

Universidad Nacional de Costa Rica

Facultad Ciencias de la Salud

Escuela de Medicina Veterinaria

Implementación de un método alternativo no invasivo para el diagnóstico de hiperadrenocorticismo canino mediante la cuantificación de cortisol en pelo

Modalidad: Proyecto de graduación

Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria

HILARY LÓPEZ FONSECA

**Tutor: Gustavo Chacón, Lic.
Lectoras: Laura Castro Ramírez, PhD
Marcela Suárez Esquivel, MSc.**

Campus Pbro. Benjamín Núñez, Heredia

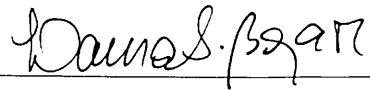
2019

TRIBUNAL EXAMINADOR

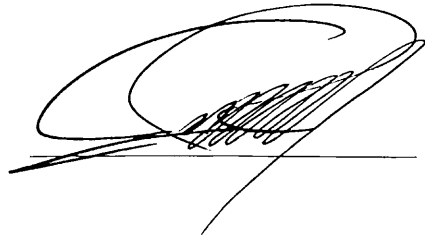
Rafael Vindas Bolaños, Lic.
Decano Facultad de Ciencias de la Salud




Laura S. Bouza Mora, MSc.
Subdirectora Escuela de Medicina Veterinaria



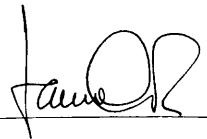
Gustavo Chacón, Lic.
Tutor



Marcela Suárez, MSc.
Lectora



Laura Castro, PhD.
Lectora



Fecha:

06-marzo-2019

DEDICATORIA

Dedicado a mi mamá y mi hermana, que son mi mayor apoyo, siempre presentes; gracias a ellas me he convertido en la persona que soy.

A la Universidad Nacional, institución de la cual estoy muy orgullosa, y a todos los doctores y profesores que estuvieron involucrados en mi formación a lo largo de la carrera; cada uno ha sido fuente de admiración/inspiración.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Gustavo Chacón, me aceptó con toda confianza y fue quien, en primera instancia, me incentivó a desarrollar este proyecto. Me ha apoyado de mil maneras y ha procurado enseñarme muchas cosas, sin reservas; literalmente ha sido un maestro.

A mis lectoras, la Dra. Marcela Suárez y la Dra. Laura Castro, las admiré como profesoras, pero como lectoras han sido un punto de apoyo excepcional, todos sus aportes y conocimiento fueron sumamente valiosos. Además, me abrieron las puertas del laboratorio y pusieron todo a mi disposición, colaborándome en todo el proceso. Marcela, de veras estoy sumamente agradecida, ha sido incondicional y me ha tenido mucha paciencia.

A Shirley, realmente la considero más que una compañera, una amiga. Aun cuando la distancia de años es pequeña, unos cuantos años hacen un libro de experiencia y eso la convierte en una excelente consejera, gracias.

A mi familia, la familia de verdad, mi mamá y mi hermana, porque ambas son mujeres ejemplares y constituyen un pilar importantísimo en mi vida; les agradezco ser mi modelo a seguir y obviamente acompañarme en esta larga pero provechosa etapa de mi vida.

A Miguel Ángel porque siempre ha estado para mí: en las buenas, en las malas y en las peores; es mi motor de vida y mi fuente de motivación por excelencia.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| TRIBUNAL EXAMINADOR | ii |
| DEDICATORIA | iii |
| AGRADECIMIENTOS | iv |
| ÍNDICE | v |
| ÍNDICE DE TABLAS | vii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS | ix |
| RESUMEN..... | x |
| ABSTRACT | xii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Antecedentes | 1 |
| 1.2. Justificación..... | 5 |
| 1.3. Objetivos | 8 |
| 1.3.1 Objetivo General | 8 |
| 1.3.2 Objetivos Específicos | 8 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 9 |
| 2.1. Lugar de trabajo | 9 |
| 2.2. Selección de los individuos | 9 |
| 2.2.1 Enfermos (Animales con hiperadrenocorticismos)..... | 9 |
| 2.2.2 Controles (Animales sanos)..... | 11 |
| 2.3. Toma de las muestras | 12 |
| 2.3.1 Muestras de sangre | 12 |
| 2.3.2 Prueba de supresión con dexametasona a dosis bajas | 12 |
| 2.3.3 Muestras de pelo..... | 13 |
| 2.3.4 Muestras de orina | 13 |
| 2.4. Análisis de laboratorio | 13 |
| 2.4.1 Hematología y bioquímica sanguínea | 13 |
| 2.4.2 Medición de cortisol sérico | 14 |
| 2.4.3 Análisis de orina..... | 14 |
| 2.4.4 Extracción del cortisol en muestras de pelo | 14 |
| 2.4.5 Inmunoensayo enzimático de las extracciones de pelo | 15 |

| | |
|--|----|
| 2.5. Confiabilidad del método | 16 |
| 2.5.1 Porcentaje de recuperación de la hormona | 16 |
| 2.5.2 Coeficiente de variación intra-ensayo | 17 |
| 2.5.3 Dilución de la muestra de pelo | 17 |
| 2.6. Análisis estadístico de los resultados | 17 |
| 3. RESULTADOS | 19 |
| 3.1 Valores de hematología y bioquímica sanguínea | 19 |
| 3.1.1 Hematología obtenida para ambos grupos de pacientes | 19 |
| 3.1.2 Bioquímica sanguínea para ambos grupos de pacientes | 20 |
| 3.2 Valores de cortisol sérico y medición de relación cortisol:creatinina en orina | 21 |
| 3.3 Mediciones hormonales en el pelo | 22 |
| 3.3.1 Confiabilidad del método: linealidad, precisión y exactitud | 22 |
| 3.3.2 Valores de cortisol obtenidos en pelo | 23 |
| 3.3.3 Relación entre los valores de cortisol sérico y los valores de cortisol en pelo y sus respectivos coeficientes de correlación | 25 |
| 3.3.4 Comparación entre las concentraciones de cortisol en pelo en pacientes sanos y enfermos | 28 |
| 4. DISCUSIÓN | 30 |
| 4.1 Características generales de los grupos | 30 |
| 4.2 Hematología y bioquímica sanguínea | 31 |
| 4.3 Relación cortisol:creatinina en orina | 32 |
| 4.4 Mediciones hormonales en el pelo | 34 |
| 4.4.1 Confiabilidad del método: linealidad, precisión y exactitud | 34 |
| 4.4.2 Valores de cortisol obtenidos en el pelo y comparación entre ambos grupos de pacientes | 36 |
| 4.4.3 Relación entre los valores de cortisol sérico y los valores de cortisol en pelo y sus respectivos coeficientes de correlación | 38 |
| 5. CONCLUSIONES | 42 |
| 6. RECOMENDACIONES | 43 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 44 |
| 8. ANEXOS | 51 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Características descriptivas generales de los caninos incluidos en el grupo de pacientes enfermos..... | 10 |
| Tabla 2. Características descriptivas generales de los caninos incluidos en el grupo de pacientes sanos..... | 11 |
| Tabla 3. Medias de los valores de hematología de los 21 pacientes enfermos, con sus respectivas desviaciones estándar..... | 19 |
| Tabla 4. Medias de los valores de hematología de los 21 pacientes sanos, con sus respectivas desviaciones estándar..... | 20 |
| Tabla 5. Medias de los valores de bioquímica sanguínea para los 42 pacientes, con sus respectivas desviaciones estándar..... | 21 |
| Tabla 6. Medias obtenidas para la medición de cortisol sérico durante la prueba de supresión con dexametasona a dosis bajas y media de la relación cortisol:creatinina en orina, en ambos grupos de pacientes. | 22 |
| Tabla 7. Medias de los valores de cortisol en pelo en ambos grupos de pacientes. | 23 |
| Tabla 8. Diferencia media entre las concentraciones de cortisol sérico y cortisol en el pelo de los pacientes y su IC 95%. | 25 |
| Tabla 9. Correlación de Spearman entre las concentraciones de cortisol sérico y las concentraciones de cortisol en pelo | 28 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Representación gráfica de las diluciones seriadas 1:2 tanto del MAC como de una muestra de pelo. | 23 |
| Figura 2. Representación gráfica de las concentraciones de cortisol en pelo, en ambos grupos de animales. | 24 |
| Figura 3. Comparación de las concentraciones medias de cortisol, en sangre y en pelo, de los pacientes sanos. | 26 |
| Figura 4. Comparación de las concentraciones medias de cortisol, en sangre y en pelo, de los pacientes enfermos. | 27 |
| Figura 5. Gráfico de dispersión entre las concentraciones de cortisol sanguíneo y el cortisol en pelo.. | 28 |
| Figura 6. Comparación de las concentraciones medias de cortisol en pelo, de ambos grupos | 29 |

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ACTH: Hormona adrenocorticotropa o Corticotropina

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

HAC: Hiperadrenocorticismo

HPD: Hiperadrenocorticismo pituitario dependiente

HTA: Hiperadrenocorticismo por tumor adrenal

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (Anticoagulante)

EIA: Inmunoensayo enzimático o Enzimoimmunoanálisis

MAC: Multi Analyte Control

MeOH: Metanol

MG: Media geométrica

SRD: Sin raza definida

UCCR: Ratio/relación cortisol:creatinina en orina

\bar{X} : Promedio (Media aritmética)

RESUMEN

El hiperadrenocorticismo canino es una condición patológica asociada con la exposición crónica a concentraciones excesivas de glucocorticoides, en este caso cortisol. El diagnóstico de esta condición requiere determinar concentraciones de cortisol, cuya medición se realiza principalmente en suero; sin embargo, en la actualidad se han desarrollado técnicas novedosas que facilitan el uso de otras matrices, como el pelo.

El objetivo de este proyecto fue implementar un protocolo de extracción de cortisol a partir del pelo de caninos y medirlo mediante un inmunoensayo enzimático, para eventualmente emplear la técnica en el diagnóstico de hiperadrenocorticismo canino. Además se determinaron valores de cortisol en el pelo de caninos sanos y en caninos con hiperadrenocorticismo en nuestro medio.

Se colectó pelo y suero de 21 perros sanos y 21 perros con hiperadrenocorticismo; la mayoría de ellos fueron atendidos en la Clínica Veterinaria Pet Center, ubicada en Moravia.

Posterior a la validación de la técnica de extracción y medición de cortisol en el pelo, se realizó el mismo procedimiento a las muestras de los caninos y se obtuvo una concentración media corregida de $0,35 \pm 0,58 \mu\text{g/dL}$ para los caninos sanos y $0,46 \pm 3,14 \mu\text{g/dL}$ para los caninos enfermos.

Se realizó una prueba T Student para medias independientes y se determinó que existe una diferencia de concentraciones entre ambos grupos, pero no fue estadísticamente

significativa ($p = 0,365$). A su vez, se calculó el estadístico Rho de Spearman y se determinó que no existe correlación entre las concentraciones de cortisol sérico y el cortisol en pelo.

La técnica de extracción de cortisol en pelo es viable; los resultados obtenidos demostraron que la técnica en sí es confiable y que el cortisol en pelo canino es cuantificable por medio de métodos analíticos apropiados, pero requiere más estudio con el fin de determinar su utilidad como técnica de diagnóstico para la enfermedad en caninos.

ABSTRACT

Hyperadrenocorticism in dogs is a condition associated with a chronic exposure to excessive glucocorticoids, specifically cortisol. Diagnosing this condition requires a measurement of cortisol levels. This test is usually performed in serum and requires suppression or stimulation tests; however, newer techniques have recently involved other matrices such as hair.

The objective of this project was to employ a protocol for cortisol extraction using dog's hair, measuring it through an enzyme immunoassay and evaluating its potential use on the diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs, by establishing cortisol levels on healthy dogs and those with hyperadrenocorticism.

Serum and hair samples were collected from 21 healthy dogs and 21 dogs with hyperadrenocorticism. Most of these dogs were treated at the Clínica Veterinaria Pet Center, located in Moravia.

After validating the hair screening technique and measuring hair cortisol, the same procedure was employed on the dog samples. As a result, a median corrected concentration of $0,35 \pm 0,58 \mu\text{g/dL}$ was determined in healthy dogs, and $0,46 \pm 3,14 \mu\text{g/dL}$ in dogs with hyperadrenocorticism.

A Student's t-test for independent samples was performed, resulting on a difference of concentrations between the two groups; although they were not significant ($p = 0,365$).

Likewise, a Spearman's rho was calculated, and it was determined that there is no correlation between serum and hair cortisol concentrations.

Employing cortisol extraction protocols is feasible. The obtained results proved that the technique can be trusted and that the cortisol found in dog's hair can be measured through appropriate analytics methods. However, additional research is required in order to determine its diagnostic utility for hyperadrenocorticism in dogs.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

El hipotálamo y la glándula hipófisis conforman un sistema funcional sumamente complejo, tanto así que muchos de los procesos clave son el resultado de la interrelación entre el sistema endocrino y el sistema nervioso (Meij et al. 2010). De este modo, el hipotálamo ejerce control sobre la glándula hipófisis, la cual a su vez regula la secreción adrenocortical de cortisol. Los neurotransmisores del sistema nervioso central modulan en el hipotálamo la secreción de hormonas liberadoras, tales como la hormona liberadora de corticotropina (CRH). El sistema portal hipotálamo-hipofisario transporta la CRH al lóbulo anterior de la glándula hipófisis, donde estimula la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) (Melián et al. 2010). Finalmente, la distribución de ACTH en la corteza adrenal induce una rápida síntesis y liberación de cortisol, el cual completa el ciclo al inhibir la secreción de hormonas hipotalámicas e hipofisarias (Behrend 2015).

La corteza adrenal de los mamíferos posee tres zonas histológicas definidas: la zona glomerular (más externa), la zona fascicular (parte media) y la zona reticular (más interna). La función principal de la corteza adrenal es producir dos tipos de hormonas esteroideas, los mineralocorticoides y los glucocorticoides, cuyas funciones son muy distintas (Melián et al. 2010). Los mineralocorticoides se producen en la zona glomerular y participan en el control del equilibrio electrolítico; mientras que los glucocorticoides son producidos por la zona fascicular y reticular, y son sumamente importantes en la regulación de todos los aspectos del metabolismo (Klein 2014).

El principal glucocorticoide producido por la corteza adrenal es el cortisol, dentro de sus efectos específicos en el organismo se destaca la estimulación de la gluconeogénesis hepática, que implica la conversión de aminoácidos en hidratos de carbono. A nivel del tejido adiposo, el cortisol interviene en la redistribución de la grasa en hígado y abdomen e incrementa la tasa de lipólisis, lo que aumenta el nivel de ácidos grasos en la sangre, y estimula el catabolismo proteico en tejidos como el músculo, con consiguiente liberación de aminoácidos que son el substrato principal en el proceso de gluconeogénesis (Goff 2015).

El resultado final de todas estas acciones es un aumento del glucógeno hepático y elevación de los niveles de glucosa en sangre. Otro efecto importante del cortisol es el papel que desempeña en la diuresis, ya que inhibe la actividad de la hormona antidiurética (vasopresina) en el túbulo distal y por ende aumenta el índice de filtración glomerular (Klein 2014).

El síndrome de Cushing es un “término general” usado para referirse al conjunto de anomalías clínicas y químicas que resultan de la exposición crónica a concentraciones excesivas de glucocorticoides (Melián et al. 2010). El cortisol es el principal glucocorticoide liberado por las glándulas adrenales en perros y gatos, por lo que el exceso de glucocorticoide endógeno es esencialmente hipercortisolismo (Galac et al. 2010). Al igual que en los humanos, el hiperadrenocorticismismo (HAC) canino también tiene varios orígenes patofisiológicos, pero todos tienen un común denominador: excesos crónicos de cortisol sistémico (Melián et al. 2010).

Según Nelson (2014), el HAC canino posee tres clasificaciones: hipofisario o pituitario dependiente, adrenocortical e iatrogénico; este último es ocasionado por la administración

excesiva de glucocorticoides. La causa más común de un incremento en la concentración de ACTH es el hiperadrenocorticismo pituitario dependiente (HPD) debido a tumores pituitarios capaces de sintetizar y secretar cantidades excesivas de ACTH, generando una hiperplasia adrenocortical bilateral secundaria y por ende, secreción excesiva de glucocorticoides. La mayoría de los perros con esta condición presentan un microadenoma hipofisario, que es tan pequeño que no provoca signos neurológicos, a diferencia de un macroadenoma que sí podría provocarlos (Bishop y Lathan 2015).

La segunda causa más común de HAC canino es el hiperadrenocorticismo por tumor adrenal (HTA), este tipo de tumor produce cantidades excesivas de cortisol de manera autónoma, es decir, es independiente del control pituitario. Según la literatura, 15 a 20% de los perros con hiperadrenocorticismo espontáneo presentan un tumor adrenal (Melián et al. 2010). En estos casos, la hipercortisolemia suprime las concentraciones de CRH hipotalámico y ACTH plasmático; el resultado de esta retroalimentación negativa crónica es la atrofia cortical de la glándula adrenal contralateral y atrofia de las células normales en la glándula adrenal comprometida (Behrend 2015); dicha atrofia causa asimetría en el tamaño de las glándulas adrenales (Nelson 2014).

Por último, Melián y colaboradores (2010) establecen que el HAC por causas iatrogénicas puede resultar debido a una administración excesiva de ACTH (lo cual es muy raro) o por medicaciones excesivas con glucocorticoides para controlar desórdenes inmunomediados y alérgicos; también puede desarrollarse producto de la administración a largo plazo de medicamentos oftálmicos, óticos o dérmicos que contienen corticoides, sobre todo en perros pequeños. Debido a que en estos pacientes el eje hipotalámico-hipofisario-

adrenocortical funciona correctamente, la administración excesiva de glucocorticoides por tiempo prolongado suprime las concentraciones plasmáticas de ACTH y genera atrofia adrenocortical bilateral (Nelson 2014).

El síndrome de Cushing se desarrolla comúnmente en perros de edad media o mayores. La mayoría de perros ($\geq 89\%$) con hiperadrenocorticismismo pituitario dependiente y aquellos que presentan tumores adrenocorticales funcionales, son mayores a seis años (Gallelli et al. 2010). No todos los perros con hiperadrenocorticismismo desarrollan la misma sintomatología, además el tipo de signos y su duración, es similar tanto en casos de HPD como en perros con HTA.

Los signos clínicos de ambas presentaciones son consecuencia de los efectos gluconeogénicos, inmunosupresores, antiinflamatorios y catabólicos que ejercen los glucocorticoides sobre los diversos sistemas del organismo (Galac et al. 2010). Dentro de los signos más frecuentes se encuentran: polidipsia, poliuria, distensión abdominal, alopecia, alteraciones epidérmicas, jadeo y debilidad muscular (Zur y White 2011). En algunos casos los cambios cutáneos son el único signo clínico evidente, por lo que la presencia de manifestaciones cutáneas comunes de HAC, tales como alopecia simétrica no pruriginosa y piel delgada, aún en ausencia de signos sistémicos, justifica el sospechar de esta enfermedad (Behrend 2015). En cualquier perro que se sospeche de HAC, es necesario realizar una evaluación total y ésta debe incluir un recuento sanguíneo completo, perfil bioquímico sanguíneo, urianálisis, y si es posible, ecografía abdominal y medición de presión arterial sistémica (Nelson 2014).

1.2. Justificación

Behrend y colaboradores (2013), establecen que el HAC canino probablemente es sobre diagnosticado, debido a la gran cantidad de signos clínicos y a la ocurrencia de resultados falsos-positivos en las pruebas de detección de rutina. La indicación principal para llevar a cabo las pruebas necesarias para realizar un diagnóstico de HAC, es la presencia de uno o más signos clínicos característicos y hallazgos presentes en el examen físico.

El abordaje estándar para diagnosticar el HAC consiste en medir la actividad del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, por medio de la medición del cociente cortisol:creatinina en orina (UCCR), combinado con métodos mínimamente invasivos como la prueba de estimulación con ACTH y/o la prueba de supresión con dexametasona a dosis bajas y/o altas (Ouschan et al. 2013). No obstante, dichas pruebas toman tiempo, son estresantes para el paciente y son relativamente costosas, por lo que en ocasiones resulta difícil que el propietario del animal acepte realizarlas.

Según Bennett y Hayssen (2010), las concentraciones de glucocorticoides pueden medirse en una gran variedad de muestras biológicas, incluyendo sangre, plasma, saliva, orina, heces y pelo; sin embargo, cada una de estas formas de muestreo tiene limitaciones. Dentro de los métodos más utilizados están la sangre y la saliva; dichas muestras proporcionan “vistas instantáneas” de las concentraciones de cortisol, pero la sujeción requerida para la toma de éstas puede ser estresante para el animal y por ende, puede aumentar la concentración de cortisol (Dreschel y Granger 2009). Por otra parte, la orina y las heces proveen mediciones de cortisol que abarcan un lapso corto, pero tienen la desventaja de que son menos sensibles a la

variabilidad aguda que ocurre en las concentraciones de cortisol sanguíneo (Stephen y Ledger 2006).

De acuerdo con literatura actual, el pelo es el medio de muestreo más recientemente empleado para realizar medición de cortisol (Davenport et al. 2006; Accorsi et al. 2008; Corradini et al. 2013; Ouschan et al. 2013), tanto para determinar sus niveles basales como sus elevaciones crónicas. De hecho, en medicina humana el análisis de cortisol en pelo ha demostrado ser una herramienta muy útil en el diagnóstico de dolor crónico, estrés, exposición a drogas e hiperadrenocorticismos (Meyer y Novak 2012); estos estudios en humanos han mostrado que el cortisol en pelo puede jugar un papel relevante en el monitoreo de la progresión de la enfermedad y en la eficacia del tratamiento en pacientes que padecen síndrome de Cushing (Thomson et al. 2010; Manenschijn et al. 2011).

Existe muy poca información de esta índole en medicina veterinaria, con pocos estudios recientes en animales domésticos y silvestres; principalmente caninos (Ouschan et al. 2013), felinos (Accorsi et al. 2008), equinos (Duran et al. 2017) y macacos (Davenport et al. 2006). Por lo que resulta necesario llevar a cabo más estudios que, idealmente, amplíen las técnicas empleadas y sus aplicaciones clínicas.

La medición de cortisol en pelo ofrece muchísimas ventajas como método de muestreo con respecto a las técnicas tradicionales, al ser un método indoloro, no invasivo y que refleja de manera concisa los niveles de cortisol sistémico por periodos prolongados (Gow et al. 2010; Manenschijn et al. 2011); por estas razones se perfila como una herramienta valiosa para el diagnóstico preliminar de hiperadrenocorticismos en perros. Cabe destacar que, aunque

en nuestro país nunca se ha llevado a cabo este tipo de estudio, se cuenta con todas las herramientas para realizarlo.

La técnica de medición hormonal en pelo, es relativamente incipiente, su aplicación fue descrita inicialmente para esteroides sexuales, y luego fue reportada por Thomson y colaboradores (2010) para la determinación de niveles de cortisol en pelo de macacos Rhesus machos. Se han utilizado diversas metodologías para determinar la concentración de cortisol en el pelo, desde ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayos (RIA), y hasta cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas (HPLC-MS). Para todas estas técnicas se ha reportado un coeficiente de variación alrededor o por debajo del 10% (Gow et al. 2010). Por lo general, los inmunoensayos son el método de elección para determinar analitos que normalmente están presentes en concentraciones muy bajas y no pueden ser determinados de manera precisa con métodos menos costosos. Además, el EIA como tal ofrece resultados rápidos, de bajo costo y buena sensibilidad.

Este proyecto pretende llevar a cabo la técnica de extracción de cortisol a partir del pelo y su posterior medición mediante un EIA realizado en un analizador automatizado. Asimismo, se busca comparar los valores de cortisol arrojados por esta técnica con aquellos obtenidos a partir de su medición en suero y relacionarlos con los signos clínicos mostrados por pacientes sanos y diagnosticados con HAC, con el fin de valorar que la técnica sea aplicable en un futuro, como parte de las determinaciones iniciales que se realizan en caninos sospechosos de HAC.

1.3. Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Implementar un protocolo de extracción de cortisol a partir de pelo y su medición mediante un ensayo inmunoenzimático para su empleo en el diagnóstico de hiperadrenocorticismismo canino.

1.3.2 Objetivos Específicos

- 1.3.2.1 Validar una técnica de extracción de cortisol a partir del pelo de caninos.
- 1.3.2.2 Establecer los valores de cortisol en el pelo de caninos sanos y en caninos con HAC.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de trabajo

El proyecto en cuestión se realizó en la Clínica Veterinaria Pet Center, ubicada en Moravia, San José; ahí se abordó la mayoría de los casos incluidos en el estudio, estos fueron recopilados durante los meses de setiembre del 2017 hasta abril del 2018. La clínica cuenta con el equipo automatizado necesario para procesar las muestras de hematología, bioquímica sanguínea y orina que se debían realizar (Anexo 1).

El procesamiento de las muestras para medición de cortisol sérico y cortisol en pelo se llevó a cabo en el Laboratorio de Endocrinología y Biotecnología Reproductiva de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

2.2. Selección de los individuos

Se seleccionaron 42 caninos, machos y hembras, enteros o esterilizados, con edad mayor o igual a un año, pertenecientes a cualquier raza o incluso mixtos. De estos, 21 animales eran completamente sanos y los 21 animales restantes habían sido diagnosticados con hiperadrenocorticismos. Los propietarios de los animales seleccionados fueron previamente informados de la inclusión de sus animales en este estudio (Anexo 2).

2.2.1 Enfermos (Animales con hiperadrenocorticismos)

Se incluyeron seis machos y 15 hembras, con un rango de edad entre seis y 14 años, pertenecientes a cualquier raza o incluso mixtos. En la tabla 1 se detalla la estadística

descriptiva generada (frecuencia por sexo, raza y signos clínicos; promedios de peso y edad, con sus respectivas desviaciones estándar y variaciones). Estos caninos fueron seleccionados por los hallazgos de la examinación física inicial, aunado a los análisis de hematología, bioquímica sanguínea, urianálisis y prueba de supresión con dexametasona a dosis bajas. Los hallazgos clínicos y laboratoriales fueron consistentes con hiperadrenocorticismos. También se incluyeron pacientes del Hospital de Especies Menores y Silvestres de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (HEMS) que fueron diagnosticados con HAC. En el Anexo 3 se muestra la información detallada de los caninos incluidos en el grupo.

Tabla 1. Características descriptivas generales de los caninos incluidos en el grupo de pacientes enfermos.

| | |
|---------------------------------|---|
| Frecuencia por sexo | 15 hembras (10 esterilizadas) 6 machos (6 esterilizados) |
| Frecuencia por raza | Schnauzer miniatura (7) French poodle (4) SRD (3) Chihuahua (2) Dachshund pelo corto (2) Otras razas (3)* |
| Frecuencia por signos clínicos | Distensión abdominal (10) Poliuria/polidipsia (9) Piodermas recurrentes (9) Polifagia (5) Jadeo (4) Alopecia endocrina (2) |
| Promedio peso (Kg) | 7,47 |
| Desviación estándar peso (Kg) | 2,83 |
| Variación peso | 0,38 |
| Promedio edad (Años) | 9,76 |
| Variación edad | 0,21 |
| Desviación estándar edad (Años) | 2,07 |

* Otras razas fueron: Cocker spaniel (1), maltés (1) y pinscher miniatura (1).

2.2.2 Controles (Animales sanos)

Se incluyeron cinco machos y 16 hembras, con un rango de edad entre dos y 14 años, pertenecientes a cualquier raza o incluso mixtos. En la tabla 2 se muestra la estadística descriptiva (frecuencia por sexo, promedios de peso y edad, con sus respectivas desviaciones estándar y variaciones). Dichos caninos fueron considerados sanos con base en su historial médico previo, examinación física general y resultados de los análisis hematológicos y de bioquímica sanguínea. Además, para constatar que eran caninos completamente sanos, fueron sometidos a las pruebas de supresión con dexametasona a dosis bajas y a la medición del cociente cortisol:creatinina en orina (UCCR). En el Anexo 4 se muestra la información detallada de los caninos incluidos en este grupo.

Tabla 2. Características descriptivas generales de los caninos incluidos en el grupo de pacientes sanos.

| | |
|---------------------------------|---|
| Frecuencia por sexo | 16 hembras (15 esterilizadas) 5 machos (2 esterilizados) |
| Frecuencia por raza | SRD (5) French poodle (4) Golden retriever (3) Boston terrier (2) Schnauzer miniatura (2) Otras razas (5)* |
| Promedio peso (Kg) | 15,25 |
| Desviación estándar peso (Kg) | 10,44 |
| Variación peso | 0,68 |
| Promedio edad (Años) | 8 |
| Variación edad | 0,44 |
| Desviación estándar edad (Años) | 3,49 |

* Otras razas fueron: Beagle (1), chow chow (1), maltés (1), husky siberiano (1) y yorkshire terrier (1).

2.3. Toma de las muestras

2.3.1 Muestras de sangre

Cada uno de los animales seleccionados fue sometido a un ayuno previo de 12 horas para la toma de muestras, se colocó un catéter a nivel de la vena cefálica para obtener sangre venosa, ésta se dispuso en un tubo con EDTA para hemograma y en un tubo con heparina para bioquímica plasmática (creatinina, alanina aminotransferasa, fosfatasa alcalina, colesterol y triglicéridos).

En el caso de las muestras para bioquímica sanguínea, se utilizó sangre entera heparinizada debido a que así lo requiere el equipo Reflovet Plus® (Roche), utilizado en la clínica.

2.3.2 Prueba de supresión con dexametasona a dosis bajas

Se administró a cada canino por vía intravenosa, fosfato sódico de dexametasona a una dosis de 0,01 mg/kg, tal como lo describe Melián y colaboradores (2010). Se colectaron tres muestras de sangre venosa en tubos simples (sin anticoagulante), previo a la administración de dexametasona, cuatro y ocho horas posterior a la administración de la misma, para determinar la concentración sérica de cortisol; éstas fueron centrifugadas a 3000 rpm durante diez minutos y refrigeradas a 4 °C.

2.3.3 Muestras de pelo

Se colectó el pelo de la región de la vena cefálica en miembros anteriores, previo a la toma de muestras de sangre. El pelo se rasuró con una rasuradora eléctrica, a nivel de la piel y se guardó en bolsas estériles debidamente rotuladas, a temperatura ambiente hasta ser analizadas.

2.3.4 Muestras de orina

Se colectó una muestra de aproximadamente tres a cinco mililitros, por medio de cistocentesis, correspondiente a la orina de la mañana. Por lo general, se le pidió al propietario que trajera al animal a primera hora.

2.4. Análisis de laboratorio

2.4.1 Hematología y bioquímica sanguínea

Ambos análisis se realizaron en la clínica Pet Center. El análisis hematológico se ejecutó por medio del equipo automatizado VetScan® HM5 (Abaxis), según las indicaciones del fabricante. El panel de químicas sanguíneas se procesó con el equipo semi-automático Reflovet Plus®; dicho equipo utiliza sangre entera heparinizada y la medición se realizó mediante un fotómetro de reflexión compacto. Los analitos que se evaluaron para cada paciente fueron: creatinina, alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), colesterol y triglicéridos.

2.4.2 Medición de cortisol sérico

Las tres muestras de sangre obtenidas, posterior a la realización de la prueba de supresión con dexametasona a dosis bajas fueron centrifugadas; y el suero obtenido de estas fue enviado en un plazo máximo de 24 horas al Laboratorio de Endocrinología y Biotecnología Reproductiva de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, donde fueron procesados en el equipo de inmunoensayo automatizado AIA-360[®] (TOSOH), según el protocolo establecido en el Laboratorio.

2.4.3 Análisis de orina

Las muestras de orina se utilizaron para realizar dos pruebas. Primeramente, se tomó una parte de la muestra (aproximadamente dos mililitros) para realizar un urianálisis completo por medio del equipo Urisys 1100[®] (Roche), que permite realizar un análisis semi cuantitativo de la orina y elimina posibles fuentes de error durante la evaluación visual. Dicho equipo utiliza las tiras reactivas Combur10 Test[®] UX. Además, se realizó un análisis microscópico del sedimento urinario. El volumen remanente de orina se envió al Laboratorio Diagnóstico Albéitar para la determinación del cociente cortisol:creatinina urinario.

2.4.4 Extracción del cortisol en muestras de pelo

El protocolo de extracción implementado se basó en las metodologías descritas por Corradini y colaboradores (2013) y Ouschan y colaboradores (2013). El pelo se cortó en pequeños segmentos de uno a tres milímetros de largo, hasta alcanzar 150 mg y se lavó en diez

mililitros de metanol (MeOH) durante tres minutos, luego se dejó secar la muestra de pelo bajo un flujo constante de aire, durante el tiempo necesario.

Después, se incubó la muestra en diez mililitros de MeOH durante 16 horas a temperatura ambiente. Posterior a la incubación, se centrifugó a 4000 rpm durante cinco minutos, se decantó el sobrenadante a un tubo nuevo y se rotuló debidamente. El sobrenadante obtenido se colocó en el Thermomixer Eppendorf[®] a 60°C, bajo un flujo de aire constante, para evaporar el solvente orgánico.

El extracto seco obtenido fue reconstituido en 250 µL de buffer de análisis y se colocó en un sonicador Branson[®] para lograr una completa homogenización del extracto, seguidamente se centrifugó a 5000 rpm durante cinco minutos. Dicho extracto reconstituido correspondió a la solución de cortisol en pelo.

El protocolo de extracción establecido se precisa detalladamente en el Anexo 5.

2.4.5 Inmunoensayo enzimático de las extracciones de pelo

De cada extracto reconstituido se utilizó diez microlitros para realizar el inmunoensayo, se empleó el equipo automatizado AIA-360[®], según las indicaciones del fabricante.

El equipo realiza un inmunoensayo fluorescente competitivo ligado a enzimas y utiliza las copas comerciales ST AIA PACK CORTISOL[®], dichas copas traen en su interior perlas magnéticas cargadas de anticuerpo y la hormona marcada con una enzima, debido a que es un ensayo competitivo la hormona presente en la muestra compite con la hormona marcada para

unirse al anticuerpo. Posteriormente, el equipo remueve la hormona marcada sin unir y agrega el sustrato para formar un producto fluorescente. Para finalizar se mide la cantidad de enzima unida a las perlas ya que se considera que es inversamente proporcional a la concentración de la hormona en la muestra.

2.5. Confiabilidad del método

Para efecto de validar la técnica, se realizaron varios controles de calidad que permitieron evaluar la eficiencia del método de extracción y la medición de cortisol en el pelo. Dichos controles fueron el porcentaje de recuperación de la hormona y la repetitividad de los resultados; ligado a la congruencia entre los resultados de pelo, suero y la evaluación clínica de los animales.

2.5.1 Porcentaje de recuperación de la hormona

El porcentaje de recuperación es la capacidad que tiene el procedimiento analítico para determinar de manera cuantitativa un analito que ha sido adicionado a una muestra. En este caso, se compararon mediciones de tres muestras: (i) un control comercial de concentración conocida MAC (MultiAnalyte Control), (ii) una muestra de pelo a la cual se le añadió una cantidad determinada del MAC, que se denominó M+MAC y (iii) una muestra de pelo intacta. Las tres muestras fueron sometidas al proceso de medición hormonal con el equipo AIA-360[®].

Este porcentaje se obtuvo de restar el valor de la muestra de pelo al valor total hormonal de M+MAC, dicho valor se dividió entre el resultado hormonal del MAC y seguidamente se multiplicó por 100.

2.5.2 Coeficiente de variación intra-ensayo

La repetibilidad es la variación observada cuando se realiza una medición de un mismo elemento de forma repetida usando siempre la misma técnica, y es una medida de precisión de la técnica utilizada; en sí indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para réplicas de una misma muestra. El coeficiente de variación intra-ensayo se determinó cuantificando una misma extracción tres veces en el analizador AIA-360[®], se calculó la desviación estándar y posteriormente se dividió ese resultado entre 100.

2.5.3 Dilución de la muestra de pelo

La linealidad de un método define la habilidad de este para obtener resultados proporcionales a la concentración del analito. Para probar la linealidad del ensayo y su paralelismo, se realizaron al menos cuatro diluciones seriadas 1:2 (1:4, 1:8, 1:16, 1:32) de una muestra de pelo y del MAC; y se cuantificó la concentración de cortisol en todas las diluciones. Esto permitió evaluar la relación entre las diluciones de ambas matrices (la solución madre y el MAC). Idealmente la dilución no debería tener una influencia significativa en los resultados obtenidos.

2.6. Análisis estadístico de los resultados

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de la información básica de ambos grupos de pacientes del estudio: frecuencias por sexo, raza y signos clínicos, así como determinación del promedio y variación para el peso y la edad.

De igual manera, los resultados obtenidos de los paneles sanguíneos, bioquímicos y las mediciones de cortisol en sangre fueron analizados por métodos estadísticos descriptivos: cálculo de medias, medianas, desviación estándar, valores mínimos y máximos de cada variable; y se ordenaron mediante el uso de tablas.

Con respecto a la técnica de extracción, se evaluó el porcentaje de recuperación de la hormona y la repetibilidad de los resultados para valorar la eficiencia del método de extracción y medición de cortisol en el pelo.

Para ambos grupos de pacientes se analizó la relación entre los valores obtenidos de la medición de cortisol en pelo y sus respectivos valores de cortisol en sangre, por medio de pruebas de T student para medias pareadas. Además, para cuantificar la relación existente entre ambas variables (cortisol sérico y cortisol en pelo), se definió el coeficiente de correlación de Spearman; se decidió utilizar dicho estadístico de correlación debido a que, a pesar de que eran variables cuantitativas, se contaba con una muestra pequeña (menos de 30 casos por grupo).

Finalmente, la comparación de las concentraciones de cortisol en ambos grupos del estudio (pacientes sanos y enfermos) se analizó realizando una prueba de T para medias independientes.

Se utilizó el programa estadístico Minitab 18[®] Statistical Software (Minitab Inc, 2018) para realizar todos los cálculos estadísticos pertinentes, así como los gráficos respectivos.

3. RESULTADOS

3.1 Valores de hematología y bioquímica sanguínea

Se procesaron perfiles hematológicos y bioquímicos para los 42 caninos incluidos en el proyecto, para cada una de las variables se calculó la media, la mediana, desviación estándar, así como los valores máximos y mínimos (rango).

3.1.1 Hematología

En la tabla 3 se detallan los valores más relevantes obtenidos en el conteo sanguíneo completo de los caninos con hiperadrenocorticismos.

Tabla 3. Medias de los valores de hematología de los 21 pacientes enfermos, con sus respectivas desviaciones estándar.

| Variable | Media | Desviación estándar | Mediana | Rango |
|--|--------------|----------------------------|----------------|---------------|
| Linfocitos ($\times 10^9/L$) | 1,61 | 0,73 | 1,53 | 0,82 - 2,86 |
| Monocitos ($\times 10^9/L$) | 0,46 | 0,36 | 0,47 | 0,19 - 1,46 |
| Neutrófilos ($\times 10^9/L$) | 7,30 | 2,55 | 7,62 | 2,31 - 13,18 |
| Eosinófilos ($\times 10^9/L$) | 0,17 | 0,18 | 0,19 | 0,02 - 0,53 |
| Basófilos ($\times 10^9/L$) | 0,07 | 0,06 | 0,10 | 0,02 - 0,21 |
| Leucocitos totales ($\times 10^9/L$) | 9,90 | 2,97 | 10,58 | 3,74 - 15,49 |
| Eritrocitos totales ($\times 10^{12}/L$) | 7,95 | 0,91 | 8,02 | 6,45 - 9,32 |
| Hemoglobina (g/dL) | 18,70 | 1,52 | 18,70 | 14,8 - 20,40 |
| Hematocrito (%) | 48,17 | 10,31 | 51,47 | 17,20 - 57,98 |
| CHCM (g/dL) | 35,90 | 1,16 | 36,10 | 33,70 - 38 |
| Plaquetas ($\times 10^9/L$) | 399,13 | 98,90 | 401,50 | 296 - 610 |

De igual forma, en la tabla 4 se presentan los valores hematológicos respectivos para el grupo de pacientes sanos.

Tabla 4. Medias de los valores de hematología de los 21 pacientes sanos, con sus respectivas desviaciones estándar.

| Variable | Media | Desviación estándar | Mediana | Rango |
|--|--------------|----------------------------|----------------|---------------|
| Linfocitos ($\times 10^9/L$) | 1,62 | 0,62 | 1,62 | 1,01 - 3,01 |
| Monocitos ($\times 10^9/L$) | 0,39 | 0,33 | 0,41 | 0,09 - 1,37 |
| Neutrófilos ($\times 10^9/L$) | 7,80 | 2,69 | 7,26 | 5,43 - 14,38 |
| Eosinófilos ($\times 10^9/L$) | 0,08 | 0,16 | 0,14 | 0,01 - 0,48 |
| Basófilos ($\times 10^9/L$) | 0,04 | 0,30 | 0,05 | 0,01 - 1,13 |
| Leucocitos totales ($\times 10^9/L$) | 10,20 | 3,08 | 9,55 | 6,80 - 17,20 |
| Eritrocitos totales ($\times 10^{12}/L$) | 7,10 | 0,74 | 7,14 | 5,54 - 8,11 |
| Hemoglobina (g/dL) | 16,50 | 1,93 | 17,10 | 12,9 - 18,80 |
| Hematocrito (%) | 47,22 | 5,31 | 48,15 | 37,45 - 53,87 |
| CHCM (g/dL) | 34,90 | 1,65 | 34,50 | 32,30 - 38,60 |
| Plaquetas ($\times 10^9/L$) | 338,70 | 123,10 | 330 | 217 - 563 |

3.1.2 Bioquímica sanguínea

A continuación, en la tabla 5 se presentan los valores de bioquímica sanguínea para los dos grupos de pacientes. A cada uno de los pacientes se le midieron valores de creatinina, ALT, ALP, colesterol y triglicéridos.

Tabla 5. Medias de los valores de bioquímica sanguínea para los 42 pacientes, con sus respectivas desviaciones estándar.

| Variable | | Media | Desviación estándar | Mediana | Rango |
|-----------------------|----------|--------------|----------------------------|----------------|--------------|
| Creatinina (mg/dL) | Enfermos | 0,70 | 0,13 | 0,77 | 0,50 - 0,87 |
| | Sanos | 0,75 | 0,19 | 0,76 | 0,50 - 1,24 |
| ALT (UI/L) | Enfermos | 75,30 | 38,60 | 81,70 | 25,80 - 147 |
| | Sanos | 49,50 | 29,15 | 49,90 | 22,70 - 106 |
| ALP (UI/L) | Enfermos | 492,30 | 701 | 723 | 36 - 2130 |
| | Sanos | 106 | 93,50 | 132 | 30 - 342 |
| Colesterol (mg/dL) | Enfermos | 245,10 | 121,40 | 264 | 100 - 500 |
| | Sanos | 202,80 | 103,90 | 210 | 100 - 388 |
| Triglicéridos (mg/dL) | Enfermos | 186,90 | 175,30 | 203 | 70 - 600 |
| | Sanos | 103,20 | 215,30 | 72,50 | 70 - 600 |

3.2 Valores de cortisol sérico y medición de relación cortisol:creatinina en orina

Ambos grupos de pacientes fueron sometidos al test de supresión con dexametasona, y los resultados de dicha prueba se detallan a continuación (Tabla 6). Se obtuvo una concentración media de cortisol basal sérico de $4,53 \pm 10,80 \mu\text{g/dL}$ para el grupo de caninos enfermos y para el grupo de caninos sanos fue de $1,01 \pm 1,78 \mu\text{g/dL}$.

En la última parte de la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos para la medición de la relación cortisol-creatinina en orina (UCCR), en el caso de los caninos sanos se reportó una media de $43,30 \times 10^{-6} \pm 42,20 \mu\text{mol/L}$, mientras que para el grupo de caninos con HAC fue $126,50 \times 10^{-6} \pm 113,70 \mu\text{mol/L}$.

Tabla 6. Medias obtenidas para la medición de cortisol sérico durante la prueba de supresión con dexametasona a dosis bajas y media de la relación cortisol:creatinina en orina, en ambos grupos de pacientes.

| Variable | | Media | | | Desviación | Mediana | Rango |
|-------------------------|----------|--------------------------|-------|-------|------------|---------|----------------|
| | | Basal | 4 hrs | 8 hrs | estándar | | |
| Cortisol sérico (µg/dL) | Enfermos | 4,53 | 0,86 | 3,03 | 10,80 | 5,99 | 0,40 - 48,36 |
| | Sanos | 1,01 | 0,20 | 0,20 | 1,78 | 0,92 | 0,20 - 6,44 |
| UCCR (µmol/L) | Enfermos | 126,50 x10 ⁻⁶ | | | 113,70 | 136,50 | 37,90 - 399,20 |
| | Sanos | 43,30 x10 ⁻⁶ | | | 42,20 | 39,80 | 18,90 -110,30 |

3.3 Mediciones hormonales en el pelo

3.3.1 Confiabilidad del método: linealidad, precisión y exactitud.

Al comparar las mediciones obtenidas para las muestras de pelo y las muestras de concentración conocida (MAC), se observó un porcentaje de recuperación hormonal que varió desde un 84% hasta un 173%.

El coeficiente de variación intra-ensayo obtenido de las mediciones fue 7,8%. Por otra parte, con respecto a las diluciones del MAC y las muestras de pelo, ambas presentaron comportamientos muy similares en todas las diluciones (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) y por ende adecuada linealidad, tal como se observa en la Figura 1, donde se comparan las diluciones seriadas del MAC y las diluciones seriadas de una muestra de pelo.

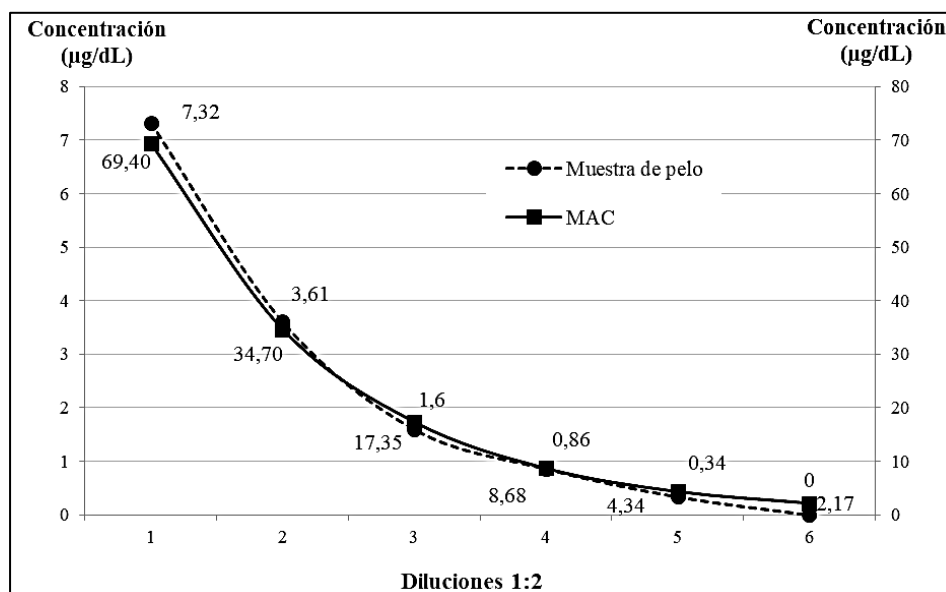


Figura 1. Representación gráfica de las diluciones seriadas 1:2 tanto del MAC como de una muestra de pelo.

3.3.2 Valores de cortisol obtenidos en pelo.

Las concentraciones de cortisol en el pelo fueron medidas por medio de la técnica de inmunoensayo, al igual que los valores de cortisol sérico. Para el grupo de pacientes sanos (control) se obtuvo una media de $0,44 \pm 8,78 \mu\text{g/dL}$, mientras que para los pacientes con HAC la media fue de $0,46 \pm 3,14 \mu\text{g/dL}$. Las concentraciones medias no difieren de manera notable, sin embargo el grupo control presenta una media ligeramente más baja; en la tabla 7 se detallan los resultados obtenidos.

Tabla 7. Medias de los valores de cortisol en pelo en ambos grupos de pacientes.

| Grupo de animales | Media (µg/dL) | Desviación estándar | Mediana | Rango |
|-------------------|---------------|---------------------|---------|--------------|
| Sanos | 0,44* | 8,78 | 0,39 | 0,10 - 40,75 |
| Enfermos | 0,46 | 3,14 | 0,40 | 0,10 - 14,68 |

*Este valor incluye las 21 observaciones obtenidas para la concentración de cortisol en pelo del grupo control.

Uno de los caninos del grupo de pacientes sanos reportó una concentración de cortisol en pelo sumamente elevado y se identificó como un valor atípico, de hecho corresponde al valor máximo del grupo (40,75 $\mu\text{g/dL}$), por lo que se eliminó para efectos de comparación entre las concentraciones de ambos grupos, al realizar la prueba T student para medias independientes y T student para medias pareadas; no obstante, sí se incluyó al calcular la media de concentración para el grupo y también en la representación gráfica de estos.

Al eliminar este valor atípico, se obtuvo una media corregida de 0,35 $\mu\text{g/dL}$, en el Anexo 6 se detalla la media de concentración de cortisol en pelo corregido, para el grupo de pacientes sanos, junto con el resto de estadística descriptiva vinculada.

En la Figura 2 se muestra la representación gráfica de las concentraciones obtenidas para ambos grupos del estudio, en ella se denota fácilmente la distribución de ambos grupos, incluso con sus valores máximos.

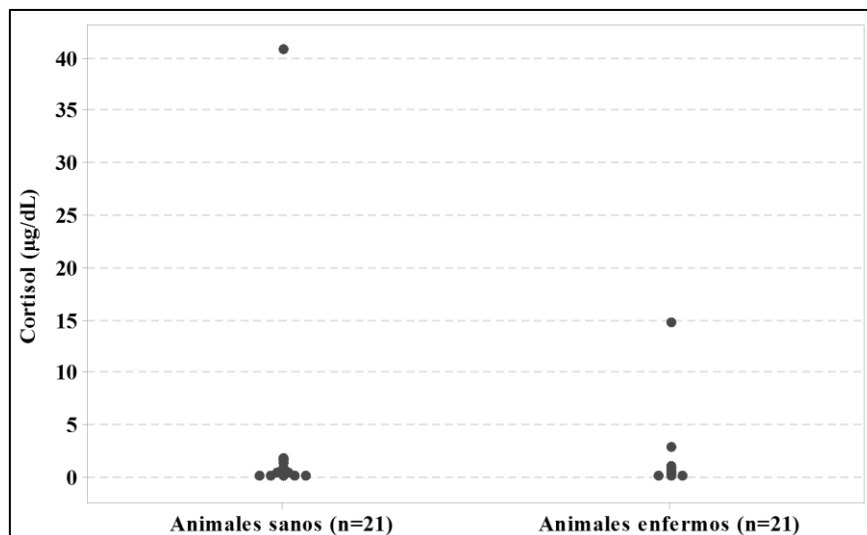


Figura 2. Representación gráfica de las concentraciones de cortisol en pelo, en ambos grupos de animales.

3.3.3 Relación entre los valores de cortisol sérico y los valores de cortisol en pelo y sus respectivos coeficientes de correlación.

Para cada uno de los grupos, se compararon las concentraciones de cortisol medidas en el pelo contra las concentraciones séricas, esto con el fin de determinar si existe una relación. Para el grupo de pacientes sanos se utilizó la media de concentración corregida (Anexo 6).

En la tabla 8 se presentan los valores estadísticos obtenidos para el grupo de animales sanos y enfermos.

Tabla 8. Diferencia media entre las concentraciones de cortisol sérico y cortisol en el pelo de los pacientes y su IC 95%.

| Grupo | Diferencia Media | Desviación estándar | Error estándar de la media | IC 95% para la diferencia | Valor T | Valor p |
|--------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------|----------------|
| Sanos | 1,02 | 1,77 | 0,39 | (0,19; 1,85) | 2,57 | 0,018 |
| Enfermos | 7,37 | 11,09 | 2,42 | (2,32; 12,42) | 3,04 | 0,006 |

En el caso de los pacientes sanos, la diferencia media para ambas concentraciones es de $1,02 \pm 1,77$, es una diferencia estadísticamente significativa ya que el valor de probabilidad asociado es menor ($p < 0,05$). En la Figura 3 se presenta una comparación gráfica de las concentraciones de cortisol para el grupo de pacientes sanos.

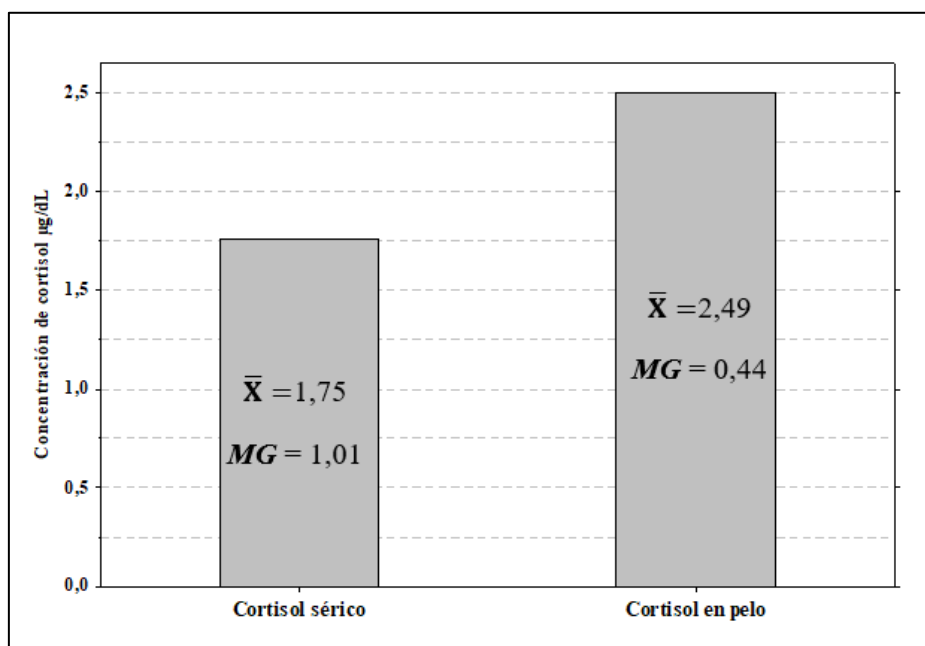


Figura 3. Comparación de las concentraciones medias de cortisol, en sangre y en pelo, de los pacientes sanos. (\bar{X} : promedio, MG: media geométrica).

En contraste, al comparar las concentraciones de cortisol en el grupo de pacientes enfermos, la diferencia media es de $7,37 \pm 11,09$ y es estadísticamente significativa ($p < 0,05$). De igual manera se ejemplifica la diferencia de éstas por medio de un gráfico, en la Figura 4.

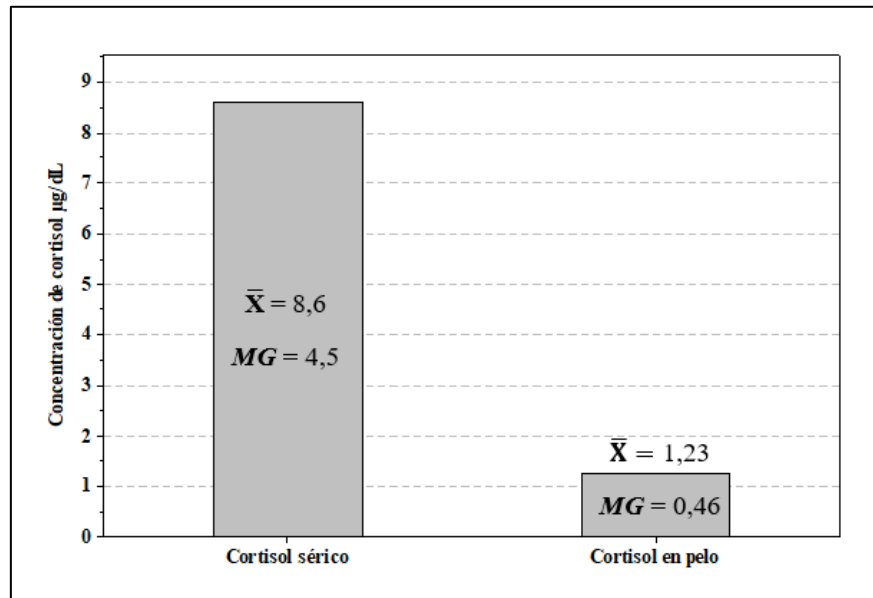


Figura 4. Comparación de las concentraciones medias de cortisol, en sangre y en pelo, de los pacientes enfermos (\bar{X} : promedio, MG: media geométrica).

Debido a que la muestra es pequeña (menos de 30 casos), se prefirió utilizar como estadístico de correlación el coeficiente de Spearman, para determinar si las concentraciones de cortisol en pelo están asociadas a las concentraciones séricas. En el caso de los pacientes sanos, el coeficiente de correlación obtenido fue de 0,067, con $p > 0,05$; para los pacientes con HAC el coeficiente de correlación fue 0,165 con $p > 0,05$.

Por lo tanto, en ambos casos, se estableció que no existe correlación entre las variables, ya que los estadísticos de rho de Spearman obtenidos fueron muy cercanos a cero y el valor de probabilidad no fue estadísticamente significativo. O sea que no existe una asociación directa entre las concentraciones de cortisol detectadas en las matrices de pelo y suero. En la siguiente tabla (Tabla 9) se muestran los resultados tabulados y por medio de los gráficos de dispersión presentados en la Figura 5, se denota la relación nula que existe entre las variables.

Tabla 9. Correlación de Spearman entre las concentraciones de cortisol sérico y las concentraciones de cortisol en pelo

| Grupo de animales | Rho de Spearman | Valor p |
|-------------------|-----------------|---------|
| Sanos | 0,067 | 0,77 |
| Enfermos | 0,165 | 0,47 |

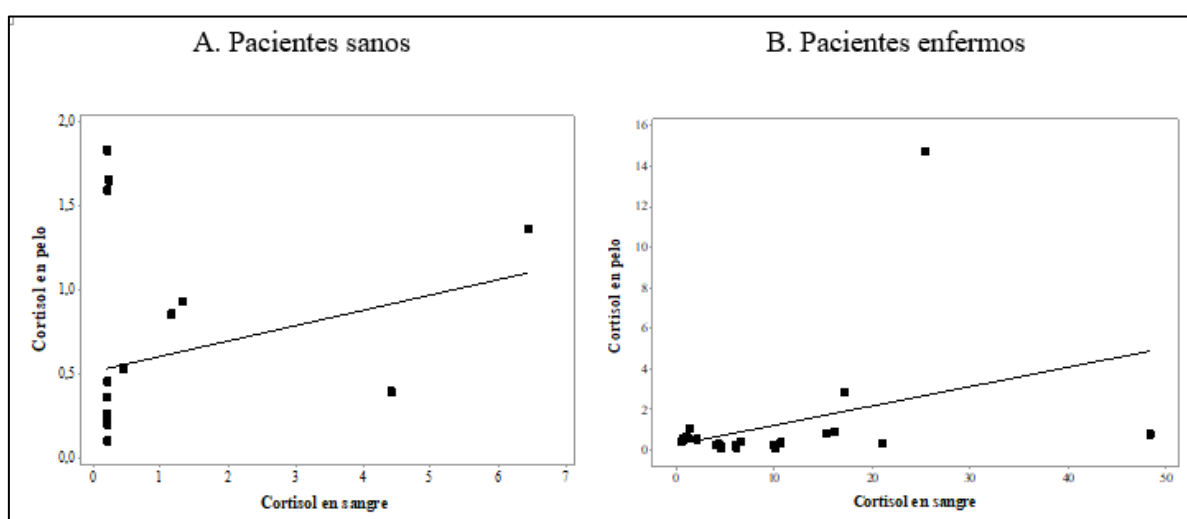


Figura 5. Gráfico de dispersión entre las concentraciones de cortisol sanguíneo y el cortisol en pelo. A la izquierda (A) se observa el gráfico correspondiente para el grupo de pacientes sanos, a la derecha (B) se observa el gráfico para el grupo de pacientes enfermos.

3.3.4 Comparación entre las concentraciones de cortisol en pelo en pacientes sanos y enfermos.

La diferencia media obtenida entre las concentraciones de cortisol en el pelo de ambos grupos fue de 0,65 ug/dL (IC95%: -0,792; 2,091); con un valor de T equivalente a 0,91 y un valor de p correspondiente a 0,365. Por lo tanto, ésta diferencia no se considera estadísticamente significativa ya que el valor de probabilidad asociada al estadístico T es muy

superior al nivel de error ($p > 0,05$). En la Figura 6 se observan gráficamente las puntuaciones medias de ambos grupos comparados, acá se incluyó la media corregida para el grupo de pacientes sanos.

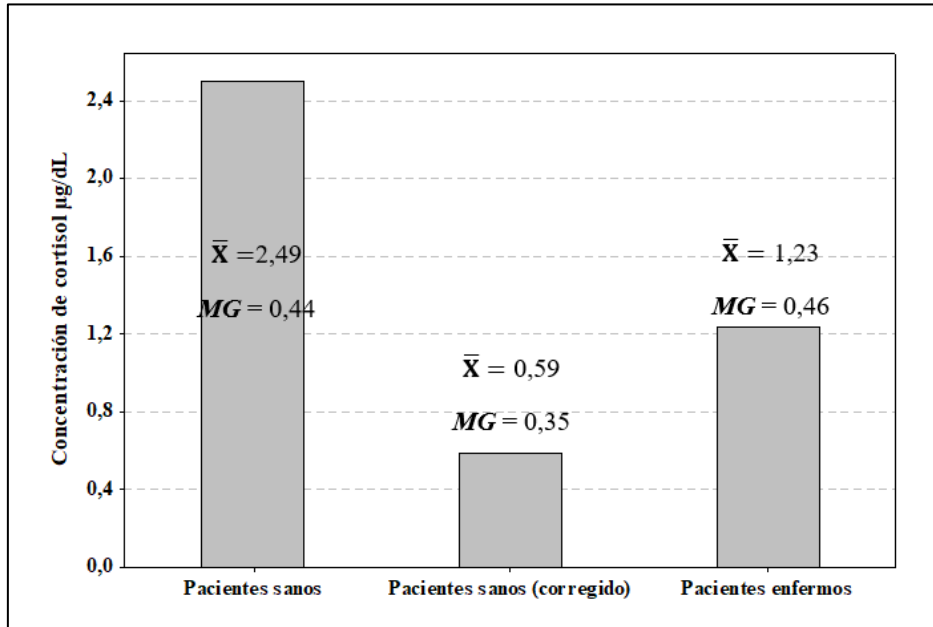


Figura 6. Comparación de las concentraciones medias de cortisol en pelo, de ambos grupos (\bar{X} : promedio, MG: media geométrica).

4. DISCUSIÓN

4.1 Características generales de los grupos

Aún no se ha comprobado, pero la literatura describe que podría existir una predisposición de género para el HAC canino, ya que en múltiples estudios se ha observado que un 63 a 76% de los caninos son hembras (Gallelli et al. 2010). Al analizar la composición de los grupos en cuestión, se observó que estos fueron conformados en su mayoría por caninos hembras; no obstante, en el caso del grupo control fue una cuestión meramente incidental ya que los animales fueron seleccionados al azar, el único requisito era que estuvieran sanos. Mientras que, en el caso de los pacientes enfermos, no fue así ya que estos se incluyeron en el estudio según los resultados de todos los análisis mencionados, por lo tanto el grupo de pacientes enfermos exhibió la situación que describe la literatura.

En el caso de la raza sí se observó una mayor frecuencia de caninos de la raza Schnauzer miniatura y French poodle en el grupo de caninos enfermos, pero hay que tomar en cuenta que realmente no existe una predilección racial para la enfermedad (Behrend 2015) y tanto caninos mixtos (SRD) como de raza pura tienen igual probabilidad de padecer la enfermedad (Bellumori et al. 2013). En realidad esto se debe a que ambas razas son de las que más frecuentemente se atienden en la clínica diaria.

Por otra parte, los promedios de edad para ambos grupos son muy similares, el promedio fue de 9,76 para los enfermos y ocho años para los sanos, o sea que se está hablando de caninos de mediana edad, lo cual coincide con la literatura, el HAC es una enfermedad propia de caninos de mediana edad o incluso mayores (Behrend 2015).

Cabe destacar que, con respecto a la sintomatología observada en los pacientes enfermos seleccionados, lo más frecuente fue la distensión abdominal, presencia de poliuria/polidipsia y problemas de piodermas recurrentes; todos estos síntomas son mencionados en la literatura como parte de los signos más comunes en dicha enfermedad (Nelson 2014; Behrend 2015).

4.2 Hematología y bioquímica sanguínea

En el caso de los pacientes enfermos (Tabla 3), los valores obtenidos para la fórmula blanca (conteo de leucocitos totales, valores absolutos de linfocitos, monocitos, basófilos y eosinófilos) coinciden con los valores hematológicos establecidos por Fielder (2018a). Sin embargo, al comparar con valores de referencia reportados en caninos del Valle Central (Pérez 2009), el promedio del conteo absoluto de monocitos, neutrófilos y basófilos obtenido en este estudio es mayor.

Según Gilor y Graves (2011), es frecuente encontrar cambios a nivel del diferencial leucocitario en caninos con HAC y normalmente lo que ocurre es un “leucograma de estrés” (linfopenia, neutrofilia, monocitosis) asociado con las concentraciones elevadas de cortisol en sangre; en este estudio sólo se observó monocitosis y neutrofilia. Es importante destacar que un leucograma de estrés, si bien está reportado en la literatura, no es un cambio clínico patológico específico del síndrome de Cushing y puede ocurrir secundario a cualquier otro proceso de enfermedad.

Además, con respecto a la fórmula roja, los valores observados en este estudio concuerdan con lo reportado por otros autores (Pérez 2009; Fielder 2018a), excepto por la concentración de hemoglobina, el conteo eritrocitario y el conteo de plaquetas; dichos valores

estaban levemente aumentados con respecto al rango reportado. No obstante estos incrementos son aceptables ya que Rose y colaboradores (2013) manifiestan que aproximadamente 75-80% de los perros que padecen HAC presentan un incremento en el conteo plaquetario y que la significancia de esta trombocitosis es desconocida, así mismo Gilor y Graves (2011) reportan una eritrocitosis leve en estos pacientes.

La mayoría de valores hematológicos obtenidos para el grupo control (Tabla 4) coinciden con los valores referenciales hematológicos de caninos en Costa Rica (Pérez 2009). Únicamente se observaron diferencias con respecto al conteo absoluto de neutrófilos, monocitos y basófilos, no obstante son incrementos leves sin hallazgos clínicos asociados.

Por otra parte, los paneles de bioquímica sanguínea obtenidos para ambos grupos de pacientes (Tabla 5), coinciden con los valores referenciales (Willard y Tvedten 2004; Fielder 2018b). Nelson (2014), asevera que en los pacientes con HAC, las anormalidades bioquímicas más frecuentes son el incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina sérica y concentración de colesterol elevada. En efecto, las únicas alteraciones que presentaron los pacientes de este estudio fueron un aumento moderado en la actividad de la fosfatasa alcalina sérica ($492,30 \pm 701$ U/L); actualmente está establecido que un 15% de los caninos con hiperadrenocorticismos presentan concentraciones de ALP sérico entre 250 a 300 mg/dL y un 75% presentan concentraciones mayores a 300 mg/dL (Behrend 2015).

4.3 Relación cortisol:creatinina en orina

La medición de la relación cortisol-creatinina en orina de los caninos es un indicador de los niveles de cortisol en sangre de varias horas. Es un test muy sensible y su mayor

utilidad consiste en descartar el diagnóstico de HAC, es decir, si la relación cortisol:creatinina es normal es muy poco probable el diagnóstico de hiperadrenocorticismo. No obstante, al ser una técnica altamente sensible pero de baja especificidad (Kooistra y Galac 2012), no es posible constatar la enfermedad en pacientes con valores elevados y por ende es obligatorio confirmar el diagnóstico mediante un test de supresión con dexametasona a dosis bajas o un test de estimulación con ACTH. Según la literatura hay diferentes protocolos, para efectos de este estudio se tomó una sola muestra de orina y se realizó solo una medición (ver apartado 2.4.3), en estos casos la sensibilidad y especificidad reportada para el diagnóstico de HAC varía de un 75-100% y 20-25%, respectivamente (Behrend et al. 2013).

Dependiendo del ensayo utilizado para medir cortisol urinario por parte del laboratorio puede haber una variación considerable en el intervalo de referencia para la relación cortisol:creatinina (Gilor y Graves 2011), por lo tanto no es recomendable comparar resultados entre diferentes laboratorios. En este caso el Laboratorio Diagnóstico Albéitar establece como intervalo de referencia positivo los valores mayores a $50 \times 10^{-6} \mu\text{mol/L}$, el grupo de pacientes enfermos generó un valor medio de $126,50 \times 10^{-6} \mu\text{mol/L}$, incluso con valores máximos de hasta $399 \times 10^{-6} \mu\text{mol/L}$ (Tabla 6); mientras que en el grupo de pacientes sanos se obtuvo un valor medio de $43,30 \times 10^{-6} \mu\text{mol/L}$. Cabe destacar que aunque fue un valor negativo, una parte de los resultados de estos pacientes se encontró dentro del intervalo de referencia positivo, lo cual confirma lo descrito anteriormente.

4.4 Mediciones hormonales en el pelo

4.4.1 Confiabilidad del método: linealidad, precisión y exactitud.

De acuerdo con los controles de calidad realizados durante el proceso de extracción y medición de cortisol en el pelo se confirmó que la técnica es completamente asequible, tal como se ha reportado en otros estudios (Accorsi et al. 2008; Corradini et al. 2013; Ouschan et al. 2013). Tras realizar una misma medición de una muestra de pelo canino en triplicado, se obtuvo un coeficiente de variación intra-ensayo de 7,8% en promedio, lo cual es un valor aceptable y confirma la repetibilidad de la técnica. Martin y Reale (2008), reportaron en su estudio sobre cortisol en el pelaje de ardillas, un coeficiente de variación de 7,3% y Gow y colaboradores (2010) afirman que en la mayoría de estudios llevados a cabo sobre el tema, dicho valor se ha reportado por debajo de un 11%. Aunado a esto, las diluciones seriadas de las extracciones del pelo y la muestra estandarizada de cortisol (MAC) presentaron un comportamiento paralelo, corroborando la similitud y linealidad entre ambas matrices.

Con respecto al porcentaje de recuperación hormonal, se obtuvo un valor promedio de 113%, con una gran variación entre los resultados (84% - 173%). Sauvé y colaboradores (2007) reportan en sus mediciones porcentajes de recuperación de 87,4%, 87,9% y 88,9%; mientras que en otras publicaciones (Thomson 2010) se registra una recuperación promedio de 109,5%.

Existen varios factores que pudieron influenciar considerablemente la concentración de cortisol en el pelo y que explicarían la variación observada en el porcentaje de recuperación hormonal. Estos factores son la tasa de recambio del pelo, el color/pigmento del pelo y los segmentos de pelo utilizados para la extracción.

Hay que tomar en cuenta que ambos grupos de pacientes fueron conformados sin ninguna predilección de raza, por lo tanto los colores de los pelajes van desde tonos uniformes negros, grises, dorados, hasta tonos completamente mixtos. Está comprobado que el tono del pelo es capaz de secuestrar de diferentes formas el cortisol acumulado (Bennett y Hayssen 2010). En su estudio los autores demostraron que en los perros, el pelo negro (eumelanina) presenta menor cortisol en comparación al pelo amarillo (feomelanina) y el pelo agutí es un intermedio entre estos tonos e incluso éstas diferencias se dan entre el cabello de un mismo individuo. En nuestro caso, no se registró esta información y por lo tanto no es posible establecer el grado de relevancia pero sí es un factor a considerar. De hecho, se ha descrito ampliamente en la literatura, Kidwell y Smith (2007) explican que en el campo de las drogas forenses, el color del cabello ha sido identificado como un factor importante que influye en la incorporación y retención de drogas y otros xenobióticos en el cabello.

Otro factor que puede influir es la distribución del cortisol a lo largo de las hebras de pelo. Por ejemplo, en los macacos Rhesus no existe diferencia con respecto a la concentración de cortisol según el segmento de pelo tomado (Davenport et al. 2006); sin embargo, en los caninos no es así y los segmentos distales presentan una mayor concentración de cortisol acumulado, mientras que en los segmentos de pelo más cercanos a la piel la concentración de cortisol es menor (Bennett y Hayssen 2010). Ahora bien, al momento de conformar cada muestra de pelo, el pelo se cortó en pequeños segmentos y se tomó una porción equivalente a 150 mg, así que la porción podría incluir segmentos de la parte proximal y de la parte distal de la hebra de pelo, o solo de una de ellas; e indiscutiblemente esto afectaría la concentración de cortisol extraída.

Finalmente, pero no menos importante, es la tasa de recambio y crecimiento del pelo. En los caninos el pelo crece y cuando alcanza cierta longitud que está determinada por el perfil genético individual, el crecimiento se detiene. Dicho factor es sumamente complejo ya que está ligado a diversas condiciones: las variaciones raciales, el clima y ciclos hormonales pueden generar diferencias en los patrones de crecimiento y muda del pelo (Macbeth et al. 2010); adicionalmente los altos niveles de glucocorticoides (en nuestro caso cortisol) reducen la tasa de crecimiento del pelo (Miller et al. 2013). Es claro que todos los pacientes utilizados difieren entre sí debido a este factor, independientemente del grupo en que fueron ubicados, es imposible determinar cómo cada una de estas variaciones está presente en los caninos seleccionados pero es innegable que representa un factor de variación consistente.

En resumen, todos los factores mencionados anteriormente generan variaciones en las concentraciones de cortisol presentes en el pelo y por ende generan diferencias en los resultados obtenidos del proceso de extracción, que siempre deben ser tomados en cuenta al analizar los datos obtenidos. No obstante, el coeficiente de variación, el paralelismo de las diluciones y el porcentaje de recuperación observados, demostraron que el pelo canino contiene concentraciones de cortisol cuantificables y que el método en sí es fiable y reproducible.

4.4.2 Valores de cortisol obtenidos en el pelo y comparación entre ambos grupos de pacientes.

Las concentraciones de cortisol promedio en pelo obtenidas en este estudio no coinciden en su totalidad con los hallazgos de otros estudios en los que han utilizado

protocolos semejantes (Bennett y Hayssen 2010; Corradini et al. 2013 y Ouschan et al. 2013), nuestros promedios son más altos o más bajos, dependiendo de la literatura referida.

Por ejemplo, en el caso de los pacientes control se obtuvo una concentración media (corregida) de 0,35 µg/dL, Corradini y colaboradores (2013) reportan un promedio de 0,128 µg/dL y Ouschan y colaboradores (2013) reportan un promedio de 0,15 µg/dL. Podría decirse que nuestros resultados son mayores; sin embargo, Bennett y Hayssen (2010) reportan una concentración promedio de 1,26 µg/dL y Bryan y colaboradores (2013) reportan 1,16 µg/dL, igualmente para caninos sanos, en cuyo caso son valores más altos con respecto a nuestros resultados. Hay que tomar en cuenta que las investigaciones realizadas en animales, que involucran medición de cortisol en pelo, son relativamente recientes, el primer estudio de este tipo fue ejecutado por Koren y colaboradores (2002) en el cual se determinaron concentraciones de cortisol y testosterona en damanes roqueros (*Procapra capensis*) y los estudios que implican caninos son aún más recientes, datan a partir del 2008; por lo tanto, realmente no existen valores de referencia establecidos.

En contraparte, la concentración media de cortisol en pelo que obtuvimos para el grupo de pacientes enfermos fue de 0,46 µg/dL, en este caso concuerda con los valores reportados en la literatura, Corradini y colaboradores (2013) presentan en su estudio un promedio de 0,453 µg/dL, mientras que Ouschan y colaboradores (2013) reportan un promedio de 0,56 µg/dL.

Al cotejar las concentraciones medias de ambos grupos, no fue posible establecer una diferencia estadísticamente significativa entre estas ($p = 0,365$), aun cuando la concentración de cortisol en pelo de perros con HAC fue ligeramente más alta en comparación a los perros sanos. Esto tiene tres posibles explicaciones: i) al analizar las concentraciones individuales de

los pacientes hay cierto grado de traslapo entre los grupos y/o ii) al ser una muestra pequeña, se asocia a una baja potencia de estudio y no es posible detectar diferencias pequeñas; o bien iii) realmente no existe una diferencia entre los grupos.

Aunque la diferencia entre las concentraciones de cortisol en pelo de los grupos no fue estadísticamente significativa; es válido reconocer que la concentración de cortisol en el pelo de perros con hiperadrenocorticismismo fue ligeramente mayor en comparación a los perros sanos, y parte de nuestros hallazgos coinciden con las investigaciones de Corradini y colaboradores (2013) y Ouschan y colaboradores (2013) en caninos, y Thomson y colaboradores (2010) en humanos; y en el caso de estos estudios las diferencias sí fueron significativas.

En función de esto, nuestros resultados no son totalmente concluyentes debido a las razones expuestas anteriormente, pero resulta lógico asegurar que las concentraciones elevadas de cortisol en el pelo de caninos, son la consecuencia refleja de un aumento en la secreción de cortisol endógeno.

4.4.3 Relación entre los valores de cortisol sérico y los valores de cortisol en pelo y sus respectivos coeficientes de correlación.

El cortisol basal corresponde a la primera medición que se realiza, previo a la aplicación de la dexametasona. Este valor por sí solo no es útil como prueba diagnóstica, no obstante es necesario como valor de referencia y para posteriormente, compararlos con los valores de cortisol obtenidos en el pelo.

Su medición no posee valor diagnóstico per se, ya que está dada por la secreción pulsátil de ACTH, resultando en concentraciones variables de cortisol a lo largo del día. Está comprobado que en caninos con HAC la concentración media diaria de cortisol puede estar elevada (Behrend 2015), pero es totalmente factible que presenten concentraciones dentro del rango de referencia; o incluso puede ocurrir que caninos sanos o con enfermedades no-adrenales presenten concentraciones basales elevadas.

La concentración de cortisol varía según el ensayo y el laboratorio en que se realice, por lo que cada laboratorio establece sus valores de referencia (Behrend et al. 2013). Según el Laboratorio de Endocrinología y Biotecnología Reproductiva la concentración de cortisol sérico basal oscila entre 0,44 - 3,33 $\mu\text{g/dL}$, al analizar los promedios de concentración obtenidos para ambos grupos se observó que los pacientes sanos presentaron un promedio mucho más bajo y dentro del rango de referencia (1,01 $\mu\text{g/dL}$) en comparación al grupo de pacientes enfermos (4,53 $\mu\text{g/dL}$). Empero, al analizar los valores de manera individual y en detalle se observó que, si bien los valores del grupo control en general fueron más bajos, también hubo pacientes con hiperadrenocorticismos que presentaron valores basales equivalentes y dentro del rango referencial; tal como se expuso anteriormente. Lo cual ejemplifica que la concentración de cortisol sérico basal es altamente variable, independientemente de si es un canino sano o con hiperadrenocorticismos.

Ahora, al comparar las concentraciones de cortisol sérico y de cortisol en pelo en cada uno de los caninos, se obtuvieron resultados muy distintos para los grupos. Se presuponía que ambas matrices pudieran estar relacionadas, tanto en los pacientes sanos como en los enfermos, debido a que el cortisol depositado en el pelo proviene principalmente de la difusión

pasiva (o activa) a través de los capilares sanguíneos hacia el folículo piloso (Gow et al. 2010); sin embargo, el comportamiento observado fue disímil.

El grupo control mostró una diferencia media de apenas 1,02 $\mu\text{g/dL}$, no obstante sí fue una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,018$); o sea que las concentraciones de cortisol en pelo de caninos sanos sí varían con respecto a las concentraciones séricas. Por otra parte, no se logró establecer una correlación estadísticamente significativa entre ambas concentraciones (Rho de Spearman = 0,067, $p = 0,77$).

En contraste, en el grupo de pacientes con HAC, se observó una diferencia media bastante notable de 7,37 $\mu\text{g/dL}$, en este caso las concentraciones más altas se detectaron en el suero, y la diferencia fue estadísticamente significativa ($p = 0,006$). De igual forma, no se logró establecer una correlación estadísticamente significativa entre ambas concentraciones (Rho de Spearman = 0,165; $p = 0,47$).

Tal disparidad entre ambos grupos puede fundamentarse en que, aun cuando la secreción de cortisol presenta un patrón episódico, en caninos sanos dicha secreción es normal, pero en los pacientes con HAC ocurre algo distinto. En ellos, la concentración de cortisol circulante es anormalmente elevada; sin embargo, debido a este patrón episódico de secreción, al tomar una muestra aleatoria, esta puede variar considerablemente y estar o no aumentada (Behrend 2015); por lo tanto no es posible observar un patrón similar entre los grupos.

De igual forma ocurre con el estadístico de correlación, no es posible establecer alguna asociación entre las concentraciones de cortisol medidas en el pelo y en suero debido a que estas últimas fluctúan de manera importante, mientras que las concentraciones de cortisol

obtenidas del pelo evidencian actividad adrenocortical a largo plazo, durante semanas o meses incluso (Meyer y Novak 2012) y por ende menos fluctuante.

Al comparar nuestros resultados con otros estudios que examinan la relación entre el cortisol del pelo y el cortisol de otras muestras, los hallazgos son conflictivos. Por ejemplo, Bryan y colaboradores (2013), no encontraron evidencia de correlación entre el cortisol medido en pelo, en heces y en la saliva de caninos; a diferencia de Accorsi y colaboradores (2008) o Bennett y Hayssen (2010) que sí determinaron correlaciones significativas entre las muestras. A pesar de esto, resulta categórico que los niveles de cortisol en sangre, suero o incluso saliva son muestras muy puntuales pero son sumamente variables (Bennett y Hayssen 2010) ya que se ven afectadas por múltiples condiciones como la ingesta de comida, los patrones circadianos o el estrés momentáneo; mientras que muestras como el pelo son menos sensibles a estos factores y proveen una medición de cortisol basal a largo plazo (Sauvé et al. 2007; Kirschbaum et al. 2009; Fourie y Bernstein 2011).

5. CONCLUSIONES

- 5.1 De acuerdo con los controles de calidad ejecutados durante el proceso, se logró implementar un protocolo de extracción de cortisol en pelo y su posterior medición a través de un inmunoensayo enzimático, por lo tanto son técnicas factibles; empero la medición de cortisol en pelo, de momento no puede utilizarse como técnica diagnóstica del HAC, debido a su baja especificidad.
- 5.2 Según los resultados obtenidos, es posible medir concentraciones de cortisol en pelo y el protocolo de extracción desarrollado es totalmente viable. Dicha medición se realizó de manera eficaz a través de un inmunoensayo automatizado (AIA-360[®]), la mayoría de estudios previos han utilizado kits comerciales que requieren una preparación manual, que puede acarrear errores de operario que son minimizadas al ser éste un método automático.
- 5.3 Se establecieron promedios de cortisol en pelo, tanto de caninos sanos como enfermos con síndrome de Cushing, los cuales son similares a los valores reportados en la literatura para otros países. Dichos valores corresponden al primer reporte de concentraciones de cortisol en pelo de caninos en Costa Rica; no obstante, aún no deben ser utilizados como rangos de referencia, ya que para ello se requiere incrementar el número de muestras analizadas.

6. RECOMENDACIONES

6.1 Hay diversos factores que pudieron interferir con los resultados obtenidos; tales como la falta de evaluación del color de los pelos muestreados, la tasa de crecimiento y recambio del pelo. Tales factores varían considerablemente de un perro a otro, por lo que resultaría valioso para eventuales estudios considerar esos datos de manera previa.

6.2 Es necesario realizar estudios con muestras de población más amplias, para aumentar la potencia del estudio y así determinar si realmente hay o no diferencias estadísticamente significativas entre caninos sanos y caninos con HAC.

6.3 Realizar estudios en los que se comparen matrices similares, por ejemplo medición de cortisol en orina (muestras de 24 horas) o incluso heces. Podría ser factible encontrar relación entre éstas y el pelo, ya que también abarcan lapsos más prolongados, en contraste con el cortisol sérico.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Accorsi, P. A., E. Carloni, P. Valsecchi, R. Viggiani, M. Gamberoni, C. Tamanini & E. Seren. 2008. Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155: 398–402.
- Behrend, E. N. 2015. Canine hyperadrenocorticism. p. 377-443. *In* E. C. Feldman, R. W. Nelson, C. E. Reusch & J. C. R. Scott-Moncrieff. *Canine and feline endocrinology*. 4. ed. Elsevier, USA.
- Behrend, E. N., H. S. Kooistra, R Nelson, C.E. Reusch & J. C. Scott-Moncrieff. 2013. Diagnosis of spontaneous canine hyperadrenocorticism: 2012 ACVIM Consensus Statement (Small Animal). *J. Vet. Intern. Med.* 27: 1292-1304.
- Bellumori, T. P., T. R Famula, D. L Bannasch, J. M. Belanger & A. M. Oberbauer. 2013. Prevalence of inherited disorders among mixed-breed and purebred dogs: 27,254 cases (1995-2010). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 242: 1549-1555.
- Bennett, A. & V. Hayssen. 2010. Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domest. Anim. Endocrinol.* 39: 171-180.
- Bishop, B. & P. Lathan. 2015. Canine hyperadrenocorticism. *Veterinary Focus* 25 (1): 46-54.

- Bryan, H. M., A. G. Adams, R. M. Invik, K. E. Wynne-Edwards & J. Smits. 2013. Hair as a meaningful measure of baseline cortisol levels over time in dogs. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 52 (2): 189-196.
- Corradini, S., P. A. Accorsi, A. Boari, V. Beghelli, M. Mattioli, P. Famigli-Bergamini & F. Fracassi. 2013. Evaluation of hair cortisol in the diagnosis of hypercortisolism in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 27: 1268-1272.
- Davenport, M. D., S. Tiefenbacher, C. K. Lutz, M. A. Novak & J. S. Meyer. 2006. Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147: 255–261.
- Dreschel, N. A. & D. A. Granger. 2009. Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. *Horm. Behav.* 55: 163–168.
- Duran, M. C., D. M. Janz, C. L. Waldner, J. R. Campbell & F. J. Marques. 2017. Hair cortisol concentration as a stress biomarker in horses: associations with body location and surgical castration. *J. Equine Vet. Sci.* 55: 27–33.
- Fielder S. E. 2018a. Hematologic reference ranges. [Internet]. MSD Veterinary Manual. Merck Sharp & Dohme Corp. (USA). Disponible en: <https://www.msdveterinary.com/special-subjects/reference-guides/hematologic-reference-ranges> (Consulta: 02 de agosto de 2018).

Fielder S. E. 2018b. Serum biochemical reference ranges. [Internet]. MSD Veterinary Manual. Merck Sharp & Dohme Corp. (USA). Disponible en: <https://www.msdrvetermanual.com/special-subjects/reference-guides/serum-biochemical-reference-ranges> (Consulta: 02 de agosto de 2018).

Fourie N. H. & R. M. Bernstein. 2011. Hair cortisol levels track phylogenetic and age-related differences in hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis activity in nonhuman primates. *Gen Comp Endocrinol* 174: 150–155.

Galac, S., C. E. Reusch, H. S. Kooistra & A. Rijnberk. 2010. Adrenals. p. 93-134. *In* A. Rijnberk & H. S. Kooistra (eds.). *Clinical endocrinology of dogs and cats*. 2. ed. Schlütersche, Germany.

Gallelli, M. F., M. Cabrera & V. Castillo. 2010. A comparative study by age and gender of the pituitary adenoma and ACTH and alpha-MSH secretion in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Res. Vet. Sci.* 88: 33-40.

Gilor, C. & T. K. Graves. 2011. Interpretation of laboratory tests for canine cushing's syndrome. *Top Companion Anim Med.* 26 (2): 98-108.

Goff, J. P. 2015. The endocrine system. p. 632-636. *In* W. O. Reece (ed.). *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. 13. ed. Wiley Blackwell, USA.

- Gow, R., S. Thomson, M. Rieder, S. Van Uum & G. Koren. 2010. An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications. *Forensic Sci. Int.* 196: 32–37.
- Kidwell, D. A. & F. P. Smith. 2007. Passive exposure, decontamination procedures, cut-offs and bias: pitfalls in the interpretation of hair analysis results for cocaine use. p. 25–72. *In* P. Kintz (ed.). *Analytical and practical aspects of drug testing in hair*. 1. ed. CRC, Boca Raton, FL.
- Kirschbaum, C., A. Tietze, N. Skoluda & L. Dettenborn. 2009. Hair as a retrospective calendar of cortisol production-increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology* 34: 32–37.
- Klein, B. G. 2014. *Cunningham: Fisiología veterinaria*. 5. ed. Elsevier, España.
- Kooistra, H. S & S. Galac. 2012. Recent advances in the diagnosis of cushing's syndrome in dogs. *Topics in Companion An Med.* 27: 21-24.
- Koren, L., O. Mokady, T. Karaskov, J. Klein, G. Koren & E. Geffen. 2002. A novel method of using hair for determining hormonal levels in wildlife. *Anim. Behav.* 63: 403–406.
- Macbeth, B. J., M. R. L. Cattet, G. B. Stenhouse, M. L. Gibeau & D. M. Janz. 2010. Hair cortisol concentration as a noninvasive measure of long-term stress in free-ranging

- grizzly bears (*Ursus arctos*): considerations with implications for other wildlife. *Can. J. Zool.* 88: 935–949.
- Manenschijn, L., J. W. Koper, S. W. Lamberts & E. F. Van Rossum. 2011. Evaluation of a method to measure long term cortisol levels. *Steroids* 76: 1032-1036.
- Martin, J & D. Reale. 2008. Animal temperament and human disturbance: implications for the response of wildlife to tourism. *Behav. Process.* 77: 66–72.
- Meij, B. P., H. S. Kooistra & A. Rijnberk. 2010. Hypothalamus-pituitary system. p. 13-45. *In* A. Rijnberk & H. S. Kooistra (eds.). *Clinical endocrinology of dogs and cats*. 2. ed. Schlütersche, Germany.
- Melián, C., M. D. Pérez-Alenza & M. E. Peterson. 2010. Hyperadrenocorticism in dogs. p. 1816-1840. *In* S. J. Ettinger & E. C. Feldman, (eds.). *Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and the cat*. 7. ed. Vol 2. Elsevier, Canada.
- Meyer J. S. & M. A. Novak. 2012. Minireview. Hair cortisol: a novel biomarker of hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity. *Endocrinology*. 153 (9): 4120–4127.
- Miller W. H, C. E. Griffin & K. L. Campbell. 2013. Structure and function of the skin. p. 1-56. *In*: W. H Miller, C. E. Griffin & K. L. Campbell. *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*. 7. ed. Saunders: Elsevier, USA.

- Minitab Inc. 2018. Minitab 18[®] Statistical Software. [Internet]. USA. Disponible en: <http://www.minitab.com/es-mx/products/minitab/> (Consulta: 10 de agosto de 2018)
- Nelson, R. W. 2014. Disorders of the adrenal gland. p. 824-844. *In* R. W. Nelson & C. G. Couto (eds.). Small animal internal medicine. 5. ed. Elsevier, Canada.
- Ouschan, C., A. Kuchar & E. Mostl. 2013. Measurement of cortisol in dog hair: a noninvasive tool for the diagnosis of hypercortisolism. *Vet. Dermatol.* 24: 428-e94.
- Pérez, N. 2009. Determinación de la prevalencia del grupo sanguíneo DEA 1.1 y valores hematológicos de caninos (*Canis familiaris*) en el Valle Central de Costa Rica. Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria. Universidad Nacional, Heredia, C.R.
- Rose, L., M. Dunn & C. Bédard. 2013. Effect of Canine Hyperadrenocorticism on coagulation parameters. *J. Vet. Intern. Med.* 27: 207-211.
- Sauvé, B., G. Koren, G. Walsh, S. Tokmakejian & S. Van Uum. 2007. Measurement of Cortisol in human hair as a biomarker of systemic exposure. *Clin. Invest. Med.* 30 (5): E183–E191.
- Stephen, J. M. & R. A. Ledger. 2006. A longitudinal evaluation of urinary cortisol in kenneled dogs, *Canis familiaris*. *Physiol. Behav.* 87: 911–916.

Thomson, S. 2008. Hair cortisol as a historical record of systemic hormone exposure, Graduate Program in Pharmacology, University of Western Ontario, London, Canada, Masters of Science.

Thomson, S., G. Koren, L. A. Fraser, M. Rieder, T. C. Friedman & S. H. Van Uum. 2010. Hair analysis provides a historical record of cortisol levels in Cushing's syndrome. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* 118: 133–138.

Willard, M. & H. Tvedten. 2004. *Diagnóstico clínico patológico práctico en los pequeños animales.* 4. ed. Intermédica, Buenos Aires, Argentina.

Zur, G. & S. D. White. 2011. Hyperadrenocorticism in 10 dogs with skin lesions as the only presenting clinical signs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 47 (6): 419- 427.

8. ANEXOS

ANEXO 1. CARTA DE ACEPTACIÓN CLÍNICA VETERINARIA PET CENTER

Heredia, 25 de agosto, 2016

Señores

Comisión de Trabajos Finales


Universidad Nacional

Presente

Estimados señores:

Yo Gustavo Adolfo Chacón Chaves, cédula N° 108840603, propietario de la Clínica Veterinaria Pet Center, hago constar mediante esta carta, mi aceptación para que la estudiante Hilary López Fonseca, cédula 113930228, asista a la clínica para llevar a cabo su trabajo final de graduación. Las responsabilidades de dicha estudiante corresponderán a participar en el abordaje de los pacientes, toma de todas las muestras requeridas para análisis laboratorial, procesamiento de dichas muestras, e interpretación de los resultados obtenidos en estos análisis.

Atentamente,



Dr. Gustavo Adolfo Chacón Chaves

ANEXO 2. FÓRMULA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

CLÍNICA VETERINARIA PET CENTER

FÓRMULA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Proyecto de graduación “Implementación de un método alternativo no invasivo para el diagnóstico de hiperadrenocorticismismo canino mediante la cuantificación de cortisol en pelo”

A. PROPÓSITO DEL PROYECTO:

Este proyecto forma parte del Trabajo Final de Graduación de la estudiante de Medicina Veterinaria Hilary López Fonseca, el cual se realiza en conjunto con el Laboratorio de Endocrinología y Biotecnología Reproductiva de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica. Consiste en tomar muestras de pelo de caninos, así como muestras de sangre y orina. Dichas muestras serán utilizadas para medir niveles de cortisol y otros analitos.

B. PROCEDIMIENTOS A REALIZAR:

Rasurado del pelo: Se tomará una pequeña muestra de pelo, por medio de rasurado eléctrico, a nivel de uno de los miembros anteriores, dicho procedimiento no implica

ningún dolor para el animal. Igualmente, el rasurado del pelo es necesario para tomar las muestras sanguíneas necesarias.

Toma de muestras de sangre y orina: las muestras de sangre se tomarán por medio de un catéter intravenoso y las muestras de orina serán tomadas por medio de punción vesical, guiada por ultrasonido.

C. RIESGOS PARA LA MASCOTA:

Los procedimientos previamente descritos no comprometen la salud de la mascota y no poseen efectos secundarios adversos. Además, todos son procedimientos diagnósticos que se realizan de manera rutinaria en la clínica.

D. Antes de dar su autorización para este estudio, usted debe haber hablado con el médico veterinario a cargo (Dr. Gustavo Adolfo Chacón) y/o la estudiante Hilary López Fonseca y ellos deben haber contestado satisfactoriamente todas sus consultas.

E. Su participación en este estudio es voluntaria, tiene el derecho de negarse a participar o a discontinuar su participación en cualquier momento, sin que esto afecte el procesamiento de las muestras recibidas previamente y el uso de los resultados obtenidos.

F. No perderá ningún derecho legal por firmar este documento, además su participación es confidencial.

CONSENTIMIENTO

He leído y entiendo toda la información descrita en esta fórmula, previo a firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, declaro que he entendido y accedo a que mi mascota participe como sujeto de investigación en este proyecto y autorizo que se tomen todas las muestras que sean necesarias:

Nombre, cédula y firma del encargado de la mascota

Nombre, cédula y firma del médico veterinario que solicita el consentimiento

ANEXO 3. Características generales de los pacientes con HAC

| Nombre | Edad (años) | Género | Estatus | Raza |
|---------------|--------------------|---------------|----------------|----------------------|
| Bebé | 10 | Macho | Esterilizado | Dachshund pelo corto |
| Brandy | 11 | Hembra | Esterilizada | Schnauzer miniatura |
| Canela | 9 | Hembra | Entera | SRD |
| Cookie | 14 | Hembra | Esterilizada | Schnauzer miniatura |
| Coqueta | 12 | Hembra | Esterilizada | Cocker spaniel |
| Lina | 13 | Hembra | Esterilizada | French poodle |
| Lola | 10 | Hembra | Esterilizada | Schnauzer miniatura |
| Lulú | 8 | Hembra | Esterilizada | SRD |
| Merry | 10 | Hembra | Entera | Chihuahua |
| Minie | 6 | Hembra | Entera | Chihuahua |
| Misha | 10 | Hembra | Esterilizada | Maltés |
| Rayito | 10 | Macho | Esterilizado | Pinscher miniatura |
| Sassy | 8 | Hembra | Entera | Schnauzer miniatura |
| Sofy | 9 | Hembra | Entera | Schnauzer miniatura |
| Sussy | 12 | Hembra | Esterilizada | French poodle |
| Toby | 9 | Macho | Esterilizado | French poodle |
| Toby | 9 | Macho | Esterilizado | Dachshund pelo corto |
| Toby | 9 | Macho | Esterilizado | French poodle |
| Tommy | 6 | Macho | Esterilizado | Schnauzer miniatura |
| Topsy | 14 | Hembra | Esterilizada | Schnauzer miniatura |
| Tutti | 8 | Hembra | Esterilizada | SRD |

ANEXO 4. Características generales de los pacientes sanos

| Nombre | Edad (años) | Género | Estatus | Raza |
|---------------|--------------------|---------------|----------------|---------------------|
| Agatha | 10 años | Hembra | Esterilizada | Boston terrier |
| Annie | 5 años | Hembra | Esterilizado | SRD |
| Blow | 11 años | Hembra | Entera | Golden retriever |
| Clarita | 9 años | Hembra | Esterilizada | French poodle |
| Esmeralda | 11 años | Hembra | Esterilizada | Boston terrier |
| Gomita | 3 años | Hembra | Esterilizada | French poodle |
| Lilly | 7 años | Hembra | Esterilizada | French poodle |
| Meche | 9 años | Hembra | Esterilizada | SRD |
| Milo | 9 años | Macho | Esterilizado | Yorkshire terrier |
| Mishka | 10 años | Hembra | Esterilizada | Husky siberiano |
| Misty | 14 años | Hembra | Esterilizada | Schnauzer miniatura |
| Nala | 3 años | Hembra | Esterilizada | Maltés |
| Nana | 9 años | Hembra | Esterilizada | SRD |
| Niko | 9 años | Macho | Esterilizado | Beagle |
| Otto | 2 años | Macho | Entero | Golden retriever |
| Paulina | 10 años | Hembra | Esterilizada | Golden retriever |
| Pimienta | 2 años | Hembra | Esterilizada | SRD |
| Pity | 8 años | Hembra | Esterilizada | French poodle |
| Sussy | 12 años | Hembra | Esterilizada | Schnauzer miniatura |
| Tomás | 4 años | Macho | Entero | SRD |
| Tommy | 11 años | Macho | Entero | Chow chow |

ANEXO 5. Protocolo de extracción de cortisol a partir de pelo

El protocolo de extracción implementado en el pelo se fundamentó en las metodologías descritas por Corradini et al. (2013) y Ouschan y colaboradores (2013); y se detalla a continuación:

1. Tomar la muestra de pelo completa y cortarla en segmentos de uno a tres milímetros de longitud.
2. Pesar 150 mg de la muestra en una balanza electrónica y colocarlos en un tubo de 50 mL. Rotular el tubo con el nombre del individuo.
3. Para lavar la muestra, se deben añadir diez mililitros de MeOH y colocar en un agitador vórtex a velocidad intermedia, durante tres minutos.
4. Centrifugar el tubo durante cinco minutos a 4000 rpm, a temperatura ambiente (25°C).
5. Separar el líquido sobrenadante y descartarlo. Colocar el tubo en el Thermomixer (Eppendorf®) a temperatura ambiente (25°C) bajo un flujo constante de aire, durante el tiempo que sea necesario. Al finalizar, la muestra de pelo debe estar completamente seca.
6. Agregar a la muestra seca diez mililitros de MeOH y agitar vigorosamente durante dos minutos. Dejar reposar durante 16 horas, completamente cerrado y no expuesto a la luz.
7. Agitar vigorosamente durante dos minutos. Posteriormente, centrifugar la muestra durante cinco minutos a 4000 rpm, a temperatura ambiente.

8. Separar el sobrenadante de manera cuidadosa y colocarlo en otro tubo de 50 mL y rotular debidamente. Descartar el tubo anterior.
9. Colocar el tubo con el sobrenadante en el Thermomixer (Eppendorf®) a 60°C, bajo un flujo de aire constante; hasta secar por completo el sobrenadante.
10. Añadir al extracto obtenido 250 µL de buffer de dilución y agitar vigorosamente durante dos minutos.
11. Colocar el tubo en un sonicador Branson® durante 20 minutos.
12. Centrifugar el tubo durante cinco minutos a 5000 rpm a temperatura ambiente.

ANEXO 6. Media corregida de la concentración de cortisol en pelo de los pacientes sanos

Esta es la concentración media corregida de la concentración de cortisol en el pelo de los caninos sanos. Se considera “corregida” porque en este caso se eliminó un valor atípico, o sea que se calculó la media y demás estadística descriptiva correspondiente en función de 20 observaciones.

| Grupo de animales | Media ($\mu\text{g/dL}$) | Desviación estándar | Mediana | Rango |
|--------------------------|--|----------------------------|----------------|--------------|
| Sanos | 0,35 | 0,58 | 0,37 | 0,10 - 1,83 |