

Cortisol concentration as a biomarker of animal welfare in equine herds exposed to social stimuli

Concentración de cortisol como bioindicador de bienestar animal en la manada equina expuesta a estímulos sociales

Autores:

Padrón-Pesantez, María Eulalia
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA
Estudiante de la Carrera de Medicina Veterinaria
Cuenca-Ecuador



maria.padron.20@est.ucacue.edu.ec



<https://orcid.org/0009-0004-7008-3814>

Ing. Maldonado-Cornejo, Manuel Esteban
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA
Docente
Cuenca-Ecuador



mmaldonadoc@ucacue.edu.ec



<https://orcid.org/0000-0002-1570-2280>

Dr. Castillo-Hidalgo, Edy Paul, MsC
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA
Docente
Cuenca – Ecuador



ecastilloh@ucacue.edu.ec



<https://orcid.org/0000-0001-5311-5002>

Fechas de recepción: 25-OCT-2024 aceptación: 06-NOV-2024 publicación: 15-DIC-2024



<https://orcid.org/0000-0002-8695-5005>

<http://mqrinvestigar.com/>



Resumen

Los equinos son animales altamente sensibles al estrés, por lo que cualquier actividad en torno a ellos puede desencadenar en una liberación de cortisol plasmático, y comprometer su bienestar. Las investigaciones sobre este tema se han enfocado en el utilitarismo de estos animales, lo que involucra su explotación fuera de sus capacidades naturales, comprometiendo su salud. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la concentración sérica de cortisol mediante la técnica de ELISA cuantitativa (Accubind), en una manada equina utilizada en hipoterapia, frente a una estabulada de la misma locación, durante distintos momentos del día como bioindicador de bienestar animal, para lo cual se seleccionaron 8 equinos machos castrados pertenecientes a una misma manada, de los cuales 4 trabajaban en hipoterapia (grupo experimental) y 4 no (grupo control). A estos se les extrajo muestras sanguíneas durante dos momentos del día en 5 oportunidades, obteniéndose un total de 80 muestras. El rango de cortisol en el grupo experimental fue $10.97 \pm 5.73 \mu\text{g/dL}$ y para el grupo control fue $9.03 \pm 3.99 \mu\text{g/dL}$ ($p \geq 0.05$). Al comparar la interacción del ritmo circadiano (mañana y tarde) entre grupos, se encontró diferencias significativas entre grupos ($p < 0.05$), donde los caballos del Control ($10.21 \mu\text{g/dL}$) e hipoterapia ($11.94 \mu\text{g/dL}$) inician con valores similares, sin embargo, los del control al finalizar el día disminuyen ($7.84 \mu\text{g/dL}$) su concentración, empero de los de hipoterapia ($9.99 \mu\text{g/dL}$). Los resultados indican que la hipoterapia altera los niveles de cortisol, posiblemente debido al esfuerzo físico que implica en los animales comprometiendo su ritmo circadiano.

Palabras claves: ELISA; Estabulada; Hipoterapia; Ritmo Circadiano



Abstract

Equines are highly sensitive to stress, meaning that any activity around them can trigger a release of plasma cortisol, thus impacting their well-being. Research on this subject has primarily focused on the utilitarian aspect of these animals, which often involves exploiting them beyond their natural capacities and consequently compromising their health. This study aimed to determine serum cortisol levels using the quantitative ELISA (Accubind) technique in a herd of horses used for equine-assisted therapy, compared to a stable group at the same location, measured at different times of the day as a bioindicator of animal welfare. For this purpose, eight castrated male horses from the same herd were selected, with four participating in equine therapy (experimental group) and four not (control group). Blood samples were drawn twice daily over five different days, resulting in a total of 80 samples. The cortisol range in the experimental group was $10.97 \pm 5.73 \mu\text{g/dL}$, while in the control group, it was $9.03 \pm 3.99 \mu\text{g/dL}$ ($p \geq 0.05$). A significant difference was found between groups when comparing the interaction of circadian rhythm (morning and afternoon) ($p < 0.05$). Horses in the control ($10.21 \mu\text{g/dL}$) and therapy groups ($11.94 \mu\text{g/dL}$) began with similar values; however, the control group showed a decrease ($7.84 \mu\text{g/dL}$) in cortisol levels by the end of the day, unlike the therapy group ($9.99 \mu\text{g/dL}$). These results indicate that equine therapy affects cortisol levels, possibly due to the physical effort involved, which may disrupt the animals' circadian rhythm.

Keywords: ELISA; Stabled; Equine-Assisted Therapy; Circadian Rhythm



Introducción

El creciente uso de la equinoterapia resalta no solo su valor terapéutico para los humanos, sino también la necesidad de evaluar el bienestar de los caballos involucrados. Estos animales, al estar sujetos a sesiones prolongadas y repetitivas, pueden experimentar estrés por factores como los movimientos constantes del jinete y la falta de estabilidad en el manejo (López & Moreno, 2015). Este estrés es un aspecto crítico, ya que no solo influye en su desempeño durante las sesiones, sino que también tiene repercusiones en su salud a largo plazo. El estrés crónico puede desencadenar problemas conductuales, como estereotipias (movimientos repetitivos sin función), así como incrementar el riesgo de lesiones y enfermedades, lo que afecta tanto su calidad de vida como su capacidad terapéutica (Moretti & Perrone, 2020).

Se cree que los niveles de cortisol sérico, pueden variar significativamente según la rutina diaria del caballo y su exposición a estímulos externos. Comparar los caballos que participan en hipoterapia con aquellos que permanecen estabulados permite evaluar el impacto del manejo y las condiciones ambientales en el ritmo circadiano del cortisol. Esta hormona, producida por la corteza suprarrenal, sigue un ciclo natural, con picos en la mañana que disminuyen a lo largo del día. Factores externos, como la luz, el ejercicio y las interacciones sociales, también modulan sus niveles. Se ha observado que la hipoterapia puede incrementar el cortisol en respuesta a la interacción con los jinetes, lo que sugiere un posible estrés, especialmente si las sesiones no se manejan adecuadamente (Pile et al., 2021).

El progresivo interés por el bienestar animal refleja una mayor conciencia ética sobre el uso de animales en actividades como la equinoterapia. Los caballos, al ser empleados en trabajos que explotan sus capacidades sociales y físicas, requieren un monitoreo constante para asegurar que su bienestar no se vea comprometido (Mascioli, 2023). Los estudios actuales no solo observan la conducta animal en entornos controlados, sino que también miden sus respuestas fisiológicas al ambiente y a las condiciones de trabajo, ya que estos factores afectan su salud física y emocional.

El cortisol es un biomarcador confiable para medir el estrés en animales, y su análisis mediante técnicas como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) permite evaluar con precisión sus niveles en diferentes momentos del día (Cortés et al., 2018). Durante la hipoterapia, los caballos están expuestos a factores físicos y estímulos sociales que pueden aumentar sus niveles de cortisol, lo que sugiere la presencia de estrés crónico si las actividades no se equilibran con descansos adecuados (Hoyos et al., 2019). Evaluar las fluctuaciones hormonales en caballos que participan en hipoterapia frente a aquellos que permanecen en establos permitirá determinar si estas actividades tienen un impacto negativo o si pueden ajustarse para favorecer su bienestar.

El objetivo del estudio es medir las concentraciones de cortisol sérico en una manada equina en distintos momentos del día y en respuesta a estímulos durante las sesiones de hipoterapia,



utilizando la técnica ELISA. Se espera obtener datos que permitan establecer una relación clara entre los niveles de estrés y las actividades terapéuticas, lo que contribuiría al desarrollo de prácticas más éticas y equilibradas en equinoterapia. Esto garantizaría que los caballos no solo cumplan su función terapéutica, sino que mantengan una vida saludable y libre de estrés innecesario.

Antes de la domesticación, los equinos vivían libremente en manadas y mantenían un rango jerárquico. A causa de que pasaron a vivir en confinamiento durante la domesticación, son altamente propensos al estrés, ya que están constantemente expuestos a una variedad incesante de estímulos (Novelletto-Pisa et al., 2019). En el contexto de la hipoterapia los equinos abarcan la repetición de acciones ritualizadas, vinculadas a la transmisión de conocimientos y habilidades en el uso de espacios específicos (Picazo, 2022). En la hipoterapia se establecen tres características primordiales que posee el equino de terapia, las cuales son fisiátricas para el humano: La transferencia de calor corporal, el traspaso de impulsos rítmicos desde el lomo del caballo al cuerpo del paciente y la replicación de un patrón de locomoción tridimensional que se asemeja al movimiento fisiológico de la marcha humana (Gimenez, 2020). Por lo tanto, es necesario prestar atención al bienestar animal de los equinos de trabajo.

Estrés en el equino:

La condición en la que un individuo percibe perturbaciones o amenazas a su homeostasis a causa de factores externos o internos se describe como estrés (Zilberschtein & Asánchez, 2017), de acuerdo con estudios se ha demostrado que el entrenamiento puede influir en los niveles de cortisol en plasma antes, durante y después del ejercicio (Ugaz Ruiz et al., 2020). El estrés prolongado puede causar cambios en el comportamiento, una reducción en el rendimiento físico, problemas de salud y alteraciones fisiológicas en los equinos, por lo que es necesario evaluar este parámetro en los animales.

Hipoterapia y bienestar animal:

La hipoterapia reduce el bienestar animal a la ausencia de maltrato y crueldad; sin embargo, la noción de salud del animal se limita a su capacidad para ser funcional para realizar la actividad requerida, subordinando su bienestar a su desempeño en dicha tarea, lo que puede causar estrés (Hoyos et al., 2019). Un estímulo que causa incomodidad o miedo y activa el sistema nervioso simpático se conoce estresor. Este estímulo puede causar síntomas físicos y psicológicos si persiste (Vargas et al., 2023). Las estereotipias son movimientos o comportamientos repetitivos que pueden tener un impacto negativo en el bienestar de los animales y tener un efecto significativo en su salud física, mental y fisiológica (Saldanha & Bortoli, 2022). La presencia de estas alteraciones de comportamiento, como la aerofagia y la coprofagia, entre otras, es una señal confiable de un déficit de bienestar animal. Por lo tanto, es crucial comprender si estas alteraciones son una señal de estrés, sufrimiento mental o condiciones ambientales y manejo inadecuado. (Gomes et al., 2023).

Los equinos que participan en actividades terapéuticas experimentan cierto grado de estrés y, en muchos casos, el desarrollo de estereotipias. Estas estereotipias pueden provocar alteraciones físicas como cólicos, enteritis, desgaste dental, apertura de la tráquea y otros problemas, que son perjudiciales para el bienestar del caballo (Gomes da Silva et al., 2021). La actividad física realizada provoca una alteración de la homeostasis que desencadena un estrés fisiológico, el cual a la vez se puede considerar como un estresor mental o psicógeno desencadenando una elevación de hormonas endocrinas como el cortisol (Ferlazzo et al., 2020), siendo este un bioindicador de bienestar animal.

Cortisol como bioindicador de estrés:

El cortisol es una hormona esteroidea y un glucocorticoide producido por la corteza suprarrenal y excretado principalmente en la orina en forma libre. Se sintetiza a partir del colesterol fundamental en la respuesta fisiológica al estrés y en los procesos de alostasis. Los niveles de sangre de los animales varían según el entorno y las condiciones de vida, pero se incrementan tras actividades como el ejercicio, el transporte, la excitación sexual y el estrés por aislamiento o hipoglucemia inducida (Cortés et al., 2018). El cortisol mantiene la presión arterial y regula la respuesta antiinflamatoria fisiológicamente. En su mayoría, circula en el torrente sanguíneo unido a la proteína transportadora transcortina o la globulina fijadora de corticosteroides (CBG), mientras que solo un 5% del cortisol circula libre (0.2-0.5 g/dL). También puede unirse a la albúmina en concentraciones elevadas. Tiene una vida media de alrededor de 90 minutos y generalmente se encuentra en concentraciones plasmáticas entre 10 y 20 g/dL (Ayala et al., 2012). El cortisol también es un indicador importante de la adaptación de los equinos al estrés fisiológico, patológico y ambiental.

Ritmo Circadiano del cortisol (CCR):

Debido a la activación del sistema nervioso autónomo simpático e hipotalámico-pituitario-suprarrenal, que estimula la liberación de hormona adrenocorticotrópica y estimula la corteza de la glándula suprarrenal para secretar cortisol, el ritmo circadiano de los mamíferos tiene un pico por la mañana y una reducción de niveles graves por la tarde y la noche, estas fluctuaciones son más pequeños en animales sometidos a estrés (Gontijo et al., 2018), los estudios han demostrado una relación entre los cambios en el CCR y otros indicadores de estrés crónico. El CCR normal de los caballos es aquel en el que la diferencia en las concentraciones séricas de cortisol entre la mañana y la tarde (con un intervalo mínimo de 8 horas) supera el 30%. (Gontijo et al., 2014), El rango de referencia para el cortisol en plasma de los caballos es de 13.3 ± 7.4 µg/dL (Maldonado Soto et al., 2024).

Patologías producidas por hiperadrenocortisismo:

El síndrome de Cushing, una de las endocrinopatías más frecuentes en caballos adultos, es una de las enfermedades que pueden afectar negativamente la salud de los equinos debido al aumento del cortisol. La presencia de un adenoma, hiperplasia o hipertrofia del lóbulo intermedio de la glándula pituitaria es la causa de esta condición, que se desarrolla lentamente y progresivamente (González, 2009). Los niveles de corticosteroides producidos por la

glándula adrenal aumentan con un exceso de ACTH, lo que provoca síntomas como el crecimiento excesivo del pelaje o el hirsutismo, que no desaparecen durante el verano (Franco et al., 2021). Por lo tanto, un diagnóstico temprano es crucial para evitar complicaciones posteriores.

La laminitis es una inflamación del tejido laminar dentro del casco, que puede ser extremadamente dolorosa y llegar a provocar una cojera severa. Es una de las afecciones clínicas más comunes y se considera un signo clínico que puede presentarse en diversas patologías de origen variado. Entre sus posibles causas se encuentran enfermedades endocrinas, sepsis o sobrecarga de peso unilateral (Pardié et al., 2022). El estrés crónico y los niveles elevados de cortisol están asociados con un mayor riesgo de desarrollar laminitis, ya que el aumento de cortisol puede inducir resistencia a la insulina. Esta condición impide que las células del cuerpo respondan adecuadamente a la insulina, lo que provoca que la glucosa permanezca en la sangre en lugar de ingresar a las células (de Laat et al., 2019). Para promover la reparación del tejido laminar, es esencial aplicar un tratamiento específico y riguroso.

Técnicas para determinar cortisol:

Según Stanchi (2007), “Existen diferentes tipos de técnicas que nos permiten medir el cortisol, algunas de ellas son: enzimoimmunoanálisis (ELISA), radioimmunoanálisis (RIA), automatizado y cromatografía líquida/espectrometría de masa en tándem (LC/MS) y por último electroquimioluminiscencia (ECQLIA)”

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, también conocido como ELISA, es una técnica de medición de anticuerpos muy precisa que mide cantidades iguales a nanogramos. Se caracterizan por la acción de anticuerpos conjugados con enzimas, como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa (Guzmán-Vázquez, 2004), es uno de los inmunoensayos más sensibles que existen, su rango de detección típico es de 0,1 a 1 fmol o de 0,01 ng a 0,1 ng, y su sensibilidad depende de las características particulares de la interacción anticuerpo-antígeno. Además, se pueden mejorar los resultados utilizando ciertos sustratos, como los que producen señales quimioluminiscentes o fluorescentes mejoradas.

Técnica de ELISA cuantitativa:

ELISA cuantitativa es basado en la utilización de antígenos o anticuerpos etiquetados con una enzima, formando así los conjugados derivados que posean actividad tanto en el sistema inmunológico como en la enzima. Los elementos (antígeno o anticuerpo) cuando están marcados con una enzima e insolubilizados en un soporte, tienen la reacción del antígeno anticuerpo, este quedará inmovilizado y por lo tanto será más fácil revelarla por esto la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso del espectrofotómetro o un colorímetro (Guzmán-Vázquez, 2004).

El kit Monobind Cortisol EIA emplea un anticuerpo específico monoclonal anti-cortisol y no necesita obtener muestras de suero o plasma previamente. La reacción cruzada con esteroides naturales es mínima (AccuBind, 2019).

El anticuerpo, el conjugado enzima-antígeno y el antígeno nativo son reactivos esenciales necesarios para un inmunoensayo enzimático. Según AccuBind (2019), al combinar el anticuerpo biotinilado, el conjugado enzima-antígeno y un suero que contiene el antígeno nativo, se produce una reacción competitiva entre el antígeno nativo y el conjugado enzima-antígeno debido a un número restringido de sitios de unión del anticuerpo. La siguiente ecuación (Figura 1) muestra la interacción donde: Ab_{Btn} = Anticuerpo biotinilado (cantidad constante), Ag = Antígeno nativo (cantidad variable), ^{Enz}Ag = Conjugado enzima-antígeno (cantidad constante), $AgAb_{Btn}$ = Complejo antígeno-anticuerpo, $^{Enz}AgAb_{Btn}$ = Complejo conjugado enzima-antígeno-anticuerpo, k_a = Constante de velocidad de asociación, k_{-a} = Constante de velocidad de disociación, $K = k_a / k_{-a}$ = Constante de equilibrio.

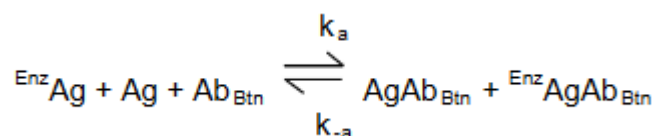


Figura 1. Ecuación de inmunoensayo enzimático competitivo (AccuBind, 2019).

La biotina unida al anticuerpo y la estreptavidina inmovilizada en el micropocillo reaccionan al mismo tiempo. La separación de la fracción unida al anticuerpo se produce como resultado de la decantación o aspiración (AccuBind, 2019).

Material y métodos

Material

El estudio se llevó a cabo en el centro de hipoterapia de la ciudad de Cuenca donde, se seleccionaron ocho caballos machos castrados, de entre 5 y 16 años, que fueron divididos en dos grupos: uno compuesto por cuatro caballos que participan en sesiones de hipoterapia, y otro grupo de control, formado por cuatro caballos en sistemas estabulados. Se midió la variación del cortisol sérico en ambos grupos a lo largo de cinco jornadas de trabajo, repitiéndose las mediciones en cada sesión. Además, se tuvo en cuenta el ritmo circadiano, realizando dos mediciones por individuo en cada jornada, lo que resultó en un total de 80 muestras mediante un diseño de bloques completamente al azar.

Métodos

Se registraron estereotipias como aerofagia y weaving, posteriormente se midieron las constantes fisiológicas de los caballos antes de cada extracción de sangre diaria, empleando un estetoscopio y un termómetro digital. Se extrajo 1 ml de sangre de la vena yugular de cada animal, utilizando una jeringa estéril de 5 ml, y la muestra fue transferida a tubos vacutainer de tapa roja sin anticoagulante. A cada caballo se le realizaron dos extracciones diarias: una



a las 7 a.m. y otra después del estímulo. Este procedimiento se repitió de forma semanal durante un periodo de mes y medio.

La detección de cortisol en suero sanguíneo se realizó mediante una prueba ELISA competitiva, utilizando el kit comercial «Cortisol AccuBind® ELISA Kit» (Monobind, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incluyeron dos controles por cada placa, así como dos controles negativos con concentraciones de 0, 0.1, 4, 10, 20 y 50 µg/dL. La lectura de los resultados se efectuó midiendo la densidad óptica (OD, absorbancia) en cada pozo a una longitud de onda de 450 nm, usando un lector de microplacas. A partir de esta medición, se determinó la concentración de cortisol sérico (µg/dL) para cada caballo.

Se trabajó con un diseño de bloques de doble entrada para comparar los dos grupos frente a los momentos del día de la extracción del plasma. Los datos fueron analizados mediante el software estadístico RStudio (RStudio Team, 2024), mediante una prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis ($p \leq 0,05$).

Resultados

Al analizar los datos, se obtuvo un intervalo de confianza (IC) reflejado en la Tabla 1. En el grupo de control, el promedio fue de 9.03 con una desviación estándar de ± 3.99 , resultando en un límite inferior de 7.75 y un límite superior de 10.30. Por otro lado, en el grupo de hipoterapia, el promedio fue de 10.97 con una desviación estándar de ± 5.73 , lo que arrojó un límite inferior de 9.13 y un límite superior de 12.80.

En cuanto a los momentos del día, al analizar el intervalo de confianza entre las distintas mediciones (CCR), se observó que el promedio en la mañana fue de 11.08 con una desviación estándar de ± 4.49 , con un límite inferior de 9.64 y un límite superior de 12.51. En el caso de la tarde, el promedio fue de 8.92 con una desviación estándar de ± 5.30 , obteniéndose un límite inferior de 7.22 y un límite superior de 10.61. Estos resultados muestran variaciones tanto en el tratamiento como en los momentos del día.

Tabla 1. Intervalos de Confianza de los Tratamientos y de los Momentos (CCR).

Tratamiento	n	Promedio	IC (95%)		E.E.
			LI (95%)	LS (95%)	
Control	40	9.03(± 3.99)	7.75	10.30	0.63
Hipoterapia	40	10.97(± 5.73)	9.13	12.80	0.91
Momento del Día	n	Promedio	LI (95%)	LS	E.E.
				(95%)	
Mañana	40	11.08(± 4.49)	9.64	12.51	0.71
Tarde	40	8.92(± 5.30)	7.22	10.61	0.84

Además para analizar los resultados obtenidos en el laboratorio se utilizó la prueba no



paramétrica Kruskal-Wallis y el software R-studio, lo que nos permitió realizar una comparación intervariables, obteniendo los siguientes datos ($p < 0.05$):

Tabla 2. Análisis No Paramétrico de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$)

Tratamiento	Promedio	CV%
Control	9.03(+3.99)	44.16%
Hipoterapia	10.97(+5.73)	68.22%
<i>Valor p</i>		0.163
Mañana	11.08(+4.49)	40.58%
Tarde	8.92(+5.30)	59.47%
<i>Valor p</i>		0.053
<i>Valor p (Tratamiento x Circadiano)</i>		0.026*
Semana 1	9.55(+3.85)	40.36%
Semana 2	10.18(+6.05)	59.43%
Semana 3	11.96(+6.33)	52.93%
Semana 4	8.67(+3.91)	45.13%
Semana 5	9.62(+4.32)	44.86%
<i>Valor p</i>		0.505
<i>Valor p (Tratamiento x Semana)</i>		0.547
Caballo 1	13.52(+7.12) ^c	52.69%
Caballo 2	6.67(+2.27) ^a	34.02%
Caballo 3	9.84(+3.80) ^{abc}	38.66%
Caballo 4	13.84(+5.82) ^c	42.05%
Caballo 5	7.63(+1.96) ^{ab}	25.71%
Caballo 6	11.17(+4.28) ^{bc}	38.33%
Caballo 7	10.96(+4.66) ^{bc}	42.50%
Caballo 8	6.35(+2.36) ^a	37.23%
<i>Valor p</i>		0.006**
<i>Valor p (Tratamiento x Caballo)</i>		0.006**
<i>*Valores con diferencias estadísticas</i>		

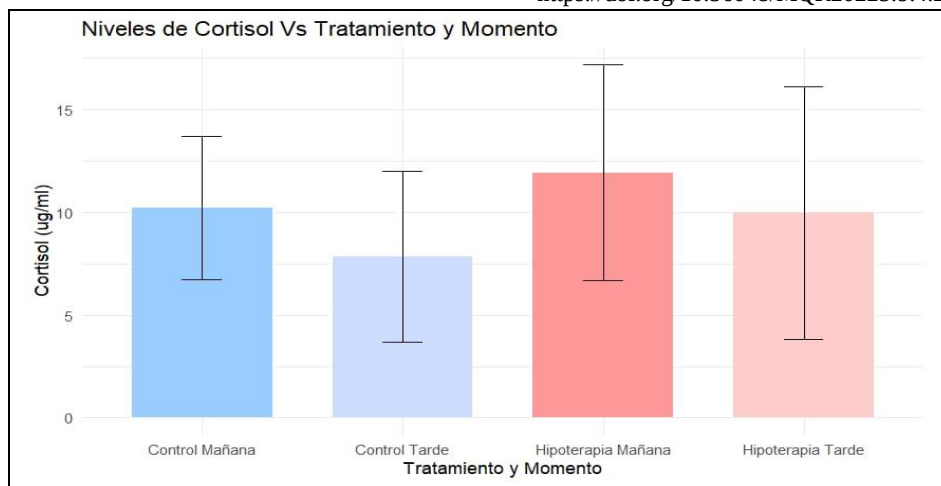


Figura 2. Comparación intervariables (Tratamiento-Momento)

Al analizar los resultados del grupo control y el grupo de hipoterapia, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.163$, $p > 0.05$), lo que indica que ambos tratamientos muestran medianas similares. De manera similar, en el análisis circadiano (mañana vs. tarde), aunque el valor de $p = 0.053$ está cerca del umbral de significancia ($p = 0.05$), no se puede concluir que haya diferencias significativas entre los momentos del día. No obstante, al evaluar la interacción entre tratamiento y momento del día, se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.026$, $p < 0.05$), lo que sugiere que los efectos del tratamiento varían en función del ritmo circadiano. En particular, mientras el grupo control parece mantener un ritmo circadiano estable, los valores en el grupo de hipoterapia muestran alteraciones en la tarde, posiblemente debido al esfuerzo físico que implica esta intervención en los animales.

En cuanto al análisis por semana, no se encontraron diferencias significativas entre las semanas ($p = 0.505$, $p > 0.05$), lo que indica que los resultados fueron consistentes a lo largo del tiempo. Tampoco se observaron diferencias significativas en la interacción entre tratamiento y semana ($p = 0.547$, $p > 0.05$), sugiriendo que el efecto del tratamiento no varió de manera considerable durante las semanas evaluadas.

Sin embargo, el análisis individual por caballos reveló diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p = 0.006$, $p < 0.05$), lo que indica que los caballos no respondieron de manera uniforme al tratamiento. De igual manera, la interacción entre tratamiento y caballo mostró diferencias significativas ($p = 0.006$, $p < 0.05$), lo que sugiere que la respuesta al tratamiento depende de las características individuales de cada caballo. Esto podría estar relacionado con factores específicos del manejo o de la condición física de cada animal, como se observa en el rendimiento variable de los caballos 1 y 5, cuyos datos reflejaron distintos grados de variabilidad.

Discusión



Los resultados de este estudio muestran que los niveles de cortisol en el grupo de control oscilaron entre $9.03 \text{ g/dL} \pm 3.99$ y $10.97 \text{ g/dL} \pm 5.73$ en los caballos que participaron en hipoterapia. Este pequeño aumento en los niveles de cortisol en los caballos que recibieron hipoterapia indica que esta intervención podría causar una respuesta de estrés moderada en comparación con el grupo de control. Esta observación nos hace pensar en cómo las actividades terapéuticas pueden afectar el bienestar físico y emocional de los caballos.

Además, el estudio de Zuluaga & Martínez (2017) proporciona información útil al indicar una concentración media de cortisol sérico matinal de $13.3 \pm 7.4 \text{ g/dL}$ en caballos criollos colombianos. Lo interesante es que este estudio no encontró ninguna relación significativa entre el género, la edad o el desempeño de los caballos en los niveles de cortisol. Esto indica que el estrés en estos animales puede estar más relacionado con el entorno y las condiciones de manejo que con características específicas. A pesar de que los niveles de cortisol en nuestro estudio son menores que los de Zuluaga & Martínez, todavía hay una tendencia a encontrar niveles más altos en situaciones de estrés, lo que respalda la idea de que varios factores afectan las respuestas de cortisol.

Sin embargo, los estudios de González (2023) demostraron niveles significativamente más bajos de cortisol en caballos en condiciones de altura, con niveles promedio de 6.731 g/dL en machos y 7.117 g/dL en hembras. Esta diferencia destaca el papel del entorno en la regulación del cortisol e indica que la altitud puede tener un papel en la respuesta al estrés de los caballos.

Conjuntamente, el estudio realizado por Maldonado Soto et al. (2024) proporciona información relevante sobre cómo los factores climáticos pueden afectar los niveles de cortisol. Los niveles de cortisol disminuyeron significativamente de 5.72 g/dL antes del ejercicio a 1.1 g/dL después del ejercicio. Este descubrimiento demuestra una respuesta adaptativa a las condiciones ambientales cálidas y húmedas, enfatizando que tanto el entorno como la naturaleza del ejercicio son esenciales para la regulación del cortisol.

De igual manera, los resultados de Reinartz & Echeverri (2007) muestran un aumento significativo en los niveles de cortisol después de ejercicios intensos, lo que sugiere que la intensidad del ejercicio puede causar una respuesta de estrés más intensa. Esto va en contra de los niveles de cortisol observados en la hipoterapia. Según Potier & Louzier (2023), los niveles más bajos de cortisol durante las sesiones terapéuticas están asociados con esto. Lo cual indica que, en comparación con actividades que requieren un mayor esfuerzo físico, la hipoterapia podría ser más beneficiosa para el bienestar de los caballos.

Otros estudios, como Ferlazzo et al. (2020) quienes estudiaron los cambios hormonales producidos durante el ejercicio, Hoyos & Guerrero (2020) al comparar la prevalencia de estereotipias presentes entre equinos de hipoterapia y de equitación y Johnson et al. (2017), quienes midieron los niveles de estrés con el fin de asegurar la salud y el bienestar de los caballos terapéuticos, respaldan la idea de que las respuestas de cortisol están relacionadas

con la duración y el tipo de ejercicio, así como con las condiciones de manejo y el bienestar general de los caballos. Esto resalta la complejidad de las respuestas fisiológicas de los equinos, que dependen de una variedad de factores que están estrechamente relacionados entre sí.

Ritmo circadiano

Los resultados de este estudio muestran que los niveles de cortisol de los caballos de hipoterapia (evaluados por la tarde) y el grupo de control (evaluado por la mañana) mostraron diferencias significativas. Esto sugiere que el ritmo circadiano tiene un gran impacto en la respuesta hormonal durante estas actividades, lo que resalta la importancia de considerar el momento en que se toman las muestras para interpretar correctamente los niveles de cortisol.

Además, los resultados de Gontijo et al. (2018) son particularmente relevantes en este contexto. Su investigación examinó los factores de bienestar de los caballos de carrera y descubrió que el 63.64% de ellos tenían un ritmo circadiano de cortisol (CCR) alterado. Sin embargo, cuando se comparó este grupo con los grupos que no mostraban estereotipias, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$). Esto implica que, aunque las alteraciones del CCR pueden estar relacionadas con comportamientos anormales, la conexión no siempre es directa. Además, el estudio indica que las restricciones físicas impuestas para controlar la estereotipia pueden agravar las alteraciones en el metabolismo del cortisol, lo que revela un estrés persistente que afecta el bienestar mental de los caballos. Sin embargo, Leal et al. (2011) encontraron que los niveles de cortisol de los caballos en entornos urbanos aumentaron durante el día. Este fenómeno podría ser el resultado de los cambios en el ritmo circadiano del cortisol, que son comunes en las condiciones de estrés prolongado. Los autores destacan que el tipo de confinamiento y las condiciones de alojamiento no alivian el estrés, lo que indica que vivir en un entorno urbano representa un gran desafío para el bienestar de estos animales.

Gontijo et al. (2014) examinaron el bienestar de los caballos en relación con su ritmo circadiano y descubrieron que el 42 % de los caballos tenía niveles de cortisol por debajo de lo normal. La variación de los niveles de cortisol entre la mañana y la tarde sugiere que estos caballos no están adaptándose al estrés. Además, se encontró una correlación significativa entre la alteración del CCR y los cambios en el comportamiento y la frecuencia cardíaca, lo que respalda la idea de que el estrés persistente tiene un impacto negativo en la salud de estos animales.

Finalmente, Eichler et al. (2024) descubrió que entre las 8 a.m. y las 12 p.m., el cortisol aumenta. Incluso interrupciones menores pueden causar desviaciones en el CCR, ya que estos niveles pueden aumentar significativamente en respuesta al estrés.

Conclusiones

La concentración sérica de cortisol en equinos de hipoterapia fue de $10.97 \pm 5.73 \mu\text{g/dL}$



mientras que en el grupo control los valores fueron $9.03 \pm 3.99 \mu\text{g/dL}$, esto nos indica que la hipoterapia altera los niveles de cortisol, posiblemente debido al esfuerzo físico que implica en los animales, aunque esta alteración no es significativa, indica que este estímulo genera una respuesta moderada al estrés.

Además se observó que el ritmo circadiano del cortisol en el grupo de hipoterapia se vio alterado de manera significativa ($p < 0.05$), lo que se asocia con condiciones de estrés que pueden afectar el bienestar animal.

El ritmo circadiano equino se manifiesta en la reducción de los niveles de cortisol durante la tarde respecto a los valores de la mañana, subrayando la relevancia de considerar el momento de recolección de las muestras para una correcta interpretación de los niveles de cortisol.

Referencias bibliográficas

- AccuBind, E. (2019). *Cortisol Test System*. Monobind.com. <https://www.monobind.com/Products/immunoassays-steroids-cortisol>
- Ayala, I., Martos, N. F., Silvan, G., Gutierrez-Panizo, C., Clavel, J. G., & Illera, J. C. (2012). Cortisol, adrenocorticotrophic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.05.013>
- Cortés, C., Escobar, A., Cebada, J., Soto, G., Bilbao, T., & Vélez, M. (2018). Estrés y cortisol: implicaciones en la ingesta de alimento. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 37(3), 1–15. <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v37n3/ibi13318.pdf>
- de Laat, M. A., Reiche, D. B., Sillence, M. N., & McGree, J. M. (2019). Incidence and risk factors for recurrence of endocrinopathic laminitis in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(3), 1473–1482. <https://doi.org/10.1111/jvim.15497>
- Eichler, F., Ehrle, A., Machnik, M., Jensen, K. C., Wagner, S., Baudisch, N., Bolk, J., Pötzsch, M., Thevis, M., Bäumer, W., Lischer, C., & Wiegand, M. (2024). Behavioral observations, heart rate and cortisol monitoring in horses following multiple oral administrations of a cannabidiol containing paste (part 2/2). *Frontiers in veterinary science*, 10, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1305873>
- Ferlazzo, A., Cravana, C., Fazio, E., & Medica, P. (2020). The different hormonal system during exercise stress coping in horses. *Veterinary World*, 13(5), 847–859. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.847-859>
- Franco, F. A., Dos Santos, F. C. C., Da Costa, G. V., Oliveira, H. R., Ugolini, L. W., Bondan, C., & Alves, L. P. (2021). Diagnostic process in a Crioulo horse with Cushing's syndrome. *Acta scientiae veterinariae*, 49(1), 1–5. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.105355>



- Gimenez, S. (2020). Potenciar la inteligencia emocional de los adolescentes tutelados a través de la equinoterapia. *Revista de Educación Social*, 31, 1–13. https://eduso.net/resflujo/wp-content/uploads/2020/11/miscelanea_susanna_res_31.pdf
- Gomes, C. M. S., Semedo, A. D., Caetano, M. E. T., & Tokumaru, R. S. (2023). Intervenções assistidas por animais: revisão e avaliação de estudos latino-americanos1. *Revista brasileira de educação especial*, 29, 1–23. <https://doi.org/10.1590/1980-54702023v29e0155>
- Gomes da Silva, D., Corrêa Gonsalves, F., Oliveira Chaves, P., Dequech Torres, B., & Scarranaro Morghetti, B. (2021). Disorder of behavior: an integrated view of ethology and analysis of behavior. *Ciência Animal*, 31(2), 105–119. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20210418370>
- Gontijo, L. A., Cassou, F., Duarte, P. C., Lago, L. A., Alves, G. E. S., Melo, M. M., & Faleiros, R. R. (2018). Bem-estar em equinos do Jockey Club do Paraná: indicadores clínicos, etológicos e ritmo circadiano do cortisol. *Pesquisa veterinária brasileira [Brazilian journal of veterinary research]*, 38(9), 1720–1725. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5313>
- Gontijo, L., Cassou, F., Michelotto, P., Alves, G., Bringel, B., Ribeiro, R., Lago, L., & Faleiros, R. (2014). Bem-estar em equinos de policiamento em Curitiba/PR: indicadores clínicos, etológicos e ritmo circadiano do cortisol. *Ciencia rural*, 44(7), 1272–1276. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20131196>
- González, B. (2023). *Determinación de los niveles sanguíneos de cortisol en equinos (Equus caballus) aparentemente sanos en condiciones de altitud* [Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/25517>
- González, F. (2009). Síndrome de Cushing en Equinos. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(7), 1–11. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63617149006.pdf>
- Guzmán-Vázquez, E. (2004). Las pruebas de Elisa. *Gac Méd Méx*, 140(3), 48–49. <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2004/gms043o.pdf>
- Hoyos, J., Bermúdez, E., Hernández, D., & Velásquez, B. (2019). Vista de Aplicación del protocolo Welfare Quality® en criaderos equinos para determinar el grado de bienestar animal. *MundoFesc*, 9(18), 24–30. <https://www.fesc.edu.co/Revistas/OJS/index.php/mundofesc/article/view/444/528>
- Hoyos, L., & Guerrero, H. (2020). *Comparación de las prevalencia de estereotipias en dos grupos de equinos (equinoterapia y equitación) en la corporación jumpa- jump* [Tesis de grado, Universidad Antonio Nariño].



<https://repositorio.uan.edu.co/server/api/core/bitstreams/136accb2-696e-4c2f-971f-453f9c6d59c7/content>

- Johnson, R. A., Johnson, P. J., Megarani, D. V., Patel, S. D., Yaglom, H. D., Osterlind, S., Grindler, K., Vogelweid, C. M., Parker, T. M., Pascua, C. K., & Crowder, S. M. (2017). Horses working in therapeutic riding programs: Cortisol, adrenocorticotrophic hormone, glucose, and behavior stress indicators. *Journal of Equine Veterinary Science*, 57, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.05.006>
- Leal, B. B., Alves, G. E. S., Douglas, R. H., Bringel, B., Young, R. J., Haddad, J. P. A., Viana, W. S., & Faleiros, R. R. (2011). Cortisol circadian rhythm ratio: A simple method to detect stressed horses at higher risk of colic? *Journal of Equine Veterinary Science*, 31(4), 188–190. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2011.02.005>
- López, L. M., & Moreno, E. D. (2015). Hipoterapia como técnica de habilitación y rehabilitación. *Universidad y salud*, 17(2), 271–279. <https://doi.org/10.22267/rus.151702.11>
- Maldonado Soto, S. X., Moreno Carrillo, P. J., Pedraza Castillo, L. N., & Jaramillo-Hernández, D. A. (2024). Estatus hídrico y cortisol sérico en equinos durante cabalgatas culturales en el Meta (Colombia). *Revista de investigaciones veterinarias del Peru*, 35(2), 1–11. <https://doi.org/10.15381/rivep.v35i2.27850>
- Mascioli, M. (2023). Bienestar Animal en Equinos. *Rev. med. vet.*, 104(2), 87–90. [https://www.someve.com.ar/images/revista/2023/Vol104\(2\)/Pag-87-90-Mascioli.pdf](https://www.someve.com.ar/images/revista/2023/Vol104(2)/Pag-87-90-Mascioli.pdf)
- Moretti, M., & Perrone, M. (2020). El bienestar animal en equinos según el modelo IPAE. *Calidad de Vida y Salud*, 13(Especial), 184–194. <http://revistacdvs.uflo.edu.ar/index.php/CdVUFLO/article/view/294>
- Novelletto Pisa, J., Pereira Leme, D., & Conte Tacito, J. L. (2019). Relação humano-equino a partir da obra "o gaúcho" de José de Alencar (1870). *PubVet*, 13(07), 1–12. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n7a377.1-12>
- Pardié, M., Carzoli, A., & Meikle, A. (2022). Síndrome metabólico equino y laminitis Estudio de caso. *Veterinaria (Montevideo)*, 58(218), 1–7. <https://doi.org/10.29155/vet.58.218.2>
- Picazo, J. (2022). Vista de Las terapias asistidas con caballos: el “animal de terapia” entre la dominación especista y la cooperación mutualista. *Revista Latinoamericana De Estudios Criticos Animales*, 2(1), 67–92. <https://revistaleca.org/index.php/leca/article/view/379/300>



- Pile, E., Chang, A., & Chang, E. (2021). Bienestar equino y su relación con la calidad de vida de familias rurales en panamá. *Revista investigaciones agropecuarias*, 4(1), 51–71. https://revistas.up.ac.pa/index.php/investigaciones_agropecuarias/article/view/2511
- Potier, J. F. N., & Louzier, V. (2023). Evaluation of stress markers in horses during hippotherapy sessions in comparison to being ridden by beginners. *Animal Welfare (South Mimms, England)*, 32(10), 1–10. <https://doi.org/10.1017/awf.2023.6>
- Reinartz, M., & Echeverri, N. (2007). Efecto del estrés generado por el ejercicio de alto rendimiento sobre las concentraciones de cortisol y testosterona en caballares pura sangre inglés. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, 60(2), 3985–3999. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v60n2/a09v60n2.pdf>
- RStudio Team. (2024). *RStudio: Integrated Development Environment for R* (Versión 2024.09.0+375) [Software]. RStudio, PBC. <https://www.rstudio.com/>
- Saldanha, M., & Bortoli, D. (2022). Vista do Bem-estar de garanhões e éguas utilizados para a reprodução – revisão de literatura. *Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa*, 38(74), 1–14. <http://publicacoes.unifil.br/index.php/Revistateste/article/view/2478/2064>
- Stanchi, N. (2007). *Microbiología Veterinaria*. Editorial Intermédica. https://www.academia.edu/37283154/Stanchi_Microbiologia_Veterinaria
- Ugaz Ruiz, C. M., Carlini Isler, R., & Echeverria Jaque, C. (2020). Generación sistematizada de indicadores de bienestar animal para equinos de carrera en hipódromos de Santiago de Chile. *Revista de investigaciones veterinarias del Peru*, 31(4), 1–17. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i4.17471>
- Vargas, P., García, E., Pared, V., Meyer, S., Calderón Sadlovsky, S., & Benítez, J. (2023). Determinación del bienestar animal en equinos de tracción a sangre en barrios periféricos de la ciudad de Corrientes, Argentina. *Revista Veterinaria*, 34(2), 7–12.
- Zilberschtein, J., & Asánchez-Valverde, M. (2017). *Estudio y evaluación de parámetros de estrés, mediante el uso de wireless sensor technologies, en caballos de equinoterapia*. 33, 93–95. <https://www.proquest.com/docview/2389240651?pq-origsite=gscholar&fromopenview=true&sourcetype=Scholarly%20Journals>
- Zuluaga, A. M., & Martínez, J. R. (2017). Serum cortisol concentration in the Colombian Creole Horse. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*, 30(3), 231–238. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v30n3a06>

Conflicto de intereses:

Los autores declaran que no existe conflicto de interés posible.

Financiamiento:

No existió asistencia financiera de partes externas al presente artículo.

Agradecimiento:

N/A

Nota:

El artículo no es producto de una publicación anterior.