



Concentración de cortisol sérico matinal de mulares usados para trabajo agropecuario en el trópico



Lady C. Calixto Vega ^{ab*}

Andrés F. Castro Mesa ^a

José R. Martínez Aranzales ^a

^a Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Medicina Veterinaria. Línea de Investigación en Medicina y Cirugía Equina (LIMCE), Grupo de Investigación Centauro. Medellín 050010, Colombia.

^b Universidad de la Salle. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Bogotá, Colombia.

*Autor de correspondencia: lcalixto@unisalle.edu.co

Resumen:

El objetivo del estudio fue relacionar el cortisol sérico de mulares manejados en condiciones del trópico, con la actividad que realizaban y con el grupo de edad y sexo. La fracción sérica de muestras sanguíneas se obtuvo de 97 mulares dedicados al trabajo agropecuario (carga, vaquería y silla) y fueron analizadas a través de ELISA comercial tipo sándwich específico para cortisol. La concentración sérica de cortisol fue de 96.3 ng/ml, sin diferencias significativas por sexo, grupo etario y actividad, indicando estabilidad en el resultado y podría ser utilizado como valor de referencia. Esta concentración es menor a la reportada por estudios previos en equinos de exhibición y recreación, de la misma región (133.0 ng/ml). Por tanto, se concluye que se deben usar parámetros propios de la especie, sugiriendo confirmar las diferencias en las capacidades de adaptación y resistencia a los factores de estrés entre estas especies.

Palabras clave: Bienestar, Enfermedad, Equino, Estrés, Híbrido.

Recibido: 30/04/2024

Aceptado: 30/09/2024

Introducción

Los mulares son el producto de la hibridación entre caballos y asnos, caracterizados por la rusticidad y desempeño en las labores agropecuarias (arrastre, tracción y carga) en varios continentes. También son utilizados para silla, vaquería, exposición, transporte, turismo, equinoterapia y recientemente en patrullaje policial en Colombia^(1,2). A pesar de que los mulares son multifacéticos, se desconocen muchos aspectos sobre la epidemiología de enfermedades y de salud en general en comparación con otras especies de équidos^(2,3).

El cortisol es una hormona secretada por la corteza de las glándulas adrenales, siendo un glucocorticoide con funciones relevantes en la homeostasis orgánica como: gluconeogénesis, proteólisis, lipólisis, hiperglicemia, modulación de la inmunidad e inflamación, entre otras^(4,5). Adicionalmente, participa en procesos patológicos y es considerado de valor pronóstico para diferentes alteraciones gastrointestinales, respiratorias y en casos de sepsis en equinos⁽⁶⁻⁹⁾. Igualmente, se considera la hormona de la adaptación a diferentes actividades generadoras de estrés⁽¹⁰⁻¹³⁾, e indicador de acondicionamiento físico y desempeño atlético en caballos de deporte⁽¹⁴⁾.

La secreción de cortisol ocurre en respuesta a la hormona adrenocorticotrófica (ACTH), al ser activado el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (EHPA) por una variedad de factores fisiológicos (glucemia, presión sanguínea), patológicos, estrés, medio ambientales, climatológicos y estacionales^(15,16). La ACTH se libera en respuesta a la hormona liberadora de corticotropina (HPC) del hipotálamo que actúa sobre receptores tipo 1 localizados en los corticotropos de la pituitaria anterior, que a su vez se activa a través del EHPA y, al mismo tiempo se controla por una retroalimentación negativa⁽¹⁵⁾.

La alta variabilidad en concentraciones de cortisol en los caballos y asnos ha conllevado a determinar valores de referencias según estado fisiológico, grupo etario, tipo de actividad, manejo y condiciones medioambientales en diferentes razas; variabilidad que se ha considerado de tipo multifactorial⁽¹⁷⁻²¹⁾. A pesar de los extensos estudios en equinos y en menor proporción en los asnos sobre el cortisol, hay escasa información en mulares. Por tanto, este estudio tuvo como objetivo, relacionar la concentración del cortisol sérico de una población de mulares con el tipo de actividad agropecuaria que realizaban, grupo de edad y sexo, ubicados en el trópico.

Material y métodos

El estudio obtuvo aprobación del Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Antioquia (Protocolo N.º 1222019). Se realizó con mulares de los municipios aledaños al área metropolitana de la ciudad de Medellín, departamento de Antioquia, Colombia. El departamento tiene una altitud promedio de 2,055 msnm, con rangos promedio anuales de lluvia de 1,500 a 5,000 mm, y dos temporadas secas y dos

lluviosas. La humedad relativa del aire oscila entre 63 a 73 % durante el año, con temperatura entre 18 y 28° C, zona intertropical con climas tropicales A (clima ecuatorial, monzónico y sabana), según el sistema Köppen-Geiger (IDEAM Cartografía Básica IGAC, 2018).

Animales

Se seleccionaron 97 mulares clínicamente sanos (65 machos y 32 hembras), de 8.7 ± 4.4 años, 290.5 ± 37.6 kg de peso, y condición corporal de $5 \pm 0.8^{(22)}$. Los animales eran manejados con pastoreo, suplementados con subproductos de la caña de azúcar y destinados a labores agropecuarias de carga, vaquería o silla. Los mulares se dividieron en tres grupos etarios: jóvenes (<5 años), adultos (6-14 años) y geriátrico (>15 años); sin categorizar la carga de trabajo. Se les realizó un examen físico, incluyendo frecuencia cardíaca (FC), frecuencia respiratoria (FR), temperatura (°C), y se colectó sangre para medir concentraciones séricas de cortisol.

Toma de muestras

Las tomas de las muestras se hicieron con mínima manipulación de los mulares, antes de las actividades de rutina (carga, vaquería y silla), previa limpieza y preparación antiséptica del lugar. Se realizó en las mañanas (0700-1100 h) mediante punción de la vena yugular en tubo de vacío sin anticoagulante. Las muestras se centrifugaron a 201 xg durante 10 min para obtener la fracción sérica y posteriormente alícuotas se pusieron en tubos Eppendorf y congeladas a -20° C hasta su análisis.

Concentración del cortisol

El proceso de determinación de cortisol sérico en los mulares fue reportado previamente⁽²³⁾. En síntesis, se utilizó el kit comercial ELISA tipo sándwich (AccuBind®, Monobind Inc., USA), utilizando un lector convencional de longitud de onda de 450-630 nm (Stat Fax 303® Plus Microstrip Reader, Awareness Technology Inc., USA). La validación del kit se hizo utilizando seis calibradores y tres controles: Multiligan A: 07,7 ng/ml, Multiligan B: 97,4 ng/ml y Multiligan C: 193.2 ng/ml (QSure® Multi-Ligand Control Tri-Level, Monobind Inc., USA). Las concentraciones de cortisol sérico se expresaron en ng/ml. El kit, de acuerdo con el fabricante, tiene una sensibilidad de 3.77 ng/ml, y detecta concentraciones entre 4.0 a 950 ng/ml.

Análisis estadístico

El número de individuos a evaluar se determinó usando la fórmula convencional para hallar el tamaño muestral en una población infinita, obteniéndose una muestra de 97 mulares. Inicialmente se realizó un estudio descriptivo transversal, tomando una única muestra de los individuos. Los datos se registraron usando el programa Microsoft Excel®

y por medio del test Kolmogorov-Smirnov usando el software estadístico SAS® v. 9.2 (USA) se determinó que no tenía una distribución normal. En el análisis de correlación entre grupos etarios y actividad, se implementó la prueba de Kruskal-Wallis y, para el sexo se usó el test de Mann-Whitney para identificar el nivel de significancia ($P < 0.05$).

Resultados

La mediana de concentración de cortisol sérico fue de 96.3 ng/ml, con valores mínimos de 6.8, máximos de 248.2; y su respectiva distribución percentil al 25% (78.6 ng/ml), al 75 % de 134.4. La distribución según sexo, grupo etario y actividad se muestra en el Cuadro 1. En términos generales, la concentración de cortisol sérico fue de 96.3 ng/ml (varianza: 165.3 ng/ml) sin diferencias significativas entre sexo, grupo etario y actividad ($P > 0.05$). Adicionalmente, el 75 % de la población tuvo un valor de cortisol menor o igual a 134.4 ng/ml, con un rango de distribución entre 6.8 y 248.2 ng/ml.

Cuadro 1: Concentración de cortisol sérico (mediana), según el género y grupo etario y constantes fisiológicas de la población de mulares analizada (97 individuos)

	N	Cortisol (ng/ml)			FC (lpm)	FR (rpm)	Temp (°C)
		Media	DE	Valor-P			
Grupo etario ¹							
Joven	17	93.1	36.5		40.0	20.0	37.6
Adulto	67	80.0	41.7	0.368	38.0	24.0	37.6
Geriátrico	13	98.3	40.5		36.0	20.0	37.8
Sexo ²							
Hembras	32	98.4	33.9	1.0	37.5	20.5	37.7
Machos	65	93.1	43.7		38.0	22.0	37.6
Actividad ¹							
Carga	63	108.2	45.6		39.0	21.0	37.4
Vaquería	28	82.0	24.4	0.564	38.0	27.0	37.5
Silla	6	105.9	29.2		41.0	22.0	37.7

DE= desviación estándar; FC= frecuencia cardiaca; FR= frecuencia respiratoria.

¹Test de Kruskal-Wallis, ² Test de Mann-Whitney,

Discusión

Los mulares por sus características evolutivas, resistencia y eficiencia, son empleados en diferentes actividades, siendo en muchos casos, explotados de manera negativa^(1,2). Por otro lado, se dispone de escasos estudios sobre las enfermedades generadas por el abuso, negligencia y aspectos relacionados con el bienestar animal⁽²⁴⁾. En el presente estudio, la población de estos ejemplares fue representativa de la región.

Las concentraciones de cortisol en equinos han sido ampliamente estudiadas en diferentes tipos de muestras (plasma, saliva, lágrimas, fecal y pelo) bajo un sinnúmero de técnicas de laboratorio, estado fisiológico, salud, edad, sexo, razas, estrategias de manejo, fin zootécnico, y en respuesta a estrés⁽²⁵⁻²⁹⁾, permitiendo realizar comparaciones y, determinar diferencias según las condiciones medioambientales y región geográfica^(18,19). En asnales, aunque ha sido estudiado en menor proporción, los valores de referencias indican similitud con la concentración basal de los equinos^(30,31,32); sin embargo, no se ha encontrado evidencia del efecto de las estaciones climáticas sobre los niveles de cortisol, como en el caso de los equinos⁽³³⁾, aunque es probable que exista de acuerdo con la estacionalidad de la ACTH. No obstante, estos estudios son inexistentes en mulares, por tanto, se debe de comparar con estudios previos de las demás especies de équidos.

La concentración de 96.3 ng/ml cortisol sérico determinado en el presente estudio fue superior a la mayoría de los reportes en caballos y asnos que oscilan entre 29.0 y 66.0 ng/ml en países no tropicales⁽³⁰⁻³³⁾; pero fue menor al reportado, con el mismo kit comercial, en Caballos Criollos Colombianos (CCC) manejados en condiciones climatológicas y de relieve similares (133.0 ± 74.0 ng/ml), pero con manejo diferentes, pues los caballos permanecían en estabulación y con rutina de ejercicios establecida⁽¹³⁾. Lo anterior podría explicar diferencias evolutivas inter-especie, nivel de adaptación, rusticidad y grado de respuesta fisiológica a factores de estrés y adversidad.

El rango de concentraciones de cortisol sérico en los mulares mostró valores extremos (mínimo: 6.8 ng/ml y máximo: 248.2 ng/ml), siendo menores a los reportados en los CCC de 42.0 y 481.0 ng/ml respectivamente⁽¹³⁾. En ambos estudios, los animales se encontraban clínicamente normales (constantes fisiológicas dentro los parámetros para la especie), de allí que el elevado cortisol estaría más asociado a factores inherentes a cada individuo (temperamento) y a efecto del trópico⁽²⁶⁾. Adicionalmente, es pertinente mencionar, que a pesar de que los mulares de este estudio, eran sometidos a largas y exigentes jornadas de trabajo, con ayunos prolongados, los valores del cortisol fueron menores; sin embargo, no se podría inferir la ausencia de estrés o nivel de adaptación con un solo valor de cortisol, sin un grupo control y sin caracterizar la carga de trabajo, requiriéndose la determinación del índice del cortisol⁽¹⁷⁾, con la medición del cortisol matinal y vespertino.

La no diferencia estadística en concentraciones séricas de cortisol entre machos y hembras, grupos etarios y tipo de actividad, fue igualmente similar a lo reportado en el CCC⁽¹³⁾. Sin embargo, la tendencia fue más homogénea en las variables de estos mulares que en los CCC. Esto podría indicar cierta estabilidad de la concentración de cortisol y podría ser considerada como valor de referencia para la especie, pero tomando en consideración respuestas individuales y a externos, reflejado en el rango del valor mínimo y máximo^(17,34). Sin embargo, para poder realizar una comparación del comportamiento de este analito entre ambas especies, se deben desarrollar estudios que involucren simultáneamente caballos y mulares de la misma región y en similares condiciones medioambientales.

Finalmente, se ha descrito diferencias en las técnicas para la determinación de la concentración del cortisol, especialmente entre la quimioluminiscencia y ELISA, reportando diferencias hasta de 15.7 ng/ml entre ambas, siendo más exacto la primera⁽⁷⁾. Sin embargo, los valores obtenidos a través del radioinmunoensayo han sido similares a los obtenidos por ELISA⁽⁸⁾. Además, el tipo de muestra puede influir, donde varios trabajos han utilizado diferentes sustratos para su determinación, algunos sin diferencias significativas⁽¹⁴⁾. Por otro lado, el tipo de muestra puede afectar el resultado de su concentración. No obstante, en este estudio se decidió trabajar con suero, dada la ausencia de valores previos en este sustrato. Asimismo, se tuvo en cuenta los cuidados suficientes (mínima manipulación) para no alterar los resultados y se utilizaron controles comerciales para la validación de la técnica.

Conclusiones e implicaciones

La concentración del cortisol sérico de mulares (96.3 ng/ml) usados en extensas actividades agropecuarias en condiciones del trópico fue menor a la reportada en equinos de la misma región geográfica y sometidos a condiciones menos estresantes. Por tanto, se debe de confirmar diferencias de adaptación y resistencia a factores de estrés entre estas especies.

Agradecimientos y conflictos de interés

Este trabajo fue financiado con recursos del CODI de la Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Antioquia, Centro de investigación de la Facultad de Ciencias Agrarias (CIAG) y Recursos de sostenibilidad del Grupo Centauro.

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Literatura citada:

1. Toribio R. Dear donkey and mule: You deserve more appreciation and better medicine. *Vet Clin N Am Equine Pract* 2019;35(3):13-14.
2. Calixto-Vega, LC, Martínez-Aranzaes, JR. Gastroscopic characterization and prevalence of gastric ulcer syndrome in working mules in Colombia. *Equine V J* 2024;56(3):449–455. <https://doi.org/10.1111/evj.13985>.
3. Mclean AK, Navas FJ, Canisso IF. Donkey and mule behavior. *Vet Clin N Am Equine Pract* 2019;35(3):575-588.
4. O'connor TM, O'halloran DJ, Shanahan F. The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *QJM: Ann Int J Med* 2000;93(6):323-333.

5. Smith LK, Cidlowski JA. Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. *Pro Brain Res* 2010;182:1-30.
6. Hart KA, Slovis NM, Barton MH. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction in hospitalized neonatal foals. *J Vet Intern Med* 2009;23(4):901-912.
7. Armengou L, Jose-Cunilleras E, Ríos J, Cesarini C, Viu J, Monreal L. Metabolic and endocrine profiles in sick neonatal foals are related to survival. *J Vet Intern Med* 2013;27(3):567-575.
8. Mair TS, Sherlock CE, Boden LA. Serum cortisol concentrations in horses with colic. *Vet J* 2014;201(3):370-377.
9. Shaba JJ, Behan-Braman A, Robinson NE. Plasma cortisol concentration increases within 6 hours of stabling in RAO-affected horses. *Equine Vet J* 2014;46(5):642-644.
10. McGreevy P, Nicol C. Physiological and behavioral consequences associated with short-term prevention of crib-biting in horses. *Phys Behav* 1998;65(1):15-23.
11. Broom DM. Behaviour and welfare in relation to pathology. *Appl Anim Behav Sci* 2006;97(1):73-83.
12. Freymond SB, Bardou D, Briefer EF, Bruckmaier R, Fouché N, Fleury J, Bachmann I. The physiological consequences of crib-biting in horses in response to an ACTH challenge test. *Phys Behav* 2015;151:121-128.
13. Zuluaga AM, Martínez JR. Serum cortisol concentration in the Colombian creole horse. *Rev Colomb Cien Pecu* 2017;30(3):231-238.
14. Kędzierski W, Cywińska A, Strzelec K, Kowalik S. Changes in salivary and plasma cortisol levels in purebred Arabian horses during race training session. *Animal Sci J* 2014;85(3):313-317.
15. Hart KA, Barton MH. Adrenocortical insufficiency in horses and foals. *Vet Clin Am Equine Pract* 2011;27(1):19-34.
16. Greff MJ, Levine JM, Abuzgaia AM, Elzagallaai AA, Rieder MJ, van Uum SHM. Hair cortisol analysis: An update on methodological considerations and clinical applications. *Clin Biochemistry* 2019;63:1-9.
17. Douglas R. Circadian cortisol rhythmicity and equine Cushing's-like disease. *J Equine Vet Sci* 1999;19(11):684-753.
18. Schreiber CM, Stewart AJ, Kwessi E, Behrend EN, Wright JC, Kemppainen RJ, Busch KA. Seasonal variation in results of diagnostic tests for pituitary pars intermedia dysfunction in older, clinically normal geldings. *J Am Vet Med Ass* 2012;241(2):241-248.

19. Borer-Weir KE, Menzies-Gow NJ, Bailey SR, Harris PA, Elliott J. Seasonal and annual influence on insulin and cortisol results from overnight dexamethasone suppression tests in normal ponies and ponies predisposed to laminitis. *Equine Vet J* 2013;45(6):688-693.
20. Nagel C, Erber R, Bergmaier C, Wulf M, Aurich J, Möstl E, Aurich C. Cortisol and progesterin release, heart rate and heart rate variability in the pregnant and postpartum mare, fetus and newborn foal. *Theriogenology* 2012;78(4):759-767.
21. Smiet E, Van Dierendonck M, Sleutjens J, Menheere P, Van Breda E, Boer D, Back W, Wijnberg I, Van der Kolk J. Effect of different head and neck positions on behavior, heart rate variability and cortisol levels in lunged Royal Dutch Sport horses. *Vet J* 2014;202(1):26-32.
22. Henneke DR, Potter GD, Kreider JL, Yeates BF. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Vet J* 1983;15(4):371-372.
23. Calixto LC, Martínez JR. Serum cortisol in mules intended for agricultural work. *J Equine Sci* 2021;32(4):153-155.
24. Davis E. Donkey and Mule Welfare. *Vet Clin N A Equine Pract* 2019;35(3):481-491.
25. Comin A, Veronesi MC, Montillo M, Faustini M, Valentini S, Cairoli F, Prandi A. Hair cortisol level as a retrospective marker of hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity in horse foals. *Vet J* 2012;194(1):131-132.
26. Bohák Z, Szabó F, Beckers JF, De Sousa NM, Kutasi O, Nagy K, Szenci O. Monitoring the circadian rhythm of serum and salivary cortisol concentrations in the horse. *Domest Anim Endocrinol* 2013;45(1):38-42.
27. Monk CS, Hart KA, Berghaus RD, Norton NA, Moore PA, Myrna KE. Detection of endogenous cortisol in equine tears and blood at rest and after simulated stress. *Vet Ophthalmol* 2014;17:53-60.
28. Nuñez CM, Adelman JS, Smith J, Gesquiere LR, Rubenstein, DI. Linking social environment and stress physiology in feral mares (*Equus caballus*): Group transfers elevate fecal cortisol levels. *Gen Comp Endocrinol* 2014;196:26-33.
29. Bonelli F, Rota A, Aurich C, Ille N, Camillo F, Panzani D, Sgorbini M. Determination of salivary cortisol in donkey stallions. *J Equine Vet Sci* 2019;77:68-71.
30. Dugat SL, Taylor TS, Matthews NS, Gold JR. Values for triglycerides, insulin, cortisol, and ACTH in a herd of normal donkeys. *J Equine Vet Sci* 2010;30(3):141-144.

31. Mejia-Pereira S, Perez-Ecija A, Buchanan BR, Toribio RE, Mendoza FJ. Evaluation of dynamic testing for pituitary pars intermedia dysfunction diagnosis in donkeys. *Equine Vet J* 2019;51(4):481-488.
32. Mendoza FJ, Toribio RE, Perez-Ecija A. Metabolic and endocrine disorders in donkeys. *Vet Clin N A Equine Pract* 2019;35(3):399-417.
33. Haffner JC, Fecteau KA, Eiler H, Tserendorj T, Hoffman RM, Oliver JW. Blood steroid concentrations in domestic Mongolian horses. *J Vet Diag Investigation* 2010;22(4):537-543.
34. Alexander SL, Irvine CH, Livesey JH, Donald RA. Effect of isolation stress on concentrations of arginine vasopressin, α -melanocyte-stimulating hormone and ACTH in the pituitary venous effluent of the normal horse. *J Endocrinol* 1988;116(3):325-334.