el sustrato y la enzima (Guzmán 2004, p48)

La prueba de inmunoabsorción ligado a enzimas es una de las técnicas serológicas más versátiles para el diagnóstico de enfermedades infecciosas siendo una de las pruebas más sensibles y específicas para la detección de antígenos como anticuerpos, el principio se basa en la inmovilización de un antígeno en un pocillo de plástico con anticuerpos, siendo después detectado con un segundo anticuerpo. (Tizard, 2009, p.509; Ramsey y Tennant, 2012, p. 21).

La mayor ventaja de las pruebas de Elisa es la amplificación de la reacción que se consigue con cada complejo anticuerpo-enzima, que es capaz de reaccionar con muchas moléculas de sustrato para dar lugar a un producto de color. El principal inconveniente es que las reacciones se producen en medio líquido, requiriendo de varias soluciones y una técnica adecuada de pipeteo. (Ramsey y Tennant, 2012, p. 21)

2.11.2. Principales tipos de Elisa

2.11.2.1. Elisa tipo sándwich

Este método se utiliza para identificar y cuantificar un antígeno o un anticuerpo específico para lo cual se utiliza una placa de poliestireno tapizados con un antígeno específico al cual se le conoce como anticuerpo de captura posteriormente se añade la solución de antígeno a analizar en cada uno de los pocillos y su el suero corresponde al animal enfermo el anticuerpo de captura se unirán antígeno presente en esta solución problema produciendo la primera unión (Tizard, 2009, p. 514).

Luego se prosigue con varios lavados para adicionar un anticuerpo específico conocido como anticuerpo de detección que se unirá al antígeno; posteriormente se somete a todos los sueros a un proceso de incubación y se lavan de nuevo las placas para eliminar el anticuerpo sin unir, seguido de esto se coloca una antiglobulina que está marcada con una enzima y el sustrato que producirá un cambio de color en los sueros. Es importante que el anticuerpo de captura y el de detección sean de diferentes especies y que la antiglobulina específica de especie se usa para visualizar el anticuerpo de detección debido a que de esta manera se evitará resultados falsos positivos (Tizard, 2009, p. 514).

2.11.2.2. Elisa indirecto

Emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno, y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario. (Mejía y Ramelli, 1993, p 365)

Se incubaba el Ag en un tampón apropiado en los pocillos de una placa de microtitulación y se absorbe en las paredes de los pocillos. La Ag libre se elimina por lavado. Los Abs no unidos se eliminan por lavado y el Ag absorbido en la placa reacciona con el Ab específico. El conjunto Ag-Ab es entonces detectado mediante el empleo de un segundo Ab marcado enzimáticamente que reconoce dominios constantes de Abs y suele ser específico de especie, lo cual permite que un mismo Abs marcado sea capaz de detectar diferentes Ags. El conjugado se une al Ab problema y una vez lavado el conjugado no ligado, el ligando unido se visualiza por la adición de un cromógeno. La cantidad de enzima enlazada indica la cantidad de Abs en la muestra y puede ser medida por la degradación de su sustrato. (Suárez, 2017, p. 95)

2.11.2.3. Principios Elisa cuantitativo

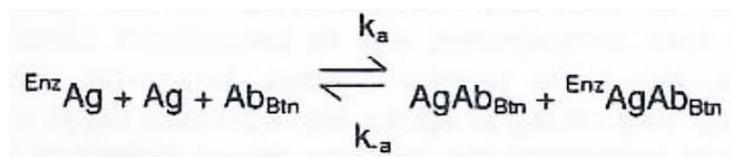
El Elisa Cuantitativo se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígenoanticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar sobre la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. (Benenaula, D. 2010. 71-72)

2.11.2.3.1. Cortisol accubind Elisa – IFU rev 4

El kit de EIA Monobind Cortisol utiliza un anticuerpo monoclonal anti-cortisol específico y no requiere la extracción previa de muestras de suero o plasma. La reactividad cruzada con otros esteroides naturales es baja. El empleo de varias referencias séricas de concentración conocida de cortisol permite la construcción de un gráfico de actividad y concentración. De la comparación con la curva de respuesta a la dosis, la actividad de una muestra desconocida puede correlacionarse con la concentración de cortisol (AccuBind® ELISA 2019, párr. 5-6).

AccuBind® ELISA (2019) afirma: Que los reactivos esenciales requeridos para un inmunoensayo enzimático incluyen anticuerpo, conjugado enzima – antígeno y antígeno nativo. Al mezclar anticuerpo biotinilado, conjugado enzima – antígeno y un suero que contiene el antígeno nativo, se produce una reacción de competencia entre el antígeno nativo y el conjugado enzima – antígeno para un número limitado de sitios de unión del anticuerpo. La interacción se ilustra en la siguiente ecuación (párr.7).

Figura 6. Ecuación de inmunoensayo enzimático competitivo



Fuente: (AccuBind® ELISA 2019)

- Ab (Btn) = Anticuerpo biotinilado (cantidad constante)
- Ag = antígeno nativo (cantidad variable)
- (Enz) Ag = conjugado enzima-antígeno (cantidad constante)
- AgAb (Btn) = complejo antígeno anticuerpo
- (Enz) AgAb (Btn) = complejo conjugado enzima-antígeno-anticuerpo
- k_a = tasa constante de asociación
- k_{-a} = constante de tasas de disociación
- $K = k_a/k_{-a}$ = equilibrio constante

Se produce una reacción simultánea entre la biotina unida al anticuerpo y la estreptavidina inmovilizada en el micropocillo. Esto efectúa la separación de la fracción unida al anticuerpo después de la decantación o aspiración. (AccuBind® ELISA 2019, párr.8)

La actividad enzimática en la fracción unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de antígeno nativo. Utilizando varias referencias de sueros diferentes de concentración de antígeno conocida, se puede generar una curva de respuesta a la dosis a partir de la cual se puede determinar la concentración de antígeno de una concentración desconocida. (AccuBind® ELISA 2019, párr. 9)

2.12. Factores clave en el desarrollo de un Elisa

Varios factores pueden afectar a la capacidad de un ELISA para detectar proteínas, siendo los más importantes los citados a continuación:

2.12.1. Adsorción.

La fase sólida debe ser de un tipo que permita un fácil manejo (especialmente en los procesos de lavado) y que mantenga una buena reproducibilidad en la unión de Ags o Abs sobre su superficie. Se han ensayado numerosas fases sólidas, desde los tubos de cristal de los orígenes, a las actuales microplacas de 96 pocillos de plástico tratado para aumentar su capacidad de adsorción, de moléculas, y con fondos de pocillo ópticamente transparentes para poder realizar las medidas espectrofotométricas en instrumentos adecuados, como son los espectrofotómetros de lectura de placas que han recibido el nombre de lectores ELISA. Las microplacas de 96 pocillos y un volumen de 350 µl comúnmente empleadas, son especialmente ventajosas para procesar un elevado número de muestras, y una vez tapizadas, el material inmovilizado permanece reactivo mucho tiempo, siempre que se mantenga seco y a baja temperatura. Normalmente se utilizan microplacas de poliestireno de fondo plano que pueden adquirirse estériles y con o sin tapa (Cultek, 2006, p. 2).

2.12.2. Unión y lavados.

Son dos procesos clave en el correcto desarrollo de un ELISA, ya que mediante las diferentes etapas de lavado se logra eliminar toda la fracción de moléculas que ha quedado libre, sin reaccionar, evitando de tal forma que se produzcan interferencias no deseadas. Además permite asegurar que la unión ha quedado establecida de forma correcta sin el impedimento de fracciones libres. (Suárez, 2017, p. 103).

2.12.3. Tiempos de incubación y temperaturas

Ha de asegurarse que el tiempo y la temperatura de incubación son las correctas en cada etapa, ya que en este tipo de ensayos la mínima variación en cualquiera de estas dos variables puede dar lugar a grandes cambios en los resultados del ensayo. Por eso se debe trabajar con equipos bien calibrados, estufas de incubación, frigoríficos o congeladores en los que la temperatura sea exacta y no tenga leves variaciones y ser especialmente cuidadosos a la hora de finalizar una fase del ensayo y comenzar la siguiente, evitando que transcurra más o menos tiempo de incubación del adecuado. (Suárez, 2017, p. 103).

2.12.4. Enzimas y sustratos

La popularidad de las enzimas como elemento marcador se debe a su enorme poder catalítico, su alta especificidad, el amplio espectro de sustratos que pueden usarse y la gran estabilidad de los conjugados (Ochoa R. F. 2012, p. 3).

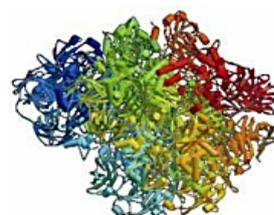
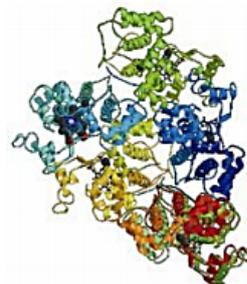
Según Ochoa R. F. (2012). Existen determinados criterios de selección para una enzima marcadora:

- Económica y alto grado de pureza en su obtención.
- Presencia de grupos reactivos para la unión covalente.
- La conjugación debe ser sencilla y los conjugados activos y estables.
- Estable en forma libre y conjugada.
- Elevada actividad catalítica.
- Soluble.
- Sencilla, sensible y mensurable.
- No debe hallarse en el medio a examinar.
- Los elementos procedentes del material a examinar no deben interferir con la prueba.
- La actividad debe conservarse en las condiciones de la prueba.
- Disponibilidad de sustratos estables, baratos y no tóxicos que permitan la formación de productos estables.
- En los ensayos heterogéneos debe ser mínima la influencia de la fase sólida sobre la actividad enzimática.
- Las enzimas usadas en los ensayos homogéneos deben conjugarse fácilmente cerca del sitio activo sin que se altere su actividad.

Las enzimas más usadas en los ensayos heterogéneos (todas las modalidades de ELISA) son: peroxidasa, fosfatasa alcalina, β galactosidasa, glucosa oxidasa, ureasa, glucoamilasa, acetilcolinesterasa, glutamato descarboxilasa y anhidrasa carbónica. Entre ellas, las enzimas empleadas con mayor frecuencia son: fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante y β -galactosidasa; a continuación se muestra una tabla (Tabla 10) con las ventajas y desventajas de cada una, así como los sustratos que se emplean con cada una de ellas. No obstante existen otras como son: microperoxidasa y citocromo C, entre otras (Ochoa R. F. 2012).

Figura 7. Enzimas usadas con mayor frecuencia en ELISAs.

FOSFATASA ALCALINA	
SUSTRATOS	
Producto insoluble BCIP/NBT	Producto soluble -p-NPP: amarillo ($\lambda=405-410\text{nm}$). -4-MUP (fluorescente) $\lambda_{\text{ex}}=360\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}}=440\text{nm}$. -AMPPD (luminiscente).
VENTAJAS	
<ul style="list-style-type: none"> -Estable cuando se almacena y manipula adecuadamente. -Puede almacenarse a +4°C durante más de 6 meses. -Disponible como enzima libre o como conjugado. -Más estable que la peroxidasa. -Pequeño tamaño ($\approx 86\text{KDa}$). -Amplia variedad de sustratos comerciales disponibles. 	
DESVENTAJAS	
<ul style="list-style-type: none"> -Se inactiva por agentes quelantes, la acidez y los fosfatos orgánicos. -Menor relación de conjugación que la peroxidasa. -Necesita tampones específicos. -Puede causar impedimento estérico. -Más cara que la peroxidasa. 	
PEROXIDASA	
SUSTRATOS	
Producto insoluble -TMB: azul $\lambda=650\text{nm}$ amarillo $\lambda=450\text{nm}$ -DAB -4CN	Producto soluble -TMB: azul $\lambda=650\text{nm}$; amarillo $\lambda=450\text{nm}$ -ABTS: azul verdoso $\lambda=405-410\text{nm}$ -OPD: amarillo $\lambda=490\text{nm}$ -HPPA (fluorescente): $\lambda_{\text{ex}}=320\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}}=404\text{nm}$ -HPA (fluorescente). -Luminol (quimioluminiscente glow). -Polifenoles (quimioluminiscente flash). -Esteres de acridina (quimioluminiscente flash). -Luciferina (bioluminiscente glow).
VENTAJAS	
<ul style="list-style-type: none"> -Estable cuando se almacena y manipula adecuadamente. -Puede almacenarse a +4°C durante más de 6 meses. -Disponible como enzima libre o como conjugado. -Bastante barata. -Pequeño tamaño ($\approx 40\text{kDa}$). -Relación de conjugación 4:1. -No causa impedimento estérico. -Amplia variedad de sustratos comerciales disponibles. 	
DESVENTAJAS	
<ul style="list-style-type: none"> -Incompatible con bastantes estabilizantes (azida sódica, etc.). -La peroxidasa endógena y algunos metales interfieren en su actividad. 	
β-GALACTOSIDASA	
SUSTRATOS	
Producto soluble -MUG (fluorescente) $\lambda_{\text{em}}=440\text{nm}$. -AMPGD (luminiscente).	
VENTAJAS	
Incrementa su tasa de reacción en presencia de alcoholes.	
DESVENTAJAS	
<ul style="list-style-type: none"> -Sufre inhibición inducida por Abs. -Tetrámero de 300kDa. -Frecuentemente causa impedimento estérico. 	



Fuente: adaptada de (Cultek, 2006, p. 3-4).

2.12.5. Anticuerpos y antígenos empleados

En todo método ELISA deben ser empleados los Abs y Ags adecuados al objetivo perseguido, de forma que la calidad y pureza de los mismos esté asegurada. Si son adquiridos a través de casas comerciales, lo que es habitual, deben venir acompañados de su correspondiente certificado de análisis donde se faciliten todos los datos referentes al producto, así como debe de ser indicado el lote de fabricación (Suárez, 2017, p. 104).

2.12.6. Detectores

Los lectores ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas en serie de cada uno de los pocillos de la placa ELISA. Además de los lectores similares a los espectrofotómetros convencionales, con capacidad de medir a todas las longitudes de onda en la zona ultravioleta y del visible, los lectores de ELISA más comúnmente utilizados y comercializados disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de un conjunto de longitudes de onda. Son las que se corresponden con las necesarias para medir la absorbancia de los cromógenos más comúnmente utilizados. Además existen sistemas de detección colorimétricos, fluorescentes y luminiscentes (Coello D. 2010, p. 9).

3. Materiales y métodos.

3.1. Materiales.

Tabla 1. *Materiales Físicos*

Descripción	Unidad	Cantidad
Lector de Microplacas Elisa	Unidad	1
Pipeta multicanal	Unidad	1
Micropipeta automática	Unidad	5
Puntas para pipetas de 200 μg	Paquete (1000)	1
Guantes	Caja	1
Mascarilla	Unidad	1
Mandil	Unida	1
Pocillos	Unidad	3
Cuaderno	Unidad	1
Esfero	Unidad	1
Registro de datos	Unidad	1
Cámara celular	Unidad	1
Computador	Unidad	1
Papel periódico	Unidad	1

Tabla 2. *Materiales Biológicos*

Descripción	Unidad	Cantidad
Animales	Unidad	200
Agua destilada	Litro	1

Tabla 3. *Recursos Humanos*

Nombre	Descripción
Dr. Juan Masache Masache	Tutor de tesis
Ing. Mauricio Salas	Laboratorista
Patricio López Iñiguez	Tesista

Tabla 4. *Recursos Químicos*

DESCRIPCION	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 de lavado.	Unidad	3
Sustrato A - contine tetrametilbencidina (TMB) en tampón.	Unidad	3
Sustrato B – contine peróxido de hidrogeno (H2O2) en bufer.	Unidad	3

3.2. Métodos

3.2.1. Diseño estadístico

Para el análisis de la presenta investigación se utilizó el programa Microsoft Excel 2016.

Para el análisis estadístico de los datos se empleó; estadística de medidas de dispersión la cual abarca conceptos de media, rango, mediana, moda, varianza, desviación típica y coeficiente de variación, así como gráfica interpretativa.

3.2.2. Selección y tamaño de muestra

Se trabajara 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 cuantitativo.

3.2.3. Obtención de las muestras sanguíneas

Para la toma de las muestras sanguíneas se utilizaron agujas hipodérmicas de 20 G x 1½ estériles. Al localizar la vena (yugular, cefálica) en cada tubo vacutainer sin anticoagulante (tapa roja) se extrajo 4 ml de sangre, luego se centrifugo la muestra a 3500 revoluciones por minuto durante 5 minutos con el fin de obtener el suero para la prueba de cortisol.

3.2.4. Procedimiento para realizar la prueba de cortisol

Antes de la prueba se llevó a las instalaciones de los laboratorios de ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana 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 del 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.

- Se formateo los pocillos de las microplacas para que cada referencia, control y muestra de paciente se analicen por el número de pacientes hembras y machos.
- Se pipetea 0.025 ml del suero de referencia, control o muestra apropiados en el pocillo asignado.
- Se agregó 0.05 ml de reactivo enzimático de cortisol listo para usar a todos los posillos.

- Se procedió a agitar la microplaca suavemente durante 20 – 30 segundos para mezclar
- Luego se añadió 0.05 ml de reactivo cortisol biotina a todos los pocillos
- Nuevamente se agito la microplaca suavemente durante 20 – 30 segundos para mezclar
- Tape e incube durante 60 minutos a temperatura ambiente.
- Desechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si se decanta, seque la placa con papel absorbente.
- Luego se añadió 0.35 ml de tampón de lavado, y se procede a la decantación (golpear y sacar) o aspirar. Este proceso de debe repetir dos veces más un total de tres lavados.
- Se agrega 0.100 ml de solución de sustrato de trabajo a todos los pocillos. **NO SE DEBE AGUITAR LA PLACA DESPUES DE LA ADICION DEL SUSTRATO.**
- Se procedió a incubar a temperatura ambiente durante quince minutos
- Luego se agrega 0.050 ml (50µg) de solución de parada a cada pocillo y se mezcla suavemente durante 15 – 20 segundos. Siempre se Agrega los reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias de tiempo de reacción entre pocillos.
- Leímos la absorbancia en cada pocillo a 450 nm en un lector de micropipetas. Los resultados se leyó dentro de los treinta minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

3.2.5. Variables de estudio

Tabla 5. *Variables dependientes (Suero)*

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

Tabla 6. *Variables independientes (Animales)*

Concepto	Categorías	Indicadores	Índice
Bovinos que se encuentren aparentemente sanos	Bovinos	Número de hembras	Número
		Número de machos	Número

3.2.6. Toma y registro de datos

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

3.3.Consideraciones éticas

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

Las ciencias biológicas se caracterizan por utilizar, sobre la base de un marco teórico, la observación y la experimentación con los organismos 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 organismos que constituyen los ecosistemas. Llevando una propuesta de configurar estas actividades como practicas generosas mediante una planificación didáctica que incluya una guía de observación del material, cuyo trabajo practico traerá a luz las concepciones que se tienen, ir conectando conocimientos previos y generando explicaciones que permiten la construcción colectiva de conocimiento científico (Grilli J. 2018, parr. 1)

4. Resultados y discusiones

4.1. Datos obtenidos en esta investigación

Luego del procedimiento de la prueba del cortisol el equipo Lector de Micropalacas Elisa se obtuvo los datos que se encuentran en las siguientes tablas.

Tabla 7. *Primera placa de microtitulación analizadas en el Lector de Microplacas Elisa: absorbancia a 450nm (6/6); Bovinos machos (90/100)*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,309	0,827	1,068	0,422	0,745	0,566	0,839	0,639	0,785	0,462	0,352	0,614
B	1,067	0,673	0,636	0,909	0,659	0,557	0,836	0,941	0,654	0,351	0,587	0,85
C	0,767	0,869	0,555	0,884	0,73	0,605	0,684	0,595	0,973	0,42	0,548	0,686
D	0,237	0,71	0,92	1,29	0,682	0,762	0,727	0,17	0,91	0,44	0,412	0,583
E	0,17	0,896	0,739	0,697	0,847	0,517	0,732	0,46	0,555	0,626	0,408	0,615
F	0,116	1,324	0,789	0,577	0,572	0,754	0,539	0,456	0,546	0,575	0,909	0,318
G	0,954	1,187	0,854	0,847	0,973	0,711	0,883	0,62	0,896	0,752	0,844	0,345
H	0,771	1,306	0,454	0,955	0,882	0,676	0,728	0,396	0,865	0,566	0,516	0,386

Tabla 8. *Segunda placa de microtitulación analizadas en el Lector de Microplacas Elisa: Bovinos machos (10/10); bovinos hembras (86/100)*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,651	0,44	0,455	0,318	0,233	1,043	0,964	0,556	0,452	0,617	0,512	0,453
B	0,823	0,242	1,066	1,124	0,256	1,102	0,933	0,807	0,466	0,481	0,753	1,037
C	0,71	0,658	0,884	0,888	0,258	0,352	1,009	0,121	1,081	0,685	0,811	0,527
D	0,251	0,336	0,587	0,429	0,639	0,732	0,83	0,354	0,549	0,402	0,27	0,693
E	0,327	0,527	0,981	0,397	0,199	0,591	0,881	0,144	0,734	0,468	0,79	0,815
F	0,048	0,255	0,762	0,667	0,302	0,684	0,294	0,297	0,24	0,376	0,796	0,721
G	0,451	0,751	0,262	0,539	0,564	0,894	1,002	0,198	0,903	0,659	0,654	1,109
H	0,425	0,696	0,06	0,653	0,631	1,219	1,034	0,299	0,744	0,608	0,802	0,828

Tabla 9. Tercera placa de microtitulación analizadas en el Lector de Microplacas Elisa:
Bovinos hembras (14/14)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,02	0,581										
B	0,558	0,993										
C	0,919	0,93										
D	1,007	1,073										
E	0,502	1,462										
F	1,202	1,091										
G	1,045											
H	0,957											

4.2. Valores referenciales de la bibliografía.

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

4.3. Unidades utilizadas para el cálculo de resultados

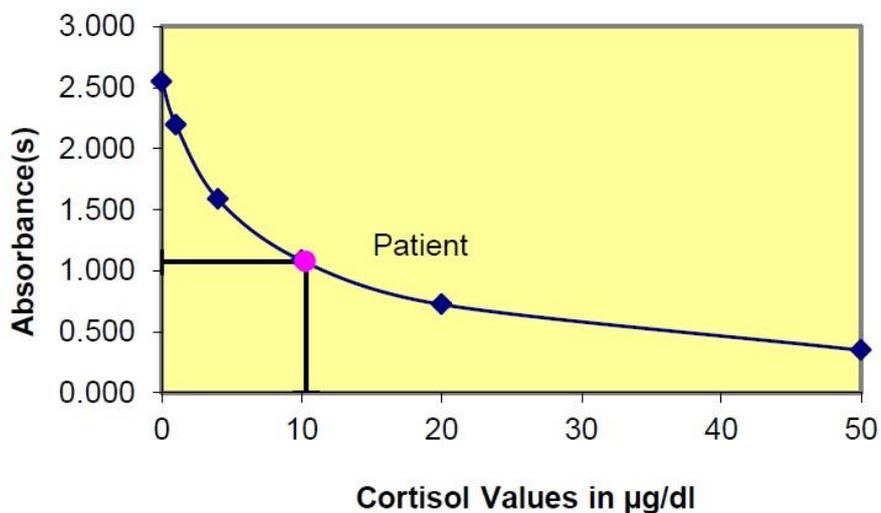
Las unidades que se utilizan para medir el cortisol son en ng/ml y en $\mu\text{g/dl}$, según Grandin, T. (1997) en su recopilación de niveles de cortisol en ganado bovino durante el manejo y la matanza, utiliza ng/ml y otros autores de libros como Larry E. (2012) y el fabricante del kit de cortisol AccuBind® ELISA trabaja en las unidades de $\mu\text{g/dl}$.

Según IBL INTERNATIONAL GMBH (2012). Ejemplariza que la conversión se realiza de la siguiente manera: $\text{cortisol (ng/mL)} \times 2.76 = \text{nmol/L}$; $\text{cortisol (}\mu\text{g/dl)} \times 27.6 = \text{nmol/L}$.

4.4. Discusión.

Para el presente trabajo se empleó la toma de muestras de sangre a 200 animales bovinos 100 machos 100 hembras posteriormente, luego de realizar todo el proceso de la prueba del cortisol, el lector de microplacas nos dio unos datos que deben ser calculados en referencia a la siguiente curva de ejemplo que nos da Monobind Inc.

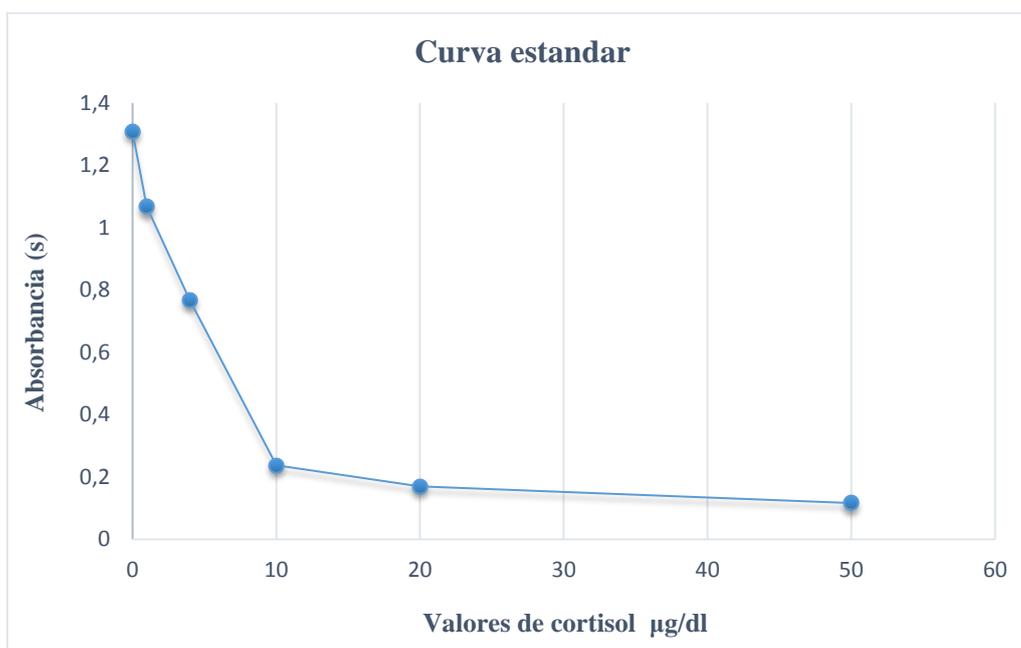
Figura 8. Ilustración de la curva estándar (ejemplo).



Fuente: AccuBind® ELISA 2019

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

Figura 9. Curva estándar de los datos de absorbancia y valores de cortisol en $\mu\text{g/dl}$

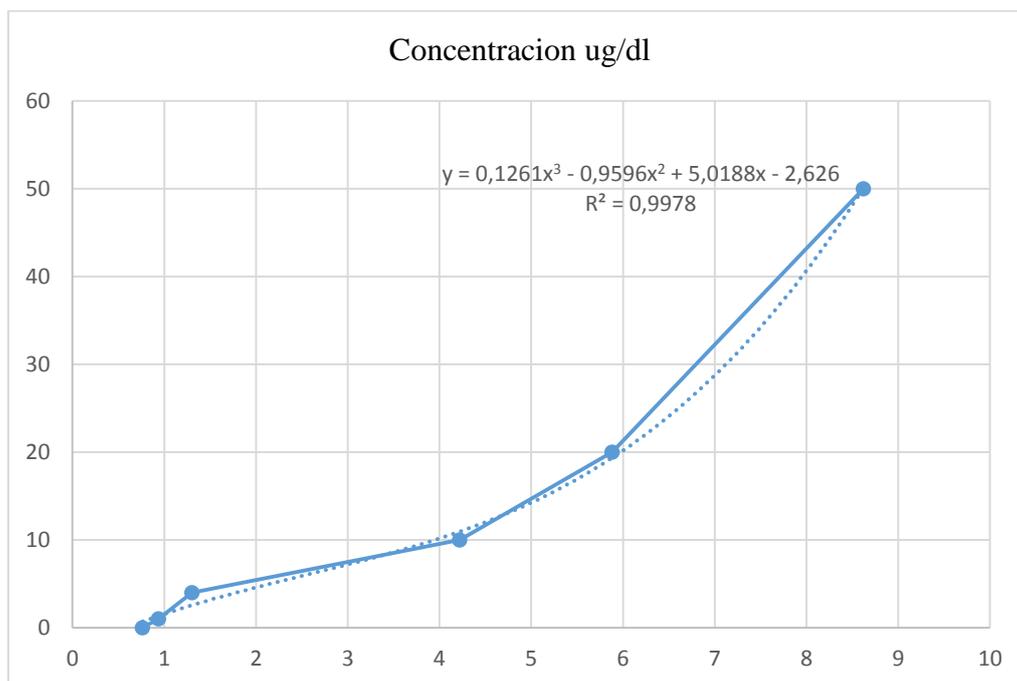


Los datos obtenidos en el equipo lector de microplacas nos da los resultados en el eje-y (lineal) se refleja contra su concentración en el eje-x (logarítmico) logrando un ajuste con cúbico spline, logrando obtener el dato en $\mu\text{g/dl}$

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

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

Figura 10. Dispersión de líneas rectas y marcadores.



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

Tabla 10. Niveles de cortisol: Bovinos Machos

Concentración de cortisol en $\mu\text{g/dl}$									
1,726	1,335	2,006	2,169	2,885	3,361	1,655	3,457	2,183	3,276
2,544	3,383	0,747	3,889	3,107	1,775	1,898	3,863	4,414	2,282
2,263	4,039	2,972	1,655	2,206	3,697	4,039	2,648	3,547	2,891
3,126	1,857	3,846	2,014	2,220	19,359	4,122	3,941	2,156	10,112
2,071	2,721	2,169	3,941	3,054	5,045	1,955	6,779	3,042	7,354
2,891	2,450	1,722	4,021	2,790	5,095	2,088	3,762	3,796	825,666
1,955	2,138	2,687	3,617	2,761	3,502	5,020	4,103	3,540	5,159
0,672	5,121	3,221	2,593	4,188	5,959	6,800	5,705	7,588	5,513
0,996	5,556	2,773	4,404	2,010	2,471	5,586	5,767	6,930	5,304
0,711	1,902	3,067	2,637	2,784	3,255	5,304	1,902	6,128	10,625

Tabla 11 *Niveles de cortisol: Bovinos Machos*

Concentración de cortisol en $\mu\text{g/dl}$									
3,228	1,626	4,188	1,415	1,528	28,180	1,926	4,455	4,304	4,561
7,135	2,593	3,262	1,232	2,248	8,207	2,692	2,642	2,997	0,958
4,304	9,562	11,207	6,779	2,019	14,489	3,524	2,340	2,320	1,408
9,903	398,261	9,852	2,761	8,305	8,143	4,794	9,205	2,825	1,714
2,653	7,588	9,753	3,730	1,552	5,146	3,048	2,445	1,212	3,812
2,978	1,168	3,361	3,054	1,444	4,971	5,862	2,415	2,258	1,584
5,108	1,989	14,364	1,964	4,030	1,295	4,947	3,255	1,491	1,818
1,342	5,456	8,049	0,915	2,360	4,094	6,307	2,384	4,012	1,320
2,006	5,943	3,959	1,688	44,490	2,749	3,221	5,133	1,861	0,398
3,762	3,166	3,420	1,806	6,736	10,748	3,594	1,434	1,535	1,265

Realizando el análisis estadístico obtuvimos las medias que se encuentran en el siguiente cuadro.

Tabla 12 *Medias obtenida en esta investigación.*

Descripción	Niveles de cortisol en $\mu\text{g/dl}$
Machos	11.890
Hembras	8.585

La media en machos es de 10.238 $\mu\text{g/dL}$ y en hembras 8.585 $\mu\text{g/dL}$ llegando a estar dentro del rango de referencia de 4 a 16 $\mu\text{g/dL}$ por lo que se podría valorarse como un dato de referencia de cortisol en plasma de bovinos en condiciones de altitud, dado por entendido que los animales están en un entorno de bienestar.

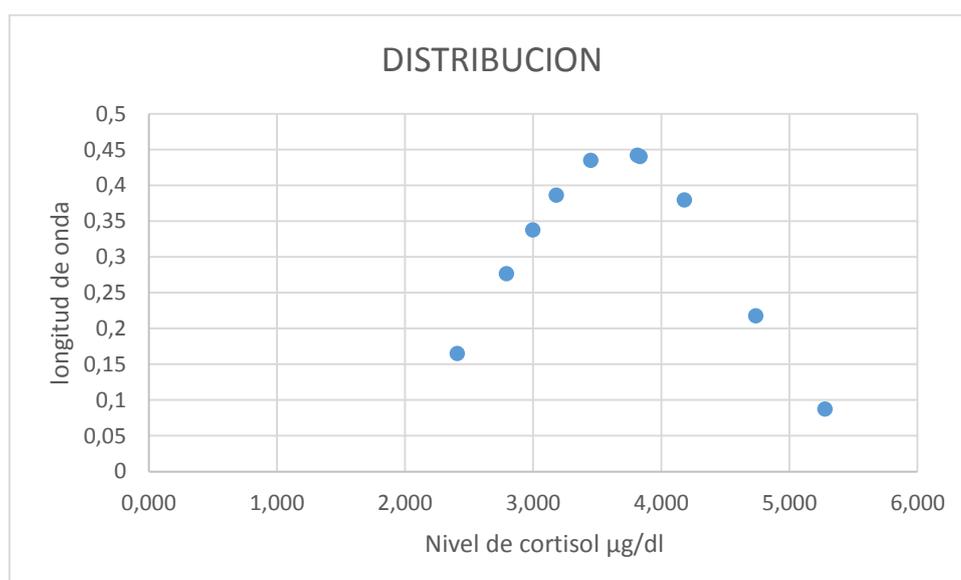
En los análisis obtuvimos dos datos atípicos, uno de 825,666 $\mu\text{g/dl}$ en machos y otro de 398,261 $\mu\text{g/dl}$, dato que se atribuye a la posibilidad de una enfermedad crónica que le esté causando estrés lo cual provocaría que el animal tenga muy alto nivel de cortisol en la sangre.

Según Belge F. et al. (2004). Dice que en los casos de laminitis crónica en vacas, los niveles de cortisol fueron significativamente mayores comparadas con vacas clínicamente sanas.

Según Grandin (1997). Explica que los niveles de cortisol son altamente variables y no se deberían hacer comparaciones absolutas entre distintos estudios, pero analizando las cifras del cortisol entre manejo y la matanza son de muy bajo o alto estrés.

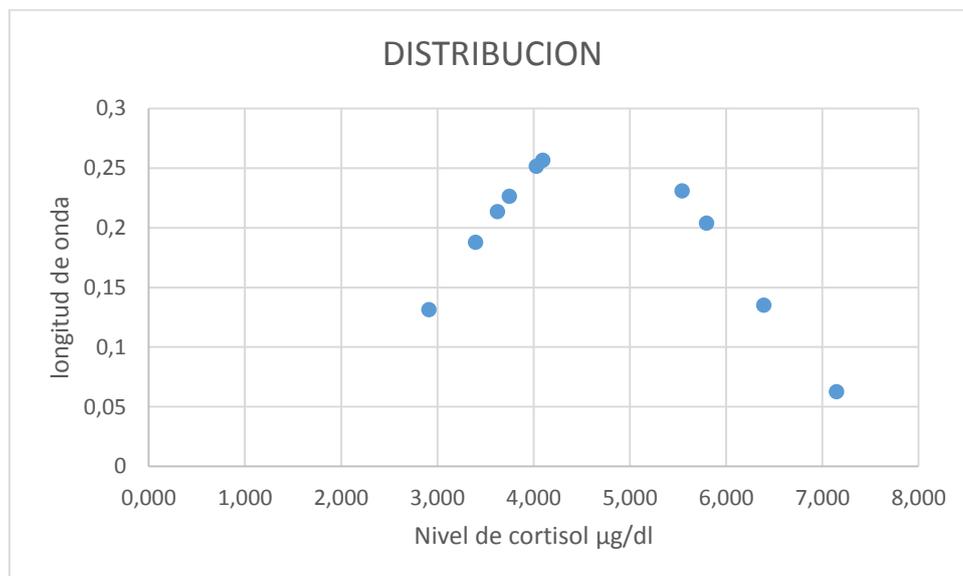
En el tema de esta investigación se valoran los niveles de cortisol en animales aparentemente sanos, por lo cual para la distribución normal se excluyen los 2 datos atípicos.

Figura 11. Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 99 bovinos machos.



La figura se encuentra constituida en torno a la media de los niveles de cortisol 3.66 y la desviación estándar 0.89 referente de datos obtenidos por 99 bovinos machos, indica que la densidad está concentrada en torno a la media y se hace muy pequeña conforme nos alejamos del centro por la derecha o la izquierda. Indicando que el eje de las abscisas corresponde a los niveles de cortisol $\mu\text{g}/\text{dl}$. Este hecho, se debe a la forma acampanada y simétrica que posee su función de densidad, que hace que los elementos más comunes son los que están centrados, mientras que los raros se sitúan en los extremos.

Figura 12. Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 99 bovinos hembras.



La figura se encuentra constituida en torno a la media de los niveles de cortisol 4.66 y la desviación estándar 1.43 referente de datos obtenidos por 99 bovinos hembras, indica que la densidad está concentrada en torno a la media y se hace muy pequeña conforme nos alejamos del centro por la derecha o la izquierda. Indicando que el eje de las abscisas corresponde a los niveles de cortisol $\mu\text{g}/\text{dl}$. Este hecho, se debe a la forma acampanada y simétrica que posee su función de densidad, que hace que los elementos más comunes son los que están centrados, mientras que los raros se sitúan en los extremos.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusión

En esta investigación se determinó la concentración de cortisol con un promedio en machos de 10.238 $\mu\text{g/dL}$ y en hembras de 8.585 $\mu\text{g/dL}$ cuyos datos están dentro de los parámetros de referencia el cual varía entre 4 a 16 $\mu\text{g/dL}$ siendo un valor referencial coherente y significativo como información científica para consultas en el laboratorio clínico veterinario ubicadas en zonas geográficamente de altitud para diagnósticos más precisos.

La media obtenida en esta investigación está dentro de los valores referenciados en otras investigaciones, siendo no necesario la comparación absoluta de distintos estudios de cortisol en bovinos, proporcionando información de un bienestar y buena calidad de vida de los animales que están en condiciones de altitud frente a valores obtenidos en investigaciones sobre el nivel del mar.

El uso de cortisol plasmático humano para el procedimiento de Elisa Cuantitativo es útil para la determinación de cortisol plasmático de bovinos y podría usarse como una herramienta para evaluar los efectos del estrés en los bovinos; sin embargo, la metodología requiere alta precisión y rigor para evitar errores en los resultados y la interpretación.

5.2.Recomendaciones

Recomendaría seguir realizando investigaciones en condiciones de altitud en especial de los niveles de biomarcadores como hidrocortisona, glucosa, lactato, β -Hidroxiacetato (β -HBA), Hematocrito (VGA), Creatinfosfoquinasa (CK, EC 2.7.3.2.), Leucocitos. Y también hacer más pruebas del cortisol con distintas marcas de kits con reactivos de diferentes fabricantes.

Recomiendo clasificar en variables como edad, peso, sexo, alimentación, hora del día, genética y durante el manejo (manipulación) para corroborar en alguna alteración en los niveles de cortisol. También se podría clasificar según el propósito vacas lecheras, bovinos de carne, animales en mataderos y a nivel de la región costa del Ecuador.

6. Referencias bibliográficas.

- Álvarez, E. (2002). Efecto de estímulos de diferente intensidad durante el arreo sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en bovinos. Memoria de Titulación, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- AccuBind® ELISA (2019). Cortisol Test System. Lake Forest, EE.UU. Monobind Inc.
- Barrientos, A., Gallo, C., & Tadich, N. (2006). Determinación de algunos constituyentes sanguíneos indicadores de estrés en corderos en reposo. In Proceedings XXXI Congreso de la Sociedad Chilena de Producción Animal. SOCHIPA. pp. 18-20.
- Bastias S. C. (2006). Efecto de diferentes grados de claudicaciones sobre algunos constituyentes sanguíneos indicadores de estrés en vacas lecheras. (Tesis de titulación) Universidad Austral De Chile, Facultad De Ciencias Veterinarias, Valdivia – Chile.
- Belge, F., Bildik, A., Belge, A., Kiliçalp, D., & Atasoy, N. (2004). Possible association between chronic laminitis and some biochemical parameters in dairy cattle. *Australian veterinary journal*, 82(9), 556-557.
- Benenaula, 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 Pregadro). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.
- Caballero, S., y Sumano, H. (1993). Caracterización del estrés en bovinos. *Arch Med Vet* 25, pp. 15-29.
- Coello, D. (2010). Técnica ELISA (Enzyme Linked inmunoabsorvent assay) Método de Elisa y Microelisa. Escuela Superior Politécnica del Litoral Definiciones Médicas.com. <http://www.slideshare.net/dicoello/metodo-de-elisa-y-microelisa>.

- Cultek. (2006). Soluciones ELISA Protocolo y Técnicas.
<https://es.slideshare.net/luissandorodri/soluciones-elisaprotocolos>
- Cunningham, J. (1999). Sistema Endocrino. En: Cunningham J (ed). Fisiología Veterinaria. Pag: 409-429. Editorial Elsevier 3rd ed. Madrid, España.
- Echeverría, R. (2002). Efecto de dos tiempos de ayuno con y sin transporte terrestre sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en novillos. Memoria de Titulación, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.
- Grandin, T. (1997). Evaluación del estrés durante el manejo y transporte. *J Anim Sci*, 75, pp. 6-7.
- Grilli, J. (2018). El material natural en la Biología escolar. Consideraciones éticas y didáctica sobre las actividades prácticas de laboratorio.
- Guzmán, E. (2004). Las pruebas de Elisa. *Gaceta Médica de México*, 140(3), 48.
Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2004/gms043o.pdf>
- Lagger, J., Schmidt, E., Waran, D. y Otrosky, R. (2004). Medición de cortisol en leche como indicador de bienestar animal. Resultados preliminares. *Vet Arg* 208, pp. 577-586.
- Lagger, J., Schmidt, E., Waran, N. y Otrosky R. (2017). Medición de cortisol en leche como indicador de bienestar animal, resultados preliminares. *Ciencia Veterinaria*, 6(1), pp. 12-21.
- Larry, E. (2012). *Metabolic and Endocrine Physiology*. Wyoming, EEUU: by Teton NewMedia.

- Lay, D., & Wilson, M. (2001). Physiological indicators of stress in domestic livestock. In Symposium on Concentrated Animal Feeding Operations Regarding Animal Behavior, Care, and Well-Being, Indiana, pp. 1-25.
- Lefcourt, A., Bitman, J., Kahl, S., & Wood D. (1993). Circadian and ultradian rhythms of peripheral cortisol concentrations in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 76(9), p. 2607-2612.
- Ley, S., Livingston, A., & Waterman, A. (1991). Effects of chronic lameness on the concentrations of cortisol, prolactin and vasopressin in the plasma of sheep. *The Veterinary Record*, 129(3), pp. 45-47.
- Ley, S., Waterman, A., & Livingston, A. (1996). Measurement of mechanical thresholds, plasma cortisol and catecholamines in control and lame cattle: a preliminary study. *Research in veterinary science*, 61(2), pp. 172-173.
- Maidana, P., Bruno, O., y Mesh, V. (2013). Medición de cortisol y sus fracciones una puesta al día. *MEDICINA (Buenos Aires)*. pp. 579-584
- Mejía, G., y Ramelli, M. (2006). Interpretación clínica del laboratorio. Ed. Médica Panamericana.
- Mejía, G., y Ramelli M. (1993). Interpretación clínica del laboratorio. 4ª edición, Bogotá-Colombia, Ed. Médica Panamericana.
- Moberg, G. & Mench, J. (2005). Biological response to stress: Implications for animal welfare. En: Moberg G, Mench J. *The biology of animal stress. Basic principles and implications for animal welfare*. Pp: 1-23. Editorial CABI Publishing. Cambridge, USA.

- Morrow, C., Kolver, E., Verkerk, G. & Matthews, L. (2002). Fecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenal activity in dairy cattle. *General and comparative endocrinology*, 126(2), pp. 229-241.
- Morton, D., & Griffiths, P. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec*, 116(16), p. 431-436.
- Ochoa, R. (2012). Técnicas inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. 1ª Edición. Finlay ediciones. La Habana. ISBN: 978-959-7076-47-6.
- Odeón, M., & Romera, S. (2017). Estrés en ganado: causas y consecuencias. *Revista veterinaria*, 28(1), p. 69-77.
- Oyarce, J., Tadich, N., y Gallo, C. (2002). Determinación de algunos constituyentes sanguíneos indicadores de estrés, en novillos en reposo. Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal. 2-4 octubre. Chillán, Chile.
- Protocol Place. (14 de abril de 2014). Competitive ELISA Tutorial 3: Analyzing Typical Competitive ELISA Data in Excel. Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=s2t0jiWxiDI>
- Ramsey I., y Tennant, B. (2012). “Manual de enfermedades infecciosas en pequeños animales”. Zaragoza, España: Lexus.
- Reece, W. (2009). *Dukes fisiología de los animales domésticos*. Acribia. pp. 754- 760

- Romero, M., Uribe, L., y Sánchez, J. (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.
- Suárez, I. (2017). Metodología ELISA para estudiar la Estabilidad de Medicamentos Biotecnológicos (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, España.
- Sumano, H., y Ocampo, L. (2006). *Farmacología Veterinaria*. 3ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Tadich, N., Gallo, C., y Alvarado, M. (2000). Efectos de 36 horas de transporte terrestre con y sin descanso sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en bovinos. *Arch. Med. Vet.* 32, 171-183.
- Tadich, N. (2004). Claudicaciones en la vaca lechera y su relación con el bienestar. Resúmenes seminario producción animal de calidad contemplando bienestar animal, Valdivia, pp. 32-39.
- Tadich, N., Gallo, C., y Alvarado, M. (2000). Efectos de 36 horas de transporte terrestre con y sin descanso sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en bovinos. *Archivos de medicina veterinaria*, 32(2), p. 171-183.
- Thun, R., Eggenberger, E., Zerobin K., Lüscher, T., & Vetter, W. (1981). Twenty-four-hour secretory pattern of cortisol in the bull: evidence of episodic secretion and circadian rhythm. *Endocrinol* 109(6), 2208-2212.

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

Tizard, I. (2002). *Inmunología Veterinaria*. México D. F., México: McGraw-Hill Interamericana.

Webster, A. (2001). Farm animal welfare: the five freedoms and the free market. *The veterinary journal*, 161(3), p. 229-237.

Tabla de cortisol: Bovinos Machos

Concentración de cortisol en µg/dl									
1,726	1,335	2,006	2,169	2,885	3,361	1,655	3,457	2,183	3,276
2,544	3,383	0,747	3,889	3,107	1,775	1,898	3,863	4,414	2,282
2,263	4,039	2,972	1,655	2,206	3,697	4,039	2,648	3,547	2,891
3,126	1,857	3,846	2,014	2,220	19,359	4,122	3,941	2,156	10,112
2,071	2,721	2,169	3,941	3,054	5,045	1,955	6,779	3,042	7,354
2,891	2,450	1,722	4,021	2,790	5,095	2,088	3,762	3,796	825,666
1,955	2,138	2,687	3,617	2,761	3,502	5,020	4,103	3,540	5,159
0,672	5,121	3,221	2,593	4,188	5,959	6,800	5,705	7,588	5,513
0,996	5,556	2,773	4,404	2,010	2,471	5,586	5,767	6,930	5,304
0,711	1,902	3,067	2,637	2,784	3,255	5,304	1,902	6,128	10,625

Tabla de cortisol: Bovinos Hembras

Concentración de cortisol en µg/dl									
3,228	1,626	4,188	1,415	1,528	28,180	1,926	4,455	4,304	4,561
7,135	2,593	3,262	1,232	2,248	8,207	2,692	2,642	2,997	0,958
4,304	9,562	11,207	6,779	2,019	14,489	3,524	2,340	2,320	1,408
9,903	398,261	9,852	2,761	8,305	8,143	4,794	9,205	2,825	1,714
2,653	7,588	9,753	3,730	1,552	5,146	3,048	2,445	1,212	3,812
2,978	1,168	3,361	3,054	1,444	4,971	5,862	2,415	2,258	1,584
5,108	1,989	14,364	1,964	4,030	1,295	4,947	3,255	1,491	1,818
1,342	5,456	8,049	0,915	2,360	4,094	6,307	2,384	4,012	1,320
2,006	5,943	3,959	1,688	44,490	2,749	3,221	5,133	1,861	0,398
3,762	3,166	3,420	1,806	6,736	10,748	3,594	1,434	1,535	1,265

Foto 1. Toma de muestra de sangre en tubo sin anticoagulante



Foto 2. Muestras de plasma de 100 hembras bovinas



Foto 3. Kit de Elisa reposando 20 minutos para tener los reactivos a temperatura ambiente



Foto 4. Enzimas y soluciones de lavado



Foto 5. Calibradores de cortisol



Foto 6. Pipeteo de cada muestra de plasma en posillos.



Foto 7. Incubacion de 60 minutos con control de biotina.



Foto 8. Luego de añadir el tampon de lavado 3 veces.



Foto 9. Lector de microplacas se lee la absorvancia a 450nm.

