



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACIÓN DE VALORES DE CORTISOL SÉRICO EN CERDOS (*Sus scrofa domesticus*) APARENTEMENTE SANOS A CONDICIONES DE ALTITUD MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA

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

AUTOR: CARLOS JULIO SUMBA SARMIENTO

TUTOR: DR. JUAN LEONARDO MASACHE MASACHE, MSc.

Cuenca - Ecuador

2024

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

Yo, Carlos Julio Sumba Sarmiento con documento de identificación N° 0105684302,
manifiesto que:

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

Cuenca, 02 de mayo del 2024.

Atentamente,

CARLOS SUMBA

Carlos Julio Sumba Sarmiento

0105684302

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

Yo, Carlos Julio Sumba Sarmiento con documento de identificación N° 0105684302, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del Trabajo experimental: “Determinación de valores de cortisol sérico en cerdos (*Sus scrofa domesticus*) aparentemente sanos a condiciones de altitud mediante la técnica de ELISA”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Médico Veterinario Zootecnista, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

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

Cuenca, 02 de mayo del 2024.

Atentamente,



Carlos Julio Sumba Sarmiento

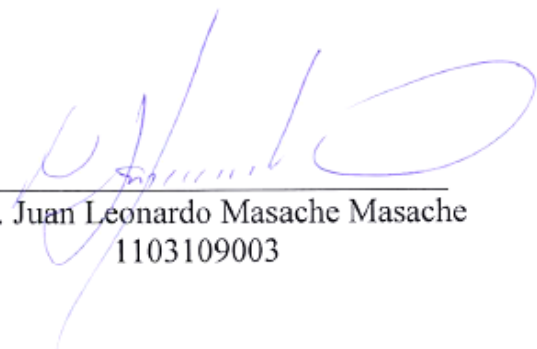
0105684302

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 VALORES DE CORTISOL SÉRICO EN CERDOS (*Sus scrofa domesticus*) APARENTEMENTE SANOS A CONDICIONES DE ALTITUD MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELISA, realizado por Carlos Julio Sumba Sarmiento con documento de identificación N° 0105684302, 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, 02 de mayo del 2024.

Atentamente,



Dr. Juan Leonardo Masache Masache
1103109003

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación principalmente a Dios por darme salud para poder permitirme cumplir esta meta en mi vida.

A mis padres Julio Cesar Sumba y Nancy Natividad Sarmiento por todo el amor y el apoyo que me brindaron durante este tiempo, por respetar mis decisiones y por ser mi fuerza de estudio, ellos siempre han estado junto a mi inculcándome valores y deseando lo mejor para mi vida.

A cada de uno de mis hermanos Juan, Miguel, Erika y Valeria quienes me motivaron a seguir adelante a pesar de las dificultades, y por estar en las buenas y en las malas, aconsejándome y guiándome siempre para sobrellevar cualquier obstáculo.

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a Dios por permitirme llegar hasta este lugar, por darme la capacidad para lograr mis metas y cumplir mis sueños.

Quiero agradecer a mi mamá porque ella es la mejor amiga que Dios me regaló, quiero agradecerle porque ella siempre confió en mí y me supo apoyar a su manera me enseñó a perseguir mis sueños y a nunca rendirme y que siempre habrá un motivo para sonreír, también por enseñarme a ver la vida de una manera distinta y que al final siempre podemos decir no pasa nada.

A mi papá quien me enseñó que las cosas difíciles se las consigue con mucho esfuerzo y sacrificio, quien me mostro que en la vida nada es difícil que todo se puede conseguir con mucha dedicación, gracias por dejarme perseguir mi sueño y por permitírmelo cumplirlo.

También a mi tutor el Dr. Juan Masache por compartir con sus experiencias a lo largo de la carrera universitaria y ahora por ser la guía de mi trabajo experimental.

A la Universidad Politécnica Salesiana, y a todos los docentes de la carrera de Medicina Veterinaria, agradezco por su apoyo y conocimientos compartidos durante mi vida universitaria, que han dedicado su tiempo más allá de las aulas de clase.

INDICE GENERAL

Resumen.....	14
Abstract	15
1. Introducción	16
1.1. Problema.....	17
1.2. Delimitación	17
1.2.1. Temporal	17
1.2.2. Espacial	18
1.2.3. Académica.....	19
1.3. Explicación del problema	19
1.4. Objetivos.....	20
1.4.1. Objetivo general	20
1.4.2. Objetivos específicos.....	20
1.5. Hipótesis	20
1.5.1. Hipótesis nula.....	20
1.5.2. Hipótesis alternativa.....	20
1.6. Fundamentación teórica.....	21
2. Revisión y análisis bibliográfico y documental	22
2.1. Clasificación taxonómica del cerdo.....	22
2.2. Cortisol	22
2.2.1. Definición.....	22
2.2.2. Estructura del cortisol.....	23

2.2.3.	Cortisol a nivel del Hipotalamo, Adenohipofisis y Adrenal	24
2.2.4.	Transporte del cortisol.....	24
2.2.5.	Descomposición y eliminación del Cortisol.....	24
2.2.6.	Efectos del cortisol cuando es liberado en el organismo	25
2.3.	Definición de Estrés.....	25
2.3.1.	Como actúa el estrés.....	25
2.3.2.	Eje Simpático-Adreno-Medular y el eje Hipotálamo-Hipófiso-Córtico-Adrena 25	
2.3.3.	Estructura de la Glandula Adrenal	27
2.3.4.	Fisiología del estrés	27
2.3.5.	Hormonas involucradas en la respuesta del estrés	29
2.3.6.	Regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA).....	30
2.4.	Indicadores fisiológicos de Bienestar Animal	32
2.5.	Niveles de cortisol en cerdos sometidos a estrés	33
3.	Materiales y métodos	35
3.1.	Materiales	35
3.2.	Métodos	38
3.2.1.	Diseño estadístico.....	38
3.2.2.	Selección y tamaño de la muestra	38
3.2.3.	Obtención de muestras sanguíneas.....	38
3.2.4.	Procedimiento para realizar la prueba de cortisol	38
3.2.5.	Variables de estudio	40

3.2.6. Toma y registro de datos	40
3.3. Consideraciones éticas.....	41
4. Resultados y discusiones:.....	45
4.1. Datos obtenidos en esta investigación	45
4.2. Unidades utilizadas para el cálculo de resultados	46
4.3. Valores referenciales de la bibliografía.	46
4.4. Discusión.	47
5. Conclusiones y recomendaciones.....	54
5.1. Conclusión.	54
5.2. Recomendaciones.	55
6. Referencias bibliográficas	64
7. Anexos.....	71

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Mapa del cantón Chordeleg	18
<i>Figura 2.</i> La producción del Cortisol, adaptada de Martin (1985).	23
<i>Figura 3.</i> La estructura del cortisol obtenida de citizendium. Enciclopedia en línea. (David E. Vold).....	23
<i>Figura 4.</i> El funcionamiento del eje HPA, adaptado de Kranendonk, 2006.	27
<i>Figura 5.</i> Ilustración de la curva estándar (ejemplo).	47
<i>Figura 6.</i> Curva estándar de los datos de absorbancia y valores de cortisol en $\mu\text{g}/\text{dl}$	48
<i>Figura 7.</i> Dispersión de líneas rectas y marcadores.	49
<i>Figura 8.</i> Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 90 cerdos.	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Materiales Físicos</i>	35
Tabla 2. <i>Materiales Biológicos</i>	36
Tabla 3. <i>Recursos Humanos</i>	36
Tabla 4. <i>Recursos Químicos</i>	37
Tabla 5. <i>Variables dependientes: plasma sanguíneo</i>	40
Tabla 6. <i>Variables independientes: Animales (cerdos)</i>	40
Tabla 7. <i>Primera placa de microtitulación analizadas en el Lector de Microplacas Elisa: absorbancia a 450nm: curva de absorbancia (6/6); plasma de cerdos (90/90)</i>	45
Tabla 8. <i>Segunda placa de microtitulación analizadas en el Lector de Microplacas Elisa: absorbancia a 450nm: curva de absorbancia (6/6); plasma de cerdas (90/90)</i>	46
Tabla 9. <i>Niveles de cortisol: Machos</i>	49
Tabla 10. <i>Niveles de cortisol: Hembras</i>	50
Tabla 11. <i>Análisis estadístico en machos</i>	50
Tabla 12. <i>Análisis estadístico en hembras</i>	51
Tabla 13. <i>Medias obtenida en esta investigación</i>	51

INDICE DE FOTOS

<i>Foto 1.</i> Muestra de plasma	72
<i>Foto 2.</i> Kit de Elisa reposando 20 minutos para tener los reactivos	73
<i>Foto 3.</i> Pipeteo de cada muestra	73
<i>Foto 4.</i> Luego de añadir el tampón de lavado 3 veces	74
<i>Foto 5.</i> Lector de microplacas se lee la absorbancia a 450nm	74

RESUMEN

El presente estudio de investigación tuvo como objetivo valorar los niveles de cortisol en cerdos aparentemente sanos en condiciones de altitud 2596 msnm mediante la técnica de ELISA cuantitativa. La investigación se desarrolló en el cantón de Chordeleg, Azuay, Ecuador. El procedimiento consistió en tomar muestras sanguíneas de 90 cerdos machos y 90 hembras; primero se extrajeron muestras de sangre venosa, y fueron sometidas a un proceso de centrifugación para obtener el suero sanguíneo. Para este inmunoensayo enzimático competitivo se emplearon reactivos que abarca anticuerpo, conjugado enzima-antígeno y antígeno nativo. Los datos obtenidos en el equipo de Lector de Microplacas Elisa en absorbancia a 450nm cuyos resultados fueron calculados empleando la curva de referencia 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 alcanzó una media de concentración de cortisol en plasma sanguíneo en cerdos de 1.378 $\mu\text{g}/\text{dl}$ en machos, 2.994 $\mu\text{g}/\text{dl}$ en hembras siendo un valor referencial útil en laboratorios clínicos veterinarios ubicados geográficamente en condiciones de altitud. Se desarrolló un estudio de tipo experimental deductivo - comparativo. Para el análisis estadístico se utilizó la estadística de medidas de dispersión la cual abarca la media, rango, mediana, moda, varianza, desviación típica y coeficiente de variación, graficación y también el programa Microsoft Excel.

ABSTRACT

The objective of this research study was to assess cortisol levels in apparently healthy pigs under altitude conditions of 2,596 meters above sea level using the quantitative ELISA technique. The research was developed in the canton of Chordeleg, Azuay, Ecuador. The procedure consisted of taking blood samples from 90 male and 90 female pigs; Venous blood samples were first extracted and subjected to a centrifugation process to obtain blood serum. For this competitive enzyme immunoassay, reagents comprising antibody, enzyme-antigen conjugate, and native antigen were used. 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 ($\mu\text{g}/\text{dl}$) . In this study, a mean concentration of cortisol in blood plasma in pigs of 1,378 $\mu\text{g}/\text{dl}$ in males, 2,994 $\mu\text{g}/\text{dl}$ in females, being a useful reference value in veterinary clinical laboratories located geographically in high altitude conditions. A deductive-comparative experimental type study was developed. For the statistical analysis, the statistics of dispersion measures were used, which includes the mean, range, median, mode, variance, standard deviation and coefficient of variation, graphing and also the Microsoft Excel program.

1. INTRODUCCIÓN

El ganado porcino es muy susceptible al estrés, con situaciones repetitivas que originan malestar, como la exposición a altas temperaturas medioambientales, por su condición corporal que le permite estar más protegido a temperaturas frías que al calor; por otra parte, son animales que mantienen situaciones de competencia para establecer jerarquías en los grupos donde están incluidos, desencadenando peleas o imposibilidad de alimentación o relación con otros animales.

El estrés es una respuesta fisiológica del organismo frente a situaciones que provocan ansiedad en el animal, y desencadenan diversas respuestas metabólicas y de comportamiento, pudiendo ocasionar problemas patológicos e inducir rendimientos menores en las especies productivas. Los mecanismos que desencadenan las situaciones de estrés son respuestas para proteger la supervivencia de los individuos, y son regulados en un principio por el eje hipotálamo-hipófisis que comunica el sistema nervioso central con el sistema endocrino, desencadenando reacciones para contrarrestar la situación adversa, y restaurar el estado fisiológico inicial. En una segunda fase, una vez el factor estresante ha sido percibido, la ACTH estimula la producción de cortisol en el córtex de la glándula adrenal, que a su vez induce distintas respuestas según el tipo y grado de estrés sufrido, pero que en general, induce cambios en el metabolismo, sistema inmune y reproductivo, y comportamiento del animal.

1.1. Problema

Son demasiados los factores estresantes en la vida del cerdo que afectan su bienestar, algunos de estos pueden ser el nacimiento, la castración, el destete, el embarque, transporte y desde luego su muerte, esto provoca una gran pérdida económica, ya que se produce carne de mala calidad, carnes suaves y con colores apáticos.

En los modernos sistemas intensivos de cerdos los animales están expuestos a muchos factores de estrés que pueden afectar a su salud y bienestar. Los problemas de estrés surgen mayoritariamente debido a problemas de manejo y de las instalaciones. Tras una situación estresante el sistema autónomo responde de manera inmediata causando la liberación de adrenalina en sangre, lo que provoca un daño en la canal del animal y pérdidas en su comercialización.

El cortisol actúa por retroalimentación negativa sobre la CRH y la ACTH, por lo que, en condiciones normales, tras el estrés, hay una aclimatación y reajuste para intentar volver a la normalidad. El efecto escalera ocurre cuando queda un estrés residual del anterior desafío y el animal no se ha podido reajustar fisiológicamente a niveles normales.

1.2. Delimitación

1.2.1. Temporal

El presente trabajo tuvo una duración de cuatrocientas horas, las cuales fueron distribuidas en el proceso experimental (redacción del proyecto, toma de muestras, recolección de información (encuestas para los animales clínicamente enfermos), procesamiento de la muestra (ELISA), tabulación de datos y escritura del documento final.

1.2.2. Espacial

Este trabajo se realizó en el Cantón Chordeleg, que se encuentra a 2596 msnm, con una temperatura que varía de 15-26°C, su latitud es de 2°56'00"S 78°46'00"O y su longitud es 104.9 km². El trabajo de investigación y evaluación se realizó en Cuenca en el laboratorio de ciencias de la vida biología II de la Universidad Politécnica Salesiana, empleando muestras sanguíneas las cuales obtuvimos de las diferentes granjas porcinas que se encuentran en el cantón Chordeleg.

Figura 1. Mapa del cantón Chordeleg



Fuente: (Google Maps, 2018)

1.2.3. Académica

En este proyecto se puso en práctica todos los conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera especialmente en el área de laboratorio clínico, para realizar los análisis pertinentes el mismo que aportará como material para la carrera y la ganancia de conocimientos para el estudiante.

1.3. Explicación del problema

Son demasiados los factores estresantes en la vida del cerdo y que afectan a su bienestar y a su producción, en la actualidad la demanda de carne de cerdo es demasiada, pero para la crianza de estos animales y para la obtención de carne de buena calidad se necesita disminuir los niveles de estrés ya que cuando hay la presencia de estrés hay el incremento del cortisol una sustancia que causa daños a la carne y a los animales incluso a veces causa la muerte.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Determinación de valores de cortisol sérico en cerdos aparentemente sanos a condiciones de altitud mediante la técnica de ELISA.

1.4.2. Objetivos específicos

- Analizar la concentración de cortisol sérico por el método de ELISA.
- Valorar la relación de los niveles de cortisol sérico y estrés en cerdos en condiciones de altitud.
- Establecer promedios de valores referenciales de cortisol sérico en cerdos.

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis nula

No existen diferencias significativas entre las medidas de valor de cortisol obtenidos en el laboratorio, con las medias y rangos internacionales.

1.5.2. Hipótesis alternativa

Existen diferencias significativas entre las medidas de valor de cortisol obtenidos en el laboratorio, con las medias y rangos internacionales.

1.6. Fundamentación teórica.

El presente trabajo de investigación se pretendió determinar los niveles de cortisol en la sangre de los cerdos en zonas geográficas de altitud en el manejo cotidiano de la producción. Las buenas prácticas de manejo son una herramienta fundamental para facilitar la crianza igualmente la producción, y así disminuir los niveles de estrés en los animales y no alteramos los niveles del cortisol ya que cualquier animal doméstico implica que tengamos un conocimiento detallado de su comportamiento para la toma de correctas decisiones en cuanto a las instalaciones, manejo y alimentación.

El identificar los niveles altos de cortisol en los cerdos de crianza, ayuda a que las personas que se dedican a la crianza de cerdos tomen conciencia sobre el impacto negativo que el estrés causa en los cerdos tales como: canales en pésimas condiciones para la comercialización, pérdidas económicas, animales muertos a temprana edad y por lo tanto tienen que optar por capacitar a los empleados, mejorar instalaciones y así disminuirá el nivel de estrés, y mejoraremos la salud de los animales. La finalidad es brindar información a los productores sobre las consecuencias que causa el estrés en los animales, cuando no se cuenta con el medio adecuado para su crianza y posterior transporte hacia las áreas de faenamiento.

2. Revisión y análisis bibliográfico y documental

2.1. Clasificación taxonómica del cerdo.

Reino	Animal
Tipo	Cordados
Subtipo	Vertebrados
Clase	Mamíferos
Orden	Ungulados
Suborden	Artiodáctilo
Familia	Suidae
Subfamilia	Suinos
Genero	<i>Sus</i>
Especie	<i>S. Scrofa doméstica</i>

Fuente: Fundación Hogares Juveniles Campesinos (2002)

2.2. Cortisol

2.2.1. Definición

El fundamental glucocorticoide en ganado porcino es el Cortisol (Heo, J. 2003. p. 263- 273).

El cortisol es secretado y producido por la zona fascicular, la capa media y la más amplia de la corteza suprarrenal. El cortisol es una hormona esteroide derivado del colesterol (Guyton, 2001. p. 1045-1061). Debido a su naturaleza lipofílica se extiende fácilmente por las membranas celulares hacia el centro de la célula, esta particularidad le permite interactuar con receptores intracelulares de mineralocorticoides y glucocorticoides (Mormède et al., 2007. p. 317-329).

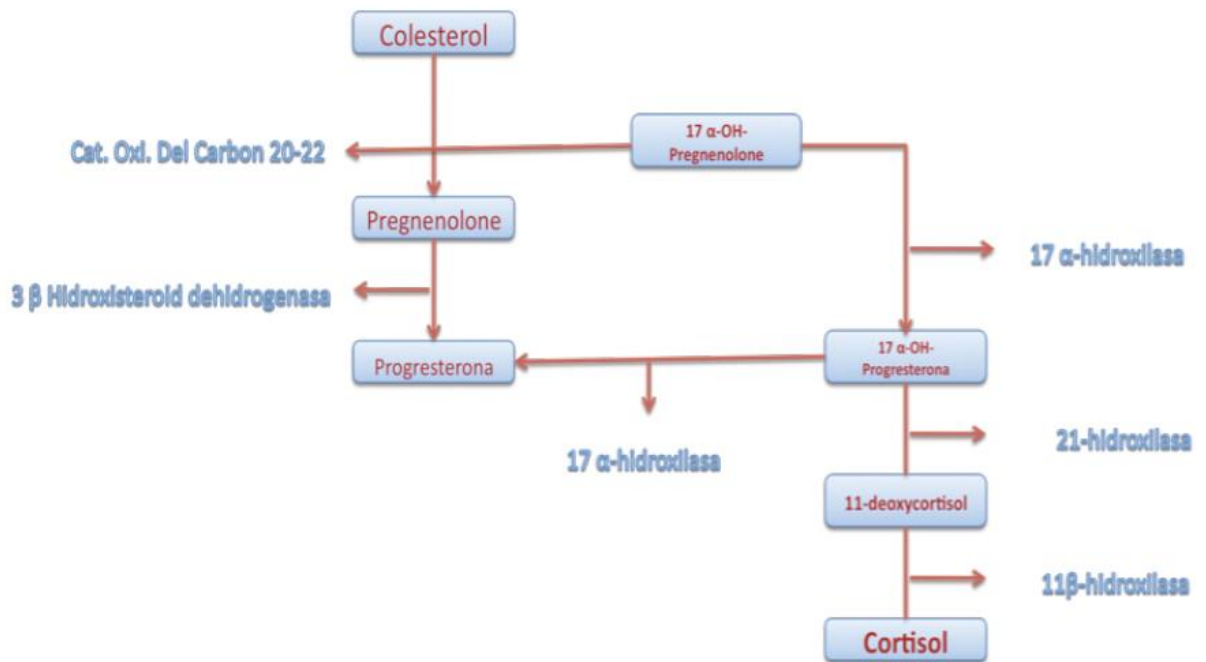


Figura 2. La producción del Cortisol, adaptada de Martin (1985).

2.2.2. Estructura del cortisol

El cortisol es un glucocorticoide con 21 átomos de Carbono que corresponde a la familia de los esteroides junto con los estrógenos, andrógenos y progesterona (Kirschbaum y Hellhammer, 1989. p. 150-169; Cooks et al., 1996. p. 329-335)

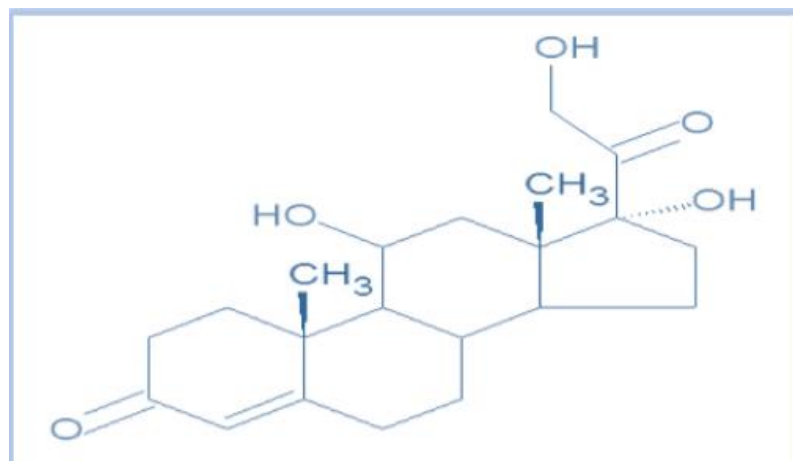


Figura 3. La estructura del cortisol obtenida de citizendium.

2.2.3. Cortisol a nivel del Hipotalamo, Adenohipofisis y Adrenal

El Cortisol crea retroalimentación negativa a nivel Hipotalámico, Adenohipofisiario y Adrenal; de esta manera se autorregula por retroalimentación negativa el eje HPA. En este proceso el Hipocampo es quien posee una considerable concentración de receptores de corticoesteroides en el cerebro, por lo que se considera un mediador primordial en este feedback inhibitorio de glucocorticoides (Tuchscherer, M. et al., 2004. p. 503-511).

La activación del eje HPA por estresores que resultan en la liberación de glucocorticoides tales como el cortisol en cerdos es un modulador importante de la respuesta inmune (Sapolsky, R. et al., 2000. p. 55-89; Anisman, H. et al., 2003. p. 86-93).

2.2.4. Transporte del cortisol

Alrededor de un 10% del cortisol que se libera a la circulación se mantiene en estado libre, lo que pertenece a la fracción de la hormona activa, el resto del cortisol circulante se vincula a proteínas transportadoras, un 70% la globulina de unión a transcortina, y un 20% a la albúmina (Mormède et al., 2007. p. 317-329).

Esta unión retarda la eliminación del cortisol plasmático por lo tanto la semivida de éste es larga, aproximadamente de 60-90 min (Guyton 2001. p. 1045-1061). En mayores concentraciones como durante una estimulación con ACTH o estrés, los niveles plasmáticos de cortisol incrementan rápidamente en un 20-30% (Mormède et al., 2007. 317-329).

2.2.5. Descomposición y eliminación del Cortisol

El cortisol se descompone en el hígado donde es conjugado para formar ácido glucorónico, alrededor de un 25% de éstos conjugados se elimina por la bilis y las heces (Guyton 2001. p. 1045-1061). Tiene actividad catabólica tanto proteolítica y lipolítica en tejidos periféricos y una actividad anabólica en hígado, incluyendo síntesis proteica y gluconeogénesis (Mormède et al., 2007).

2.2.6. Efectos del cortisol cuando es liberado en el organismo

Tiene efectos metabólicos, antiinflamatorios, cardiovasculares e inmunológicos, entre otros. Posee un papel importante en la maduración fetal, inducción del parto, formación de enzimas hepáticas y la adaptación al estrés después del nacimiento (Heo J. et al., 2003. p. 263- 273).

2.3. Definición de Estrés

El Estrés es una variedad de respuestas comportamentales, fisiológicas, e emocionales (Jensen y Toates, 1997. p. 145–156) frente a estímulos estresores que alteran la homeostasis de un individuo (Murata, 2007. p. 473–474). Estos estímulos pueden ser factores físicos, fisiológicos, conductuales o psicológicos (Brousset Hernandez-Jauregui et al., 2005. p. 325–337).

2.3.1. Como actúa el estrés

El Estrés actúa como una señal de alarma que inicia en el cerebro, el cual revela el peligro en el medio y es el delegado de evaluar la situación y producir una respuesta neurofisiológica que finalmente culmina con la activación del Sistema Nervioso Central Autónomo Simpático y la liberación al torrente sanguíneo de Glucocorticoides y Catecolaminas (Mormede, P. et al., 2007)

El estrés es un factor importante en la industria animal ya que perjudica la tasa de crecimiento y la producción (Monteiro et al., 2016), la calidad de la carne, el bienestar de los animales (Zimmerman et al., 2011. p. 137–142) y la susceptibilidad a enfermedades (Kim et al., 2011. p. 151–157).

2.3.2. Eje Simpático-Adreno-Medular y el eje Hipotálamo-Hipófiso-Córtico-Adrenal.

Para conseguir esto se activan dos ejes: eje Simpático-Adreno-Medular y eje Hipotálamo-Hipófiso-Córtico-Adrenal (Márquez, C. et al., 2004. p. 301-612).

El primer eje produce una respuesta rápida y potente (vía nerviosa), y el segundo mediado por hormonas origina una respuesta más lenta pero prolongada. Para conseguir la activación de estos dos ejes, los estímulos estresógenos crean a nivel del SNC, un patrón de activación inespecífico en el sistema límbico, estructuras corticales y subcorticales del cerebro de una forma vegetativa e inconsciente. En el interior del sistema límbico se encuentra la amígdala y el complejo amigdalino (responsables del miedo y la ira); aquí los patrones de excitación más minuciosos se dotan de calidad afectiva mediante la activación de redes neuronales innatas, filogenéticamente más viejas. Mediante proyecciones descendentes, en especial hacia los núcleos centrales noradrenérgicos del tronco encefálico se llega al sistema simpático. Filamentos ascendentes de las neuronas noradrenérgicas localizadas en el locus coeruleus y en el tronco encéfalo refuerzan la activación en la zona de la amígdala y en el núcleo central hipotalámico, así como en la zona de la corteza prefrontal, responsable de los fenómenos anticipatorios. Surge un patrón de excitación que va subiendo por entre la corteza cerebral, el sistema límbico y los núcleos centrales noradrenérgicos (estimulando el eje Simpático-Adreno-Medular), el cual si no se ve reprimido por otras entradas conduce a la activación de las células del núcleo paraventricular hipotalámico y con ello a la estimulación del sistema hipotalámico-hipófiso-corticoadrenal (HPA); es decir, la activación duradera del sistema nervioso noradrenérgico, sistema límbico y estructuras corticales genera finalmente la activación del HPA (Ganong, W. et al., 2010, Gimsa U. et al., 2018. p. 64).

Las células del Núcleo Paraventricular Hipotalámico son las encargadas de producir y liberar la Hormona Liberadora de Corticotropina (CRH) hacia el torrente sanguíneo del sistema porta-adenohipofisario. Por sangre, esta hormona viaja y se dirige hacia sus células blanco/diana (células corticotropas) ubicadas en adenohipófisis y productoras de Adrenocorticotrópina (ACTH). Tras la liberación de ACTH a sangre sistémica, ésta viaja hasta encontrarse con sus receptores, ubicados en la Glándula Adrenal. (Guyton A. y Hall, 2016).

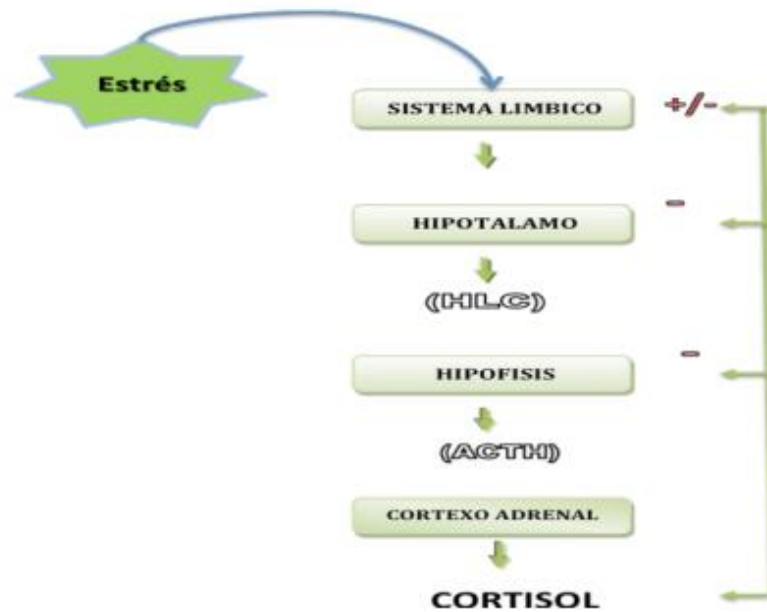


Figura 4. El funcionamiento del eje HPA, adaptado de Kranendonk, 2006.

2.3.3. Estructura de la Glándula Adrenal

La Glándula Adrenal está formada de una Corteza (periférica) y una Médula (ubicada en el centro de la Glándula). La Médula es la que produce las Catecolaminas como la Adrenalina, Noradrenalina y Dopamina, y la Corteza produce los Mineralocorticoides, Glucocorticoides y Esteroides Sexuales. La Corteza adrenal se subdivide en tres zonas: Zona Glomerular, Zona Fascicular y Zona Reticular (Mormede, P. et al., 2007. p. 317-39).

2.3.4. Fisiología del estrés

El sistema nervioso periférico aferente frente a un estímulo es quien lo percibe y transmite la señal a las áreas sensitivas del sistema nervioso central (SNC). Una vez que el SNC percibe la amenaza, desarrolla una defensa biológica que consta en la combinación de 4 respuestas: la primera del sistema nervioso autónomo, la segunda neuroendócrina, la tercera comportamental y una cuarta del sistema inmunológico (Moberg y Mench, 2000).

La primera respuesta implica a los ejes simpáticos-adrenales (sistema nervioso autónomo simpático-médula adrenal) y luego el eje hipotálamo-hipófisis-corteza adrenal (HHA). El

sistema nervioso autónomo actuara sobre varios sistemas como en la médula adrenal (Moberg y Mench, 2000). Ésta responde mediante la secreción de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), y actúan aumentando la presión sanguínea y el ritmo cardiaco del animal (Gregory, 1998, p. 1–14).

(Moberg y Mench, 2000) afirman que esta respuesta no genera un impacto significativo sobre el bienestar animal prolongado, dado que se trata de una respuesta rápida y breve. Por otra parte, una de las respuestas al estrés más estudiadas dentro de la ciencia del bienestar animal es la del eje HHA y la secreción hormonal que éste implica. Los efectos de su activación se observan en la inmunología del organismo, capacidad reproductiva, metabolismo y comportamiento (Jensen y Toates, 1997. p. 145–156; Moberg y Mench, 2000).

La respuesta del eje HHA empieza con la secreción de arginina vasopresina (AVP) y/o de hormona liberadora de corticotropina (CRH) por parte del hipotálamo (Brousset Hernandez-Jauregui et al., 2005. p. 325–337; Kanitz et al., 2005. p. 213–224).

La CRH estimula la hipófisis anterior para secretar hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la cual induce la secreción de glucocorticoides (ej. cortisol) por parte de la corteza adrenal. Como resultado final se afecta el metabolismo de carbohidratos (gluconeogénesis), proteínas (proteólisis) y lípidos (lipólisis) (Brousset Hernandez-Jauregui et al., 2005. p. 325–337; Averós et al., 2009. p. 339–344). Una vez que el organismo ha respondido al estímulo, se activa una respuesta de retroalimentación negativa, donde los niveles sanguíneos de cortisol provocan el fin de la secreción de ACTH de la hipófisis y CRH del hipotálamo, lo que a su vez finaliza la secreción de catecolaminas de la médula adrenal (Brousset Hernandez-Jauregui et al., 2005. p. 325–337).

La medición cuantitativa de la secreción de catecolaminas y de cortisol provocada por algún factor estresante, ofrece la posibilidad de determinar el grado de importancia de los factores

desencadenantes del estrés. La cantidad de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), cortisol y tiroxina presentes en el torrente circulatorio se encuentran correlacionadas positivamente con la intensidad del estrés, en donde la adrenalina refleja un estrés fisiológico, mientras la Noradrenalina se relaciona con la actividad física del animal; en la mayoría de las veces la adaptación del animal al estrés depende de la velocidad con la que se producen los cambios hormonales, las catecolaminas ejercen a través de mecanismos de estimulación metabólica un efecto negativo en la calidad de la carne (Ganong, 2010).

2.3.5. Hormonas involucradas en la respuesta del estrés

Las hormonas principalmente involucradas en la respuesta al estrés son los glucocorticoides y las catecolaminas (Becker et al., 2002. p. 409-450). El sistema nervioso periférico está compuesto por el sistema nervioso simpático (SNS), y el sistema nervioso parasimpático (SNPs), cuyas funciones son antagónicas. El SNPs media las funciones vegetativas, tales como el crecimiento, la digestión, el ritmo cardíaco lento y la respiración, generalmente es estimulado durante el descanso, o después de una gran ingesta de alimentos. En contraste, el sistema nervioso simpático (SNS) es estimulado al despertar, ante una situación de alarma, o en un estado de emergencia (Becker et al., 2002. p. 409-450). La respuesta cardiovascular al estrés comprende un aumento en el gasto cardíaco y la presión sanguínea mediante la acción de las catecolaminas, este tipo de acciones se ejerce a corto plazo (Sapolsky et al., 2000. p. 55-89, Guyton 2001. p 1045-1061, Nelson 2005).

La secreción de glucocorticoides en respuesta al estrés agudo modela y restringe la respuesta inmune, sin embargo, la exposición prolongada a la secreción de glucocorticoides puede contribuir al desarrollo de inmunosupresión. En caso del metabolismo incrementan las concentraciones circulantes de glucosa disponibles para su utilización por órganos esenciales para la vida, tales como el cerebro y el corazón, y estimulan la glicogenólisis y gluconeogénesis mediante el glucagón y las catecolaminas. Ante situaciones de estrés pueden suprimir la

conducta de alimentación, este efecto se desencadena dentro de una hora incluso en animales con privación del alimento (Sapolsky et al., 2000. p. 55-89, Becker et al., 2002. p.409-450).

Otras hormonas liberadas en la respuesta al estrés son las endorfinas, la prolactina, la vasopresina, y la secreción pancreática de glucagón. Las endorfinas son secretadas por la glándula pituitaria, y su rol en la respuesta al estrés se relaciona con la regulación de la percepción del dolor. La vasopresina, hormona secretada por la neurohipófisis, está involucrada en la regulación del volumen de agua y la función renal. El glucagón participa en la regulación de la disponibilidad de glucosa (Becker et al., 2002. p.409-450, Möstl y Palme 2002. p. 67–74.).

2.3.6. Regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA)

Cuando un estímulo actúa sobre los sentidos de un animal, el sistema nervioso aferente lo recibe y conduce a las áreas sensitivas del sistema nervioso central. Entonces se genera una respuesta enfocada a disminuir el impacto del estímulo, a través del sistema nervioso autónomo y neuroendocrino (Brousset et al., 2005. p. 325–337).

La estimulación de la parte simpática del sistema nervioso autónomo provoca la primera curva de secreción hormonal, ésta ocurre dentro de segundos e involucra un aumento de la secreción de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) desde la médula adrenal; el hipotálamo inicia la respuesta al estrés mediante el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) liberando la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que es secretada por el plexo capilar primario en la eminencia media del hipotálamo hacia la circulación porta. Esta hormona estimula las células especializadas de la glándula pituitaria anterior (corticotrofos) induciendo la liberación de adrenocorticotropina (ACTH) 10 minutos después, la que a su vez provoca la estimulación de la corteza adrenal, y la posterior liberación de glucocorticoides hacia la circulación (Sapolsky et al., 2000. p. 55-89, Becker et al., 2002. p.409-450, Keay et al., 2006.

p. 234–244). Los glucocorticoides son esteroides que tienen dos formas de presentación: el cortisol y la corticosterona; siendo el cortisol más dominante en primates, humanos, ovejas, cerdos, visón, zorro y peces, y la corticosterona en aves, reptiles y roedores (Becker et al., 2002. p.409-450, Romero, 2002. p. 1-24, Mormède et al., 2007. p. 317-39). En la regulación de la actividad secretora del eje HHA, el cortisol ejerce un efecto directo de retroalimentación negativa sobre el hipotálamo disminuyendo la síntesis de CRH y/o directamente sobre la adenohipófisis, lo que genera una reducción de la formación de ACTH (Guyton 2001. p 1045-1061).

La actividad del eje HHA es variable, puesto que el ciclo diurno esta genéticamente determinado y sincronizado por la luz, sumada a esta fuente de variabilidad, la secreción de cortisol es pulsátil, con una periodicidad de alrededor de 90 minutos. En general, el máximo de los niveles hormonales ocurre en el inicio del período de luz en animales diurnos, mientras que en las especies nocturnas éste ocurre al fin del período de luz (Brousset et al., 2005. p. 325-337). Sumado a esta variabilidad, se ha descrito que la respuesta al estrés es relativamente no específica, esto quiere decir que diferentes fuentes de estrés pueden llegar a producir similares respuestas conductuales y fisiológicas en un individuo (Nelson 2005).

(Wingfield y Kitaysky., 2002. p. 600-609), propusieron tres niveles en la secreción de glucocorticoides, el primero corresponde a una secreción de niveles basales, los que cumplirían un rol esencial de mantención en la regulación de sales y energía; el segundo nivel corresponde a los cambios predecibles que ocurren durante un período de tiempo que puede estar regulado por ritmos circadianos y circanuales, es decir, involucra el metabolismo, los procesos de osmorregulación, y los cambios fisiológicos y conductuales del individuo dentro de un ciclo; y el último nivel abarca las respuestas generadas ante una situación impredecible, lo que consecuentemente podría registrar los aumentos transitorios más altos de secreción de glucocorticoides en un individuo.

Una exposición repetida a un factor estresante o una condición de estrés crónico tiene implicancias directas en la conducta y fisiología de un animal. Tales efectos involucran cambios a nivel del eje HHA al realzar las subsecuentes respuestas frente a nuevas fuentes de estrés. Este tipo de respuestas se entiende como facilitación, y corresponde a la mantención o al realce de la actividad del eje HHA en animales previamente estresados, producido por una señal de retroalimentación negativa en respuesta a la liberación de glucocorticoides como resultado de experiencias de estrés crónico, estos cambios parecen depender de la fuente de estrés y del circuito neuronal y su actividad (Bhatnagar y Vining 2003. p. 158-165, Romero 2004. p. 249-255, Mormède et al., 2007. p. 317-39). La interpretación de la respuesta al estrés como instrumento de medición debe ser cuidadosa debido a la variación de la actividad del eje HHA, determinado tanto por factores internos (genética y secreción pulsátil de cortisol) como por factores externos (ingesta de alimento, temperatura, régimen de luz) (Moberg 2000. p. 1-21., Mormède et al., 2007. p. 317-39).

2.4. Indicadores fisiológicos de Bienestar Animal

Existen diversos metabolitos que son considerados indicadores fisiológicos de bienestar, dado que son liberados cuando un estímulo estresante actúa sobre el organismo. Las hormonas corticosteroides adrenocorticales tales como el cortisol son muy utilizadas como indicadores (Brousset Hernandez-Jauregui et al., 2005. p. 325–337). La medición de la concentración de cortisol se encuentra ampliamente difundida, aunque algunos estudios no obtuvieron resultados concluyentes en relación a su concentración y el factor de estrés evaluado. Al respecto, (Averós et al., 2009. p. 339–344) en estudios en cerdos, no encontraron diferencias en los niveles de cortisol como respuesta a distintos tiempos de viaje. En este sentido, (Scollo et al., 2014. p. 26–35) tampoco observaron diferencias en la concentración de cortisol en saliva al comparar diferentes densidades de carga animal en el sistema de producción. No obstante, otros trabajos afirman que el factor estresante en estudio efectivamente afectó la concentración de cortisol en

los animales. (Blumetto Velazco et al., 2013. p. 521–529) encontraron diferencias en la concentración sérica de la hormona, al comparar cerdos criados en diferentes sistemas de producción. Igualmente, (Dalla Costa et al., 2008 – 2009. p. 852–858) encontraron efecto de diferentes tiempos de ayuno pre-faena sobre la concentración de dicha hormona esteroidea. En resumen, las evidencias citadas no son concluyentes para validar el uso del cortisol como único indicador objetivo de estrés.

2.5. Niveles de cortisol en cerdos sometidos a estrés

Según (Santana et al., 2009. p. 149-152) Indican que las concentraciones de cortisol en sangre en cerdos en descanso (muestras tomadas sobre 10 cerdos a final de engorde) y cerdos sometidos a manejo previo al sacrificio con aturdimiento eléctrico (20 animales de la misma explotación sometidos a 90 V y 250mA y muestras tomadas inmediatamente después del aturdimiento) dio como resultado concentraciones medias de cortisol de 21,70 ng/ml de sangre en el caso de los cerdos en descanso y de 74,5 ng/ml en los sometidos a manejo previo al sacrificio, un valor 3,5 veces mayor al observado en el otro grupo de animales. Estas diferencias son significativas y denotan la presencia de estrés debido al manejo previo al sacrificio.

En los últimos años, diversas investigaciones (Merlot et al., 2010. p. 21–26; Carreras et al., 2016. p. 39–44) han comparado situaciones productivamente contrastantes, en diferentes momentos, y encontraron que los cerdos bajo confinamiento presentan niveles de cortisol menores que cerdos en sistemas con enriquecimiento ambiental. La elevada densidad de alojamiento tampoco se ha podido asociar a incrementos en la concentración de cortisol circulante en cerdos (Marco Ramell et al., 2011. p. 66–71).

Se ha observado que ante situaciones de estrés crónico la concentración de cortisol circulante puede disminuir, a diferencia de lo que se creía hasta hace 25 años atrás. Esto se debe a que, frente a una exposición prolongada a un mismo factor estresante -ej.: amoníaco

atmosférico, ambiente sin enriquecimiento, etc. se puede producir una disminución en la capacidad de respuesta e incluso, una habituación del eje HHA al mismo estresor. En otras palabras, la activación sostenida del eje HHA durante un periodo de tiempo prolongado puede conducir a hipertrofia cortical e hiperplasia, como así también a una inhibición en la producción de cortisol mediante retroalimentación negativa (O'Connor et al., 2010).

Heo et al. (2005) habían arribado a conclusiones similares al observar una disminución en la concentración de cortisol en cerdos sometidos a estrés durante siete días. Del mismo modo, Coutellier et al. (2007) han propuesto que una exposición prolongada y repetida al reagrupamiento y cambio de sitio, puede llegar a amortiguar la respuesta aguda del cortisol.

Merlot et al. (2004) han observado que aquellos cerdos expuestos al reagrupamiento muestran menores niveles de la hormona en las 27 y 51 h posteriores al estrés, en comparación con aquellos que no fueron reagrupados. En general, los cerdos que están alojados en galpones de engorde se encuentran sometidos a concentraciones elevadas de amoníaco atmosférico, si es que las instalaciones carecen del equipamiento necesario que asegure un ambiente adecuado.

Broom, (2017) se afirma que “frente a diferentes condiciones ambientales, que podrían ser entendidas como estresantes para algunos individuos, es factible no evidenciar cambios en las concentraciones de cortisol” p. 30–32. Sin embargo, esto no significa que el cerdo no esté atravesando por una situación estresante. Ciertas situaciones de estrés agudo (ej.: destete (Kim et al., 2011. p. 151-157) sí pueden elevar la concentración de la hormona, mientras que otras que significan problemas crónicos pueden manifestarse de otra manera, por ejemplo a través de comportamientos anormales.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

Tabla 1. *Materiales Físicos*

Descripción	Unidad	Cantidad
Hojas de papel bond	Unidad	50
Esferos	Unidad	1
Mandil	Unidad	1
Computador	Unidad	1
Micropipeta automática	Unidad	5
Pipeta multicanal	Unidad	1
Gorra desechable	Unidad	1
Guantes	Caja	1
Puntas para pipetas 200 ug	Paquete (1000)	200
Tubos tapa roja de 10cc	Unidad	160
Pocillos	Unidad	2
Cámara celular	Unidad	1
Equipo de ELISA	Unidad	2

Tabla 2. *Materiales Biológicos*

Descripción	Unidad	Cantidad
Animales	Unidad	160
Sangre	ml	6
Suero	ml	0.5
Agua destilada	Litro	1

Tabla 3. *Recursos Humanos*

Nombre	Descripción
Dr. Juan Masache Masache	Tutor
Ing. Mauricio Salas	Laboratorista
Carlos Julio Sumba Sarmiento	Tesista

Tabla 4. *Recursos Químicos*

Descripción	Unidad	Cantidad
Calibradores de Cortisol.	Unidad	50
Reactivo enzimático de cortisol.	Unidad	1
Reactivo de cortisol biotina.	Unidad	1
Placa recubierta de estreptavidina - 96 posillos	Unidad	1
Concentrado de solución de lavado.	Unidad	5
Sustrato A - contiene tetrametilbencidina (TMB) en tampón.	Unidad	1
Sustrato B – contiene peróxido de hidrogeno (H2O2) en bufer.	Unidad	1

3.2. Métodos

3.2.1. Diseño estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó la estadística de medidas de dispersión la cual abarca la media, rango, mediana, moda, varianza, desviación típica y coeficiente de variación, graficación y también el programa Microsoft Excel 2016.

3.2.2. Selección y tamaño de la muestra

Para esta investigación se realizará un examen clínico general y particular en el cual se determinará que los pacientes se encuentren aparentemente sanos, la población total de cerdos en el Cantón Chordeleg de alrededor de 6000 animales contando pequeños criadores y los que se dedican a la porcicultura. Se efectuará un análisis de los niveles de cortisol, en una muestra de ciento sesenta cerdos, entre ellos 90 hembras y 90 machos del cual se extrajo sangre y se centrifugo y se utilizó para obtener el suero sanguíneo del cual se realizó la prueba de ELISA cuantitativo.

3.2.3. Obtención de muestras sanguíneas

Se utilizara jeringas estériles de plástico de 18 x 1,2 mm de tipo descartables; con ayuda de un colaborador, se sujetará a cada animal con ayuda de otra persona por la cabeza sujetando a los cerdos con una soga del hocico y asegurar contra una barra fija mientras que otra persona levantará las patas de los cerdos y el dueño del proyecto realizará la hemostasia en el cuello antes relieve la vena yugular , se extraerá 6ml de sangre se colocaran en el tubo vacutainer sin anticoagulante para la obtención del suero.

3.2.4. Procedimiento para realizar la prueba de cortisol

Para realizar la prueba antes 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 utilizó es de la marca AccuBind® ELISA importado de Lake Forest del condado de Orange, California, USA.

El método de prueba se desarrolló 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 pocillos.
- 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 agitar la placa después de la adición 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: plasma sanguíneo*

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

Tabla 6. *Variables independientes: Animales (cerdos)*

Concepto	Categorías	Indicadores	Índice
Cerdos que se encuentran aparentemente sanos	Cerdos	Numero de hembras Numero de machos	Numero Numero

3.2.6. Toma y registro de datos

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

3.3. Consideraciones éticas

El punto de vista más importante que debe ser tomado en cuenta dentro de esta investigación es brindar capacitaciones de cómo realizar de manera adecuada y correcta la extracción de sangre y así disminuiremos el estrés y el dolor al momento de extraer la muestra de sangre, ya que esto es un proceso doloroso para el paciente.

Hay que tener mucho en cuenta el estado sanitario de los materiales que se van a utilizar al momento de sacar las muestras tales como jeringuillas y tubos vacutainer estos deben estar en condiciones estériles para así evitar cualquier enfermedad o contagio al paciente y obtendremos datos más confiables para el proyecto.

Ejecutar de la mejor manera las prácticas de sujeción aprendidas en la universidad y con la mejor cautela para causar menor dolor ya que estamos trabajando con seres vivos.

Todos estos puntos están planteados de acuerdo al Código de Salud de animales terrestres de la OIE.

4. Resultados y discusiones:

4.1. Datos obtenidos en esta investigación

Luego del análisis del cortisol en plasma de porcinos machos y hembras obtuvimos las siguientes tablas:

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

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,309	0,644	0,679	1,230	0,834	1,171	1,357	1,377	0,988	1,299	1,153	0,923
B	1,067	1,633	0,379	0,134	0,821	1,584	1,457	1,599	1,021	1,493	1,411	1,521
C	0,767	1,618	1,159	0,842	1,165	1,447	1,514	1,033	0,962	1,037	1,301	1,037
D	0,237	1,050	1,486	1,168	1,027	1,219	0,788	2,140	1,219	0,874	1,220	1,443
E	0,17	1,245	1,904	0,790	1,330	1,070	1,232	1,144	1,188	1,277	1,273	1,277
F	0,116	1,135	1,565	1,059	0,957	1,194	1,408	1,234	1,635	1,255	2,038	1,409
G	1,890	0,915	1,358	1,250	1,396	1,507	1,126	1,196	1,460	0,655	0,878	2,522
H	1,663	1,779	1,270	0,887	1,292	1,011	1,081	0,929	1,849	1,557	1,126	2,463

Tabla 8. Segunda placa de microtitulación analizadas en el Lector de Microplacas Elisa:
 absorbancia a 450nm: curva de absorbancia (6/6); plasma de cerdas (90/90)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,309	0,644	0,679	1,230	0,834	1,171	1,357	1,377	0,988	1,299	1,153	0,923
B	1,067	1,633	0,379	0,134	0,821	1,584	1,457	1,599	1,021	1,493	1,411	1,521
C	0,767	1,618	1,159	0,842	1,165	1,447	1,514	1,033	0,962	1,037	1,301	1,037
D	0,237	1,050	1,486	1,168	1,027	1,219	0,788	2,140	1,219	0,874	1,220	1,443
E	0,17	1,245	1,904	0,790	1,330	1,070	1,232	1,144	1,188	1,277	1,273	1,277
F	0,116	1,135	1,565	1,059	0,957	1,194	1,408	1,234	1,635	1,255	2,038	1,409
G	1,890	0,915	1,358	1,250	1,396	1,507	1,126	1,196	1,460	0,655	0,878	2,522
H	1,663	1,779	1,270	0,887	1,292	1,011	1,081	0,929	1,849	1,557	1,126	2,463

4.2. Unidades utilizadas para el cálculo de resultados

Las unidades utilizadas para medir el cortisol son en ng/ml y en µg/dl, según Larry E. (2012) y el fabricante del kit de cortisol Monobind Inc. trabajan en las unidades de µg/dl. Monobind Inc. (2019). Cortisol AccuBind ELISA – IFU Rev

Según IBL INTERNATIONAL GMBH (2012). Ejemplariza que la conversión se realiza de la siguiente manera: cortisol (ng/mL) x 2.76 = nmol/L; cortisol (µg/dl) x 27.6 = nmol/.

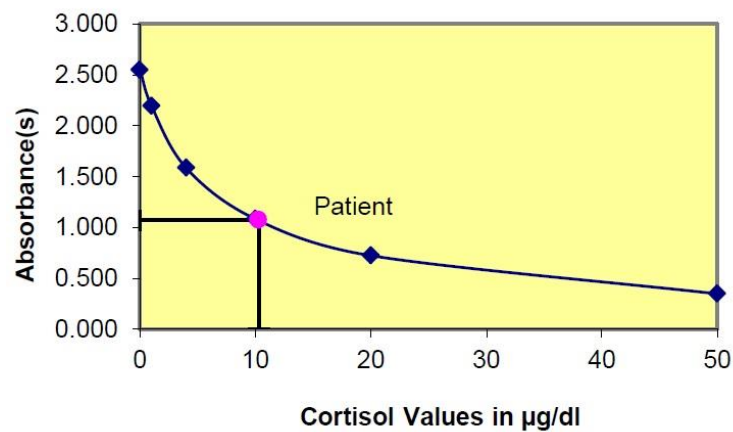
4.3. Valores referenciales de la bibliografía.

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

4.4. Discusión.

Para ejecutar el siguiente trabajo se tomó la muestra de sangre para la obtención de plasma sanguíneo en 180 animales, 90 cerdos y 90 cerdas, luego del procedimiento en el equipo de ELISA obtenemos los resultados en absorbancia de 450 nm que interseca la curva de dosis respuesta a la concentración de cortisol en ug/dl, Monobind Inc. nos da un ejemplo mediante una figura de una curva estándar que nos sirve para la obtención de la concentración de cortisol.

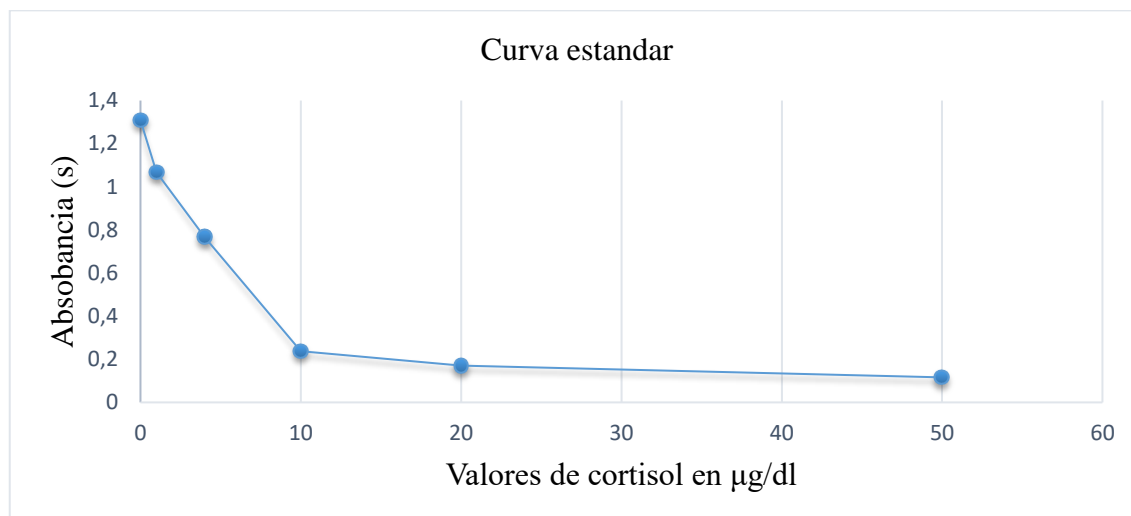
Figura 5. Ilustración de la curva estándar (ejemplo).



Fuente: Monobind Inc. 2019

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

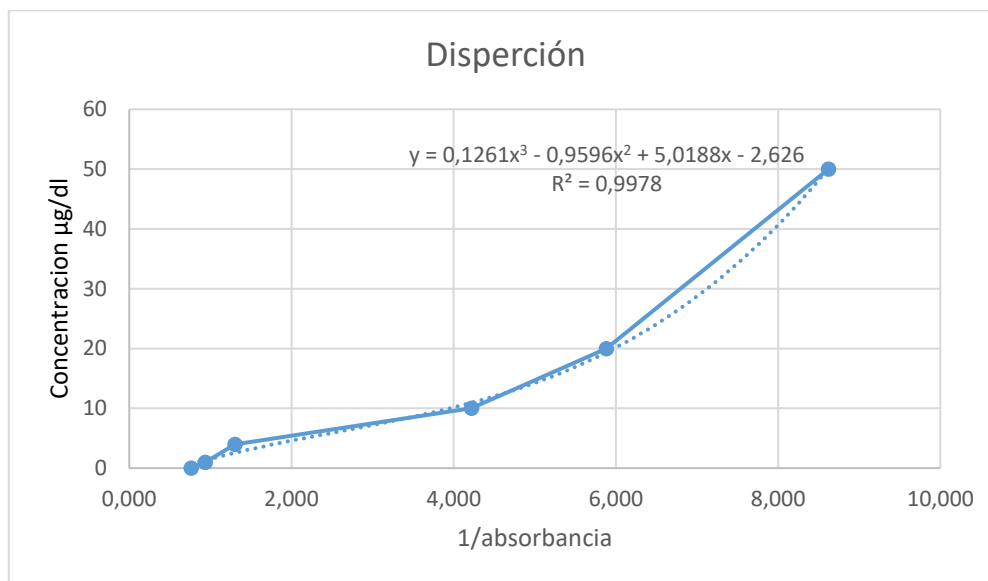
Figura 6. Curva estándar de los datos de absorbancia y valores de cortisol en $\mu\text{g/dl}$



Los datos obtenidos en el equipo de ELISA nos da 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 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 7. *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 9. *Niveles de cortisol: Machos*

Concentración de cortisol en $\mu\text{g/dl}$								
-0,221	3,087	2,192	0,659	0,319	0,561	1,696	0,776	2,032
0,072	6,252	1,047	1,714	1,521	0,168	0,915	0,828	1,163
3,326	1,071	2,445	0,523	0,602	1,448	0,994	3,248	1,845
0,116	0,355	1,364	0,742	0,407	-0,477	0,113	0,235	0,295
0,139	-0,237	0,839	1,039	0,307	1,112	0,402	1,087	1,434
1,392	0,222	1,993	0,192	2,455	0,878	-0,172	0,494	0,433
0,851	0,600	2,230	0,426	0,883	0,973	0,726	0,722	0,776
1,137	0,792	2,291	0,915	0,500	1,822	0,343	0,912	0,498
1,877	0,888	1,055	1,329	1,163	1,601	1,434	0,785	-0,779
-0,086	33,794	1,467	0,978	1,295	1,488	2,049	-0,380	-0,738

Tabla 10. *Niveles de cortisol: Hembras*

Concentración de cortisol en µg/dl								
0,109	3,547	7,231	2,036	2,071	7,670	3,180	2,972	2,165
1,188	5,752	4,169	1,630	4,658	3,003	3,120	2,466	1,559
4,314	1,771	1,981	2,049	2,744	1,425	4,424	2,991	2,873
3,311	3,326	2,867	1,283	6,534	2,169	2,965	0,055	5,705
8,545	0,569	2,604	0,245	1,140	1,591	8,581	1,458	1,726
1,771	3,187	2,311	1,386	3,061	3,383	0,161	7,535	1,332
1,976	3,054	2,045	6,886	2,151	4,476	3,010	2,582	2,036
0,569	2,910	1,674	1,910	4,828	5,264	1,079	2,972	1,504
3,829	1,935	1,898	3,838	5,108	3,812	2,169	3,730	4,680
2,513	5,690	3,502	3,126	1,412	1,641	2,476	2,550	2,767

Datos obtenidos en el análisis estadístico

Tabla 11. *Análisis estadístico en machos*

MACHOS	VALOR
MEDIA	1,378
RANGO	32,508
MEDIANA	0,821
MODA	0,776
VARIANZA	1287,696
DESVIACION	35,884
COEFICIENTE	8,446

Tabla 12. *Análisis estadístico en hembras.*

MACHOS	VALOR
MEDIA	2,994
RANGO	4,063
MEDIANA	2,777
MODA	2,036
VARIANZA	1,449
DESVIACION	1,204
COEFICIENTE	1,149

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

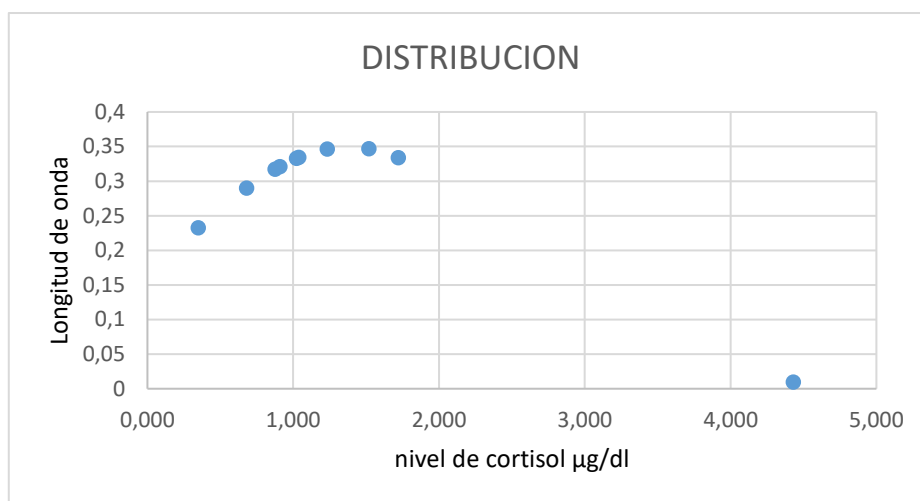
Tabla 13. *Medias obtenida en esta investigación.*

Descripción	Niveles de cortisol en $\mu\text{g}/\text{dl}$
Machos	1.378
Hembras	2.994

La media en machos es de 1.378 $\mu\text{g}/\text{dl}$ y en hembras es de 2.994 $\mu\text{g}/\text{dl}$ llegando a estar por debajo del rango de referencia de 4 a 16 $\mu\text{g}/\text{dl}$ por lo que se podría valorar como un dato de referencia de cortisol en plasma de cerdos en condiciones de altitud, lo cual resulta que los animales se encuentran en un entorno de bienestar libre de estrés.

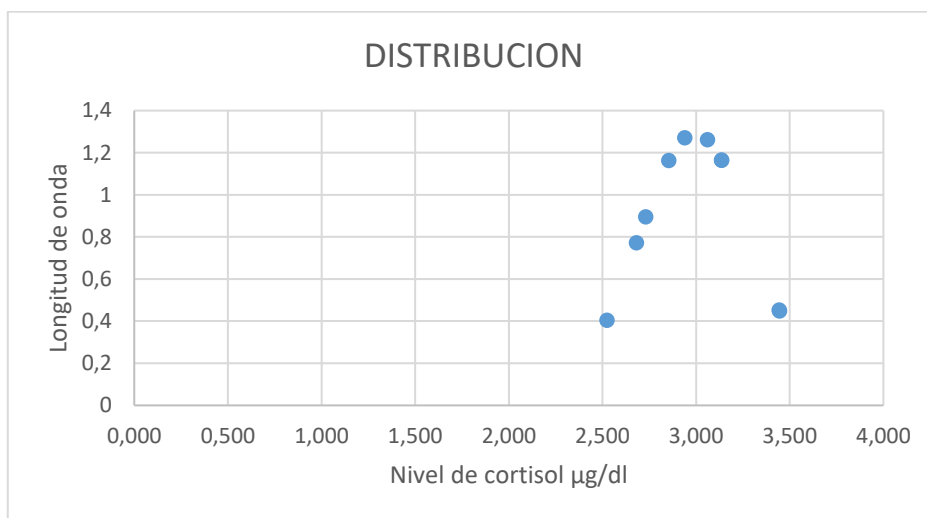
Según Grandin (1997. p. 249-257). Explica que los niveles de cortisol son altamente variables y no se deberían hacer comparaciones absolutas entre distintos estudios.

Figura 8. Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 90 cerdos.



En la figura 8 observamos la representación gráfica de la media de los niveles de cortisol 1.378 $\mu\text{g/dl}$ y la desviación estándar 1.14 referente de datos obtenidos del plasma de cerdos, indica que la densidad está concentrada en torno a la media y se hace muy pequeña conforme nos alejamos del centro por la derecha o la izquierda. Indicando que el eje de las abscisas corresponde a los niveles de cortisol $\mu\text{g/dl}$. Este hecho, se debe a la forma acampanada y simétrica de la gráfica en función de la densidad, reconociendo una zona media, cóncava y con el valor medio de la función en su centro conformado por los elementos más frecuentes y a los extremos los valores menos frecuentes.

Figura 9. Distribución normal: construidas en torno a la media y la desviación estándar referente de datos obtenidos de 90 cerdas.



En la figura 9 observamos la representación gráfica de la media de los niveles de cortisol 2.994 $\mu\text{g/dl}$ y la desviación estándar 0.30 referente de datos obtenidos del plasma de cerdas, indica que la densidad está concentrada en torno a la media y se hace muy pequeña conforme nos alejamos del centro por la derecha o la izquierda. Indicando que el eje de las abscisas corresponde a los niveles de cortisol $\mu\text{g/dl}$. Este hecho, se debe a la forma acampanada y simétrica de la gráfica en función de la densidad, reconociendo una zona media, cóncava y con el valor medio de la función en su centro conformado por los elementos más frecuentes y a los extremos los valores menos frecuentes.

5. Conclusiones y recomendaciones.

5.1. Conclusión.

En esta investigación se determinó la concentración de cortisol con un promedio en machos de 1.378 $\mu\text{g/dL}$ y en hembras de 2.994 $\mu\text{g/dL}$ cuyos datos están por debajo de los parámetros de referencia el cual varía entre 4 a 16 $\mu\text{g/dL}$ siendo un valor referencial lo cual sería un valor coherente y significativo como información científica para consultas en el laboratorio clínico veterinario ubicadas en zonas geográficamente de altitud entre 2596 msnm.

Desde el punto de vista fisiológico, la respuesta obtenida sobre los niveles de cortisol en el plasma sanguíneo tanto en hembras como en machos son valores que se encuentran dentro del rango de los parámetros sanguíneo y nos indica que presentan un menos grado de estrés al momento de la extracción de la muestra de sangre.

La media obtenida en esta investigación resultó estar bajo los valores referenciados que otras investigaciones, siendo no necesario la comparación absoluta de distintos estudios de cortisol en cerdos y cerdas, brindando información de un bienestar y buena calidad de vida de los animales de las granjas que están en condiciones de altitud frente a valores obtenidos en investigaciones en producción porcina el nivel del mar.

5.2. Recomendaciones.

Se recomienda a seguir realizando investigaciones considerando distintas variables como edad, peso, sexo, alimentación, genética, hora del día y durante el manejo (manipulación) para corroborar en alguna alteración en los niveles de cortisol.

La toma de muestra debe ser recolectada en menos tiempo posible de todos los animales de la muestra y así evitamos que las primeras muestras de cortisol se mantengan mucho tiempo congeladas pudiendo alterar los valores de análisis y evitando que nos salgan datos atípicos durante el análisis para obtener los datos pertinentes.

Continuar realizando investigaciones de análisis del cortisol en distintas etapas de crecimiento, distintas épocas del año, tipos de producción distintas, para medir el nivel de cortisol por estrés térmico. Y también hacer más pruebas del cortisol con distintas marcas de kits con reactivos de diferentes fabricantes.

6. Referencias bibliográficas

- Anisman, H., Merali, Z., Hayley, S. (2003). Sensitization associates with stressors and cytokine treatment. *Brain Behaviour Immunology* 17(2), 86-93.
- Averós, X., Herranz, A., Sánchez, R., y Gosálvez, L. F. (2009). Effect of the duration of commercial journeys between rearing farms and growing-finishing farms on the physiological stress response of weaned piglets. *Livest. Sci.* 122(2-3),339–344.
- Becker, J., Breedlove, S., Crews, D., McCarthy, M. (2002). *Behavioral Endocrinology. Second edition. En: Endocrinology of the Stress-Response.* Sapolsky R. The MIT Press. Cambridge, Massachusetts. London, England. pp.409-450.
- Bhatnagar S, Vining C. (2003). Facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to novel stress following repeated social stress using the resident/intruder paradigm. *Homr and behav.* 43(1), 158-165.
- Blumetto Velazco, O. R., Calvet Sanz, S., Estellés Barber, F., y Villagrà García, A. (2013). Comparison of extensive and intensive pig production systems in Uruguay in terms of ethologic, physiologic and meat quality parameters. *Rev. Bras. Zootec.* 42(7),521–529.
- Broom, D. M. (2017). Cortisol: often not the best indicator of stress and poor welfare. *Physiol. News.* 107,30–32.
- Brousset Hernandez-Jauregui, D. M., Galindo Maldonado, F., Valdez Pérez, R. A., Romano Pardo, M., y Schuneman de Aluja, A. (2005). Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. *Vet. Mex.* 36(3),325–337.
- Carreras, R., Mainau, E., Arroyo, L., Moles, X., González, J., Bassols, A., Dalmau, A., Faucitano, L., Manteca, X., y Velarde, A. (2016). Housing conditions do not alter

cognitive bias but affect serum cortisol, qualitative behaviour assessment and wounds on the carcass in pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 185:39–44.

Casal, N., Manteca, X., Peña, L., Bassols, A., y Fàbrega, E. (2017). Nivel de cortisol en muestras de pelo para evaluar el estrés en cerdos. Barcelona, España. *PorciNews, la revista global del porcino*.

Citizendium. *Online encyclopedia* (<http://en.Citizendium.org/>)

Cook, N. J., Schaefer, A. L., Lepage, P., Janes, S. M. (1996). Salivary vs serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. *Can J Anim Sci.* 76(3), 329-335.

Coutellier, L., Arnould, C., Boissy, A., Orgeur, P., Prunier, A., Veissier, I., y MeunierSalaün, M. C. (2007). Pig's responses to repeated social regrouping and relocation during the growing-finishing period. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 105(1-3),102–114.

Dalla Acosta, A. O., Ludke, J. V., Coldebella, A., Kich, J. D., Rodrigues Paranhos da Costa, J. M., Faucitano, L., Peloso, J. V., y Dalla Roza, D. (2009). Efeito do manejo pré-abate sobre alguns parâmetros fisiológicos em fêmeas suínas pesadas. *Ciência Rural.* 39(3),852–858.

Dalla Costa, O. A., Ludke, J. V., Rodrigues Paranhos da Costa, J. M., Faucitano, L., Coldebella, A., Deon Kich, J., Peloso, J. V., y Dalla Roza, D. (2008). Tempo de jejum na granja sobre o perfil hormonal e os parâmetros fisiológicos em suínos de abate pesados. *Ciência Rural.* 38(8),2300–2306.

Fundación Hogares Juveniles Campesinos 48986. (2002). *Manual agropecuario: tecnologías orgánicas de la granja integral autosuficiente*. Bogotá: Fundación Hogares Juveniles Campesinos.

- Ganong, Fran. (2010). *Fisiología médica*. Recuperado de: <https://ricardocurco.files.wordpress.com/2013/12/ganong.pdf>.
- Ganong W., Barret K., Boitano S., Barman S., Brooks H. (2010). *Fisiología Médica*. México, D. F. Ed.McGraw-Hill. Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- Gimsa, U., Tuchscherer, M., Kanitz, E. (2018). Psychosocial Stress and Immunity: What can we learn from Pig? *Frontier Behaviour Neuroscience* 3; 12: 64.
- Grandin, T. (1997). *Evaluación del estrés durante el manejo y transporte*. *J Anim Sci*, 75, 249-257.
- Gregory, N. G. (1998). *Animal Welfare and the Meat Market*. *Anim. Welf. Meat Sci*.
- Guyton. (2001). *Tratado de Fisiología médica, 10ª Ed. En: Hormonas de la corteza suprarrenal*. Editorial Mcgraw-hill/ Interamericana. Madrid, España. pp 1045-1061.
- Guyton A., Hall J. (2016). *Tratado de Fisiologia Medica*. 13ª Ed. Elsevier.
- Guzmán, M. (2019) “*Evaluación de la inclusión de desechos alimenticios a la dieta de cerdos criollos (Sus scrofa domesticus) en la etapa de inicio y su efecto en los parámetros productivos y economicos*”(tesis de grado), Universidad de el Salvador, Ciudad Universitaria - El Salvador,
- Heo, J., Kattesh, H., Roberts, M., Schneider, J. (2003). Plasma levels of cortisol and corticosteroid-binding globulin (CBG) and hepatic CBG mRNA expression in pre- and postnatal pigs. *Domestic Animal Endocrinology* 25(3), 263- 273.
- Heo, J., Kattesh, H. G., Roberts, M. P., Morrow, J. L., Dailey, J. W., y Saxton, A. M. (2005). Hepatic corticosteroid-binding globulin (CBG) messenger RNA expression and plasma CBG concentrations in young pigs in response to heat and social stress. *J. Anim. Sci.* 83(1):208–215

- Jensen, P., y Toates, F. M. 1997. Stress as a state of motivational systems. *Applied Animal Behaviour Science* 53(1-2),145–156.
- Kanitz, E., Otten, W., y Tuchscherer, M. (2005). Central and peripheral effects of repeated noise stress on hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in pigs. *Livest. Prod. Sci.* 94(3):213–224.
- Keay, M., Singh, J., Gaunt, M., Kaur, T. (2006). Fecal glucocorticoids and their metabolites as indicators of stress in various mammalian species: a literature review. *J Zoo Wildl Med.*37(3): 234–244.
- Kim, M. H., Yang, J. Y., Upadhaya, S. D., Lee, H. J., Yun, C. H., y Ha, J. K. (2011). The stress of weaning influences serum levels of acute-phase proteins, iron-binding proteins, inflammatory cytokines, cortisol, and leukocyte subsets in Holstein calves. *J. Vet. Sci.* 12(2):151–157.
- Kirschbaum, C., & Hellhammer, D. H. (1989). Salivary cortisol in psychobiological research: an overview. *Neuropsychobiology.* 22(3): 150-69
- Larry, E. (2012). *Metabolic and Endocrine Physiology.* Wyoming, EEUU: by Teton NewMedia.
- Marco Ramell, A., Pato, R., Peña, R., Saco, Y., Manteca, X., Ruiz de la Torre, J. L., y Bassols, A. (2011). Identification of serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities. *Veterinary Journal,* 190(2):66–71.
- Marquez, C., Nadal, R., Armario, A. (2004). The Hypothalamic-PituitaryAdrenal and glucose response to daily repeated immobilisation stress in rats: individual differences. *Neuroscience* 123(3), 301-612.

- Martin, C. R. 1985. " *Endocrine Physiology*". Estados Unidos, Michigan: Oxford University Press.
- Merlot, E., Meunier-Salaün, M. C., y Prunier, A. (2004). Behavioural, endocrine and immune consequences of mixing in weaned piglets. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 85(3-4):247–257.
- Merlot, E., Mounier, M., Dourmad, Y., Prunier, A., y Ouest, A. (2010). Influence de la race et du mode de logement sur la sécrétion de cortisol, l'immunité et la santé des porcs à l'engrais. *Journées Rech. Porc.* 21(1-2)21–26.
- Moberg, G. (2000). Biological response to stress: implication for animal welfare. En Moberg G, Ed Mench, JA. *The biology of animal stress*. CABI Publishing, New York, USA. pp1-21.
- Moberg, G. P., y Mench, J. A. (2000). *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. USA, California: CABI Publishing.
- Monteiro, A. P. A., Tao, S., Thompson, I. M. T., y Dahl, G. E. (2016). In utero heat stress decreases calf survival and performance through the first lactation. *J. Dairy Sci.* 99(10):8443–8450
- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., Reenen, C., Richard, S., y Veissier, I. 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & behavior.* 92(3):317-39.
- Möstl, E., & Palme, R. (2002). *Hormones as indicators of stress*. *Domest Anim Endocr*, 23(1-2), 67–74.
- Murata, H. (2007). Stress and acute phase protein response: An inconspicuous but essential linkage. *Veterinary Journal*, 173(3), 473–474.

- Nelson, R. (2005). *An Introduction to behavioral endocrinology, third edition*. Sinauer Associates, Inc. 23 Plumtree Road Sunderland, MA 01375. USA.
- 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>
- Romero, L. (2002). Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and comparative endocrinology*, 128(1), 1–24.
- Romero, M. (2004). Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *TRENDS in Ecology and Evolution*. 19(5): 249-255.
- Santana, A., Murata, L., Mcmanus, C., y Bernal, F. (2009). Dosagem de cortisol sanguíneo em suínos submetidos ao manejo pré-abate e insensibilização elétrica. *SciELO*, 58 (221): 149-152.
- Sapolsky, R., Romero, M., y Munck, A. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine reviews*. 21(1), 55-89.
- Scollo, A., Gottardo, F., Contiero, B., y Edwards, S. A. (2014). Does stocking density modify affective state in pigs as assessed by cognitive bias, behavioural and physiological parameters?. *Applied Animal Behaviour Science*. 153:26–35.
- Squires EJ. 2003. *Applied animal endocrinology*. Oxon, UK, CAB International.
- Tuchscherer, M., Kanitz, E., Puppe, B., Tuchscherer, A., & Stabenow, B. (2004). Effects of postnatal social isolation on hormonal and immune responses of pigs to an acute endotoxin challenge. *Physiology and Behaviour* 82(2-3), 503-511.

Wingfield, J., & Kitaysky, A. 2002. Endocrine responses to unpredictable environmental events: stress or anti-stress hormones?. *Integrative and comparative biology*, 42(3), 600-609.

Zimmerman, M., Grigioni, G., Taddeo, H., y Domingo, E. (2011). Physiological stress responses and meat quality traits of kids subjected to different pre-slaughter stressors. *Small Rumin. Res.* 100(2-3),137–142.

7. Anexos

Tabla de cortisol: *Cerdos Machos*

Concentración de cortisol en $\mu\text{g/dl}$								
-0,221	3,087	2,192	0,659	0,319	0,561	1,696	0,776	2,032
0,072	6,252	1,047	1,714	1,521	0,168	0,915	0,828	1,163
3,326	1,071	2,445	0,523	0,602	1,448	0,994	3,248	1,845
0,116	0,355	1,364	0,742	0,407	-0,477	0,113	0,235	0,295
0,139	-0,237	0,839	1,039	0,307	1,112	0,402	1,087	1,434
1,392	0,222	1,993	0,192	2,455	0,878	-0,172	0,494	0,433
0,851	0,600	2,230	0,426	0,883	0,973	0,726	0,722	0,776
1,137	0,792	2,291	0,915	0,500	1,822	0,343	0,912	0,498
1,877	0,888	1,055	1,329	1,163	1,601	1,434	0,785	-0,779
-0,086	33,794	1,467	0,978	1,295	1,488	2,049	-0,380	-0,738

Tabla de cortisol: *Cerdas Hembras*

Concentración de cortisol en $\mu\text{g/dl}$								
0,109	3,547	7,231	2,036	2,071	7,670	3,180	2,972	2,165
1,188	5,752	4,169	1,630	4,658	3,003	3,120	2,466	1,559
4,314	1,771	1,981	2,049	2,744	1,425	4,424	2,991	2,873
3,311	3,326	2,867	1,283	6,534	2,169	2,965	0,055	5,705
8,545	0,569	2,604	0,245	1,140	1,591	8,581	1,458	1,726
1,771	3,187	2,311	1,386	3,061	3,383	0,161	7,535	1,332
1,976	3,054	2,045	6,886	2,151	4,476	3,010	2,582	2,036
0,569	2,910	1,674	1,910	4,828	5,264	1,079	2,972	1,504
3,829	1,935	1,898	3,838	5,108	3,812	2,169	3,730	4,680
2,513	5,690	3,502	3,126	1,412	1,641	2,476	2,550	2,767

Foto 1. Muestra de plasma



Foto 2. Kit de Elisa reposando 20 minutos para tener los reactivos a temperatura ambiente



Foto 3. Pipeteo de cada muestra



Foto 4. Luego de añadir el tampón de lavado 3 veces

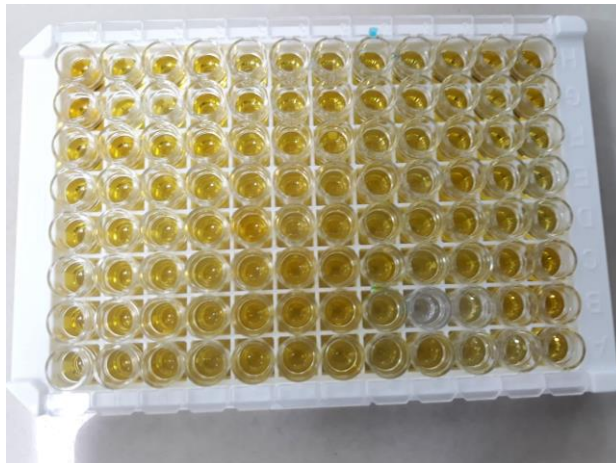


Foto 5. Lector de microplacas se lee la absorbancia a 450nm

