



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA
CARRERA MEDICINA VETERINARIA
SEDE CONCEPCIÓN**

**EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN SÉRICA DEL FACTOR DE
NECROSIS TUMORAL ALFA (FNT- α) COMO BIOMARCADOR EN EL
PROCESO DE OSTEOARTRITIS EN CABALLOS DE DEPORTE
ECUESTRE DE LA REGIÓN DEL BIOBÍO.**

Memoria para optar al título de Médico Veterinario.

Profesor tutor: MSc. Esteban R. Bustamante H., MV.

Estudiante: Tatiana Martínez Camelo.

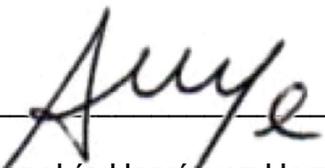
® Tatiana Martínez Camelo.

Se autoriza la reproducción parcial o total de esta obra, con fines académicos, por cualquier forma, medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la cita bibliográfica del documento.

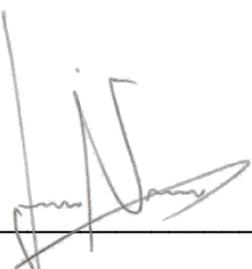
Concepción, Chile
2025

HOJA DE CALIFICACIÓN MEMORIA DE TÍTULO

En Concepción, el 10 de julio, del año 2025 los abajo firmantes, dejan constancia que el (la) estudiante TATIANA MARTÍNEZ CAMELO de la carrera de MEDICINA VETERINARIA, ha aprobado la memoria para optar al título profesional de MÉDICO VETERINARIO con una nota de 4,7.



DCs. AnaLía Henríquez Herrera. MV.
Presidente Comisión



MCs. Javier Agustín Neumann Vásquez. MV.
Profesor Evaluador



MCs. Esteban René Bustamante Henríquez. MV.
Profesor Patrocinante

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	7
3. OBJETIVOS	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS	9
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSIÓN	15
7. CONCLUSIONES	17
8. REFERENCIAS	18
9. ANEXOS	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resumen de los resultados obtenidos con la técnica de ELISA de los caballos con osteoartritis y los caballos sanos.	14
Tabla 2: Descripción de la historia clínica de los pacientes muestreados.....	22
Tabla 3: Resultados de las pruebas de normalidad del FNT- α (Categoría 1).....	26
Tabla 4: Comparación no paramétrica de las concentraciones séricas de FNT- α entre grupos (Prueba de Wilcoxon).....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución del total de los caballos muestreados por raza.....	24
Figura 2: Distribución del total de caballos muestreados por sexo.....	24
Figura 3: Clasificación de cada uno de los individuos que participaron del estudio según su historia clínica.....	25
Figura 4: Clasificación por diagnóstico del total de individuos participantes del estudio.	25
Figura 5: Vista oblicua externa, se observa mineralización de la capsula articular del nudo, además del colapso articular medial.....	28
Figura 6: Vista latero medial del nudo izquierdo, se observa una fractura consolidada e inactiva del extremo distal del segundo metatarsiano, presencia de capsula articular mineralizada.	28
Figura 7: Vista dorsoproximal-palmarodistal del casco del miembro anterior derecho, se encuentra una ligera entesopatía del ligamento colateral del navicular lateral y hay perdida de diferenciación de las capas compacta y esponjosa además de un aumento de las foraminas sinoviales.....	29
Figura 8: Vista dorsoproximal – palmarodistal oblicua del MAI, se observa entesopatía y mineralización del ligamento colateral del navicular lateral, también hay aumento de las foraminas sinoviales y hay presencia de un quiste subcondral. También se observa hueso esclerótico y perdida de diferenciación de las capas esponjosas y compactas..	29
Figura 9: Vista dorsomedial-palmarolateral oblicua de la articulación del carpo derecho, se aprecia colapso articular del carpo metacarpo por el lado lateral.....	29
Figura 10: Vista oblicua externa del miembro posterior derecho, se observa colapso articular metatarso falángica e interfalángica proximal.....	30

RESUMEN

El uso de caballos en deportes ecuestres ha evidenciado una alta prevalencia de osteoartritis (OA), una enfermedad articular degenerativa que afecta hasta al 23% de los equinos en Chile sometidos a esfuerzos intensos. La OA presenta una etiología multifactorial, que incluye factores genéticos, traumáticos y ambientales. De este modo, el diagnóstico fue complementado con imágenes, artroscopias y/o uso de biomarcadores. Entre estos últimos, el factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α) emerge como un posible indicador de inflamación y catabólico articular. Esta investigación plantea la siguiente pregunta: ¿Es el FNT- α un biomarcador útil para prevenir la OA en caballos de deportes ecuestres de la región del Biobío?.

El objetivo principal es evaluar la concentración sérica de FNT- α como biomarcador en procesos de OA, distinguiendo entre caballos sanos y afectados. El estudio se llevará a cabo con 32 caballos, divididos en un grupo control y un grupo experimental. A través de exámenes clínicos y de imagen, se determinó el estado articular de cada individuo. Las inferencias estadísticas se basaron en datos descriptivos, de normalidad y comparativos (Student o Wilcoxon Mann Whitney, según el tipo de distribución de los datos). La inferencia estadística estableció diferencias en los niveles de FNT- α entre caballos con OA y caballos control, encontrándose este biomarcador elevado en los animales con OA. La discusión destacó la aplicación de FNT- α como biomarcador de inflamación y catabolismo para la degeneración articular, y su justificación como marcador complementario en el diagnóstico temprano de OA.

La conclusión fue que la concentración sérica de FNT- α fue un biomarcador apropiado para distinguir entre caballos afectados y no afectados, y su utilidad en el tratamiento temprano de la osteoartritis en caballos de deporte ecuestre en la región estudiada. La comparación del modelo de regresión de Tobit reveló que el nivel sérico de FNT- α en caballos con osteoartritis y caballos normales no difirió en absoluto ($P > 0,05$). Lo mismo ocurrió con la prueba no paramétrica de Wilcoxon Mann-Whitney, que reveló que no hubo diferencias en la distribución de FNT- α entre los grupos ($p > 0,05$). Los resultados obtenidos tras la aplicación de la prueba de Kruskal-Wallis revelan que no existe un impacto estadísticamente significativo de la localización de la OA en el FNT- α sérico, ya que el valor p de Spearman fue mayor que el nivel de significación seleccionado ($\alpha = 0,05$). Por lo tanto, se afirma que no hay fundamento para rechazar la hipótesis nula ($p = 0,6200$). Tampoco existe una variación estadísticamente significativa en la frecuencia de FNT- α en función de la localización de la osteoartritis, ni entre los miembros existentes ni los posteriores.

Palabras clave: Osteoartritis, Equinos, Caballos, Enfermedad Articular, FNT- α .

ABSTRACT

The use of horses in equestrian sports has shown a high prevalence of osteoarthritis (OA), a degenerative joint disease that affects up to 23% of equines in Chile subjected to intense exercise. OA has a multifactorial etiology, including genetic, traumatic, and environmental factors. Thus, diagnosis was complemented with imaging, arthroscopy, and/or the use of biomarkers. Among the latter, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) emerges as a possible indicator of inflammation and joint catabolism. This research raises the following question: Is TNF- α a useful biomarker for preventing OA in equestrian sports horses in the Biobío region? The main objective is to evaluate serum TNF- α concentrations as a biomarker in OA processes, distinguishing between healthy and affected horses. The study will be conducted with 32 horses, divided into a control group and an experimental group. Through clinical and imaging examinations, the joint status of each individual was determined.

Statistical inferences were based on descriptive, normality, and comparative data (Student or Wilcoxon Mann-Whitney, depending on the data distribution). Statistical inference established differences in TNF- α levels between horses with OA and control horses, with this biomarker being elevated in the animals with OA. The discussion highlighted the application of TNF- α as a biomarker of inflammation and catabolism for joint degeneration, and its justification as a complementary marker in the early diagnosis of OA. The conclusion was that serum TNF- α concentration was an appropriate biomarker for distinguishing between affected and unaffected horses, and its usefulness in the early treatment of osteoarthritis in equestrian sport horses in the studied region. Comparison of the Tobit regression model revealed that serum TNF- α levels in horses with osteoarthritis and normal horses did not differ at all ($P > 0.05$). The same was true for the nonparametric Wilcoxon Mann-Whitney test, which revealed no differences in TNF- α distribution between groups ($p > 0.05$).

The results obtained after applying the Kruskal-Wallis test revealed no statistically significant impact of OA location on serum TNF- α , as the Spearman p value was greater than the selected significance level ($\alpha = 0.05$). Therefore, there is no basis to reject the null hypothesis ($p = 0.6200$). There is also no statistically significant variation in TNF- α frequency based on the location of osteoarthritis, either between existing or posterior limbs.

Keywords: Osteoarthritis, Equines, Horses, Joint Disease, FNT- α .

1. INTRODUCCIÓN

Los equinos desempeñan un papel importante en actividades deportivas. En Chile, la osteoartritis (OA) se ha identificado como una causa significativa de claudicaciones en caballos chilenos sometidos a esfuerzos físicos intensos, alcanzando hasta un 23% de los casos (Sommer, 2012). La OA, definida como una enfermedad degenerativa articular (Kidd et al., 2001), presenta una etiología multifactorial. Esta puede originarse a partir de factores genéticos, etarios, mecánicos, ambientales y traumáticos, los cuales se ven influenciados directamente por la ocupación y el tipo de actividad que desempeña el animal (Caron, 2011).

La principal función de la articulación, lugar donde ocurre la OA, es permitir el movimiento de dos o más huesos al entrar en contacto con sus superficies óseas recubiertas de cartílago, las cuales deben soportar altas presiones y así permitir la locomoción (Andrades, 2013).

Se debe considerar que hay diferentes tipos de articulaciones. Las fibrosas son prácticamente inmóviles, mientras que las cartilaginosas tienen una movilidad restringida, un ejemplo de ellas son la pelvis o cuerpos vertebrales. También están las articulaciones sinoviales, las cuales presentan una amplia movilidad, y en el equino las conforman las articulaciones interfalángica proximal y distal, metacarpo y metatarso falángica, cubital, femorotibiopatelar, coxofemoral y sacroilíaca. Estas presentan un mayor riesgo a desarrollar lesiones, como la OA (Van Weeran et al., 2001; Kusch, 2013).

1.1. Anatomía de la articulación

La articulación sinovial está compuesta por estructuras complejas integradas por diferentes tejidos conectivos como hueso subcondral, cápsula articular, membrana sinovial, líquido sinovial, cartílago articular (Andrades, 2013). Estos generan una unión entre los huesos en la que se encuentran distanciados por una pequeña cavidad articular (Elsevier, 2018).

1.2. Hueso subcondral

Este hueso está cubierto por cartílago articular, lo que proporciona superficies de contacto prácticamente sin fricción en la articulación (Frisbie, 2012), esta recibe inervación de ramas endosteales de los nervios periféricos que ingresan a la cavidad medular a través del foramen nutricio (Bassage, 1998).

1.3. Cápsula articular

Membrana fibrosa que forma la capa externa de la articulación. Su principal función es entregar soporte a la articulación mediante la unión a la superficie externa de los huesos articulares en conjunto con ligamentos que recubren la articulación, los cuales están formados con partes de esta membrana fibrosa y brindan mayor fuerza y soporte a las articulaciones sinoviales (Dyce et al., 1996).

1.4. Membrana sinovial

Esta se compone de dos tipos de células, los tipos A donde su principal función es proteger la articulación, eliminando restos celulares y las de tipo B que son los sinoviocitos que producen ácido hialurónico (AH) (Bertone, 2008). Estas pueden producir moléculas inflamatorias asociadas a enfermedades articulares como la OA. Por otro lado, esta contiene nervios, capilares y vasos linfáticos, los que proporcionan una vía de suministro de oxígeno, nutrientes y eliminación de desechos (Caron, 2011).

1.5. Líquido sinovial

Es un ultrafiltrado de plasma producido por la membrana sinovial (Bertone, 2008). Los sinoviocitos que forman parte de la membrana sinovial añaden AH al líquido sinovial para dar una textura viscosa y de color amarillento, este entrega una acción lubricante para facilitar el movimiento suave de los cartílagos articulares, con una composición dirigida por la membrana sinovial, esta, al sufrir lesiones, promueve la liberación de sustancias inflamatorias como mediadores y citocinas que van de la membrana al líquido sinovial ejerciendo efectos dañinos sobre el cartílago articular (Van Weeran, 2014). El líquido

sinovial a su vez es parte de la entrega de suministros nutricionales al cartílago articular (Frisbie, 2012).

1.6. Cartílago articular

Es la estructura central que constituye la superficie de la articulación, en conjunto con el líquido sinovial. El cartílago articular es reconocido por proporcionar el movimiento casi sin fricción de la articulación sinovial. El estado del cartílago articular suele utilizarse como indicador principal de la salud articular (Saldivia Paredes, 2022). La degeneración y la lenta o deficiente capacidad de curación del cartílago generalmente determinan el nivel y la progresión de la enfermedad articular. Esto se explica, ya que existe la ausencia de suministro vascular, linfático y neural que hace que el cartílago sea un tejido único y determina su dependencia de la difusión para el suministro de nutrientes y la eliminación de desechos. Los suministros nutricionales, llamados solutos nutricionales, se difunden desde los vasos subintimales a través de la capa íntima de la membrana sinovial hacia el líquido sinovial (Frisbie, 2012) y de la matriz extracelular (MEC), que está formada por fibrillas de colágeno tipo dos en un 15%, proteoglicanos en un 10% y agua en un 75%, actuando como una estructura de marco alrededor de las células, llegando hasta el cartílago articular el cual está constituido por condrocitos (Van Weeran, 2014). La principal función de la MEC es absorber y transferir cargas de impacto (McIlwraith, 2005; Sommer, 2012).

1.6.1. Condrocitos

El contenido de condrocitos en el cartílago articular típicamente representará entre el 1% y el 12% del volumen del cartílago (Frisbie, 2012). La morfología y el metabolismo de los condrocitos variarán según su profundidad dentro del cartílago, y estará presente la existencia de lagunas, que crearán un microambiente alrededor de estos. Los condrocitos poseerán prolongaciones citoplasmáticas que se extenderán hacia la región interterritorial y parecerán percibir el entorno bioquímico y biomecánico. Estas prolongaciones serán un mecanismo mediante el cual los condrocitos responderán a la carga ejercida sobre el cartílago articular (Chávez, 2010). Bajo condiciones de estrés mecánico leve, el metabolismo de los condrocitos favorecerá los procesos catabólicos, mientras que en

niveles fisiológicos normales predominarán los procesos anabólicos, logrando un equilibrio metabólico. En contraste, niveles superfisiológicos de estrés favorecerán el catabolismo, posiblemente debido a una vía anabólica sobrecargada (Ross, 2011). Además, las alteraciones en la presión de la matriz extracelular causadas por cambios bioquímicos también podrán dirigir el metabolismo de los condrocitos. La regulación al alza del anabolismo tanto de la síntesis de agregano como de colágeno parecerá ser uno de los primeros cambios detectados en los procesos de osteoartritis (Frisbie, 2012).

En la osteoartritis, diversos polipéptidos o citocinas (glucoproteínas extracelulares hidrosolubles) serán producidos por distintos tipos de células en el sitio de la lesión, incluyendo las del sistema inmunológico mediante la activación de proteinocinas activadas por mitógenos. Su mecanismo de acción será predominantemente paracrino y autocrino. Un mismo tipo de citocina podrá ser secretado por diferentes células, y una sola citocina podrá tener efectos en múltiples tipos celulares (McIlwraith, 2005). Además, las citocinas presentarán redundancia funcional, ya que diferentes citocinas podrán desencadenar efectos similares. Estas moléculas frecuentemente actuarán en cascada: una citocina podrá estimular a sus células blanco para que produzcan más citocinas. También controlarán la producción y acción de otras citocinas, como las proinflamatorias o antiinflamatorias, en función de una noxa. Entre las citocinas proinflamatorias más relevantes se encontrarán las interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 y el factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α) (Elkhenany, 2024). Estas moléculas serán esenciales para dirigir la respuesta inflamatoria hacia las áreas de infección o lesión, promoviendo una adecuada cicatrización. Sin embargo, una producción excesiva de citocinas proinflamatorias podrá desencadenar efectos sistémicos adversos, como inestabilidad hemodinámica o alteraciones metabólicas (Barros de Oliveira et al., 2011).

El FNT- α será producido principalmente por monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, células NK y leucocitos polimorfonucleares, aunque también podrá ser secretado por otros tipos celulares, como los adipocitos. Esta molécula desempeñará un papel clave en diversas funciones biológicas, incluyendo la inducción de apoptosis, la citotoxicidad dirigida a células tumorales y la activación y diferenciación de monocitos (Elkhenany, 2024). Además, promoverá la maduración de precursores inmaduros hacia monocitos funcionales y potenciará las capacidades bactericidas y parasiticidas de los macrófagos

mediante la activación de las vías del superóxido y del óxido nítrico. El FNT- α también regulará la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, facilitando la migración de leucocitos hacia los tejidos afectados. Sin embargo, cuando se producirá en cantidades excesivas, el FNT- α podrá contribuir a diversos procesos patológicos, como en infecciones graves, inflamación, sepsis, enfermedades autoinmunes y ciertos tipos de cáncer, destacando su papel en la fisiopatología de condiciones agudas y crónicas como la osteoartritis (OA), una enfermedad degenerativa articular (Ramírez et al., 2012).

Por lo tanto, las citocinas y el FNT- α desempeñarán un papel clave en la progresión de la enfermedad OA, promoviendo tanto la inflamación como el catabolismo. Entre las citocinas proinflamatorias más relevantes se encontrarán la IL-1 y el factor de necrosis tumoral alfa, cuyos receptores estarán sobre expresados en el cartílago articular afectado por la OA. La activación de estos receptores generará efectos negativos en el metabolismo de los condrocitos (Caron, 2011) y otras estructuras que conforman la articulación, como la membrana sinovial, la cual desempeñará un papel importante en el desarrollo de la OA, ya que responderá al daño mediante activación de vías de señalización celular enzimática, convirtiéndose en una importante fuente de mediadores inflamatorios (Ross et al., 2012). Esto desencadenará la remodelación del hueso subcondral y los osteofitos por la cascada de eventos en el cartílago, que incluirá la muerte de condrocitos, microfisuras de la matriz y alteración de la estructura de colágeno producto de la inflamación (Bertuglia, 2016).

Esta patología podrá ser determinada mediante el uso de exámenes complementarios como el diagnóstico por imágenes, entre los cuales se encontrarán las radiografías, gammagrafías, resonancias magnéticas, ultrasonido y tomografía computarizada. También se podrán realizar otros procedimientos, que incluirán artroscopias y biomarcadores, además del examen clínico del sistema musculoesquelético del individuo (Jara et al., 2016).

En cuanto a los biomarcadores, estos permitirán evaluar procesos como la reparación, síntesis, degradación, aumento del tejido óseo y sinovitis, lo que los convertirá en herramientas útiles para cuantificar dichos fenómenos (Kidd, 2001). Los biomarcadores

serán herramientas útiles para esclarecer procesos patobiológicos en las articulaciones, diferenciar entre articulaciones sanas y afectadas, evaluar el grado de degradación del cartílago articular, monitorear la respuesta a los tratamientos y proporcionar un pronóstico (Frisbie et al., 2012).

Según lo anteriormente expuesto, se planteará la siguiente pregunta: ¿Será el factor de necrosis tumoral alfa un biomarcador que pueda ser utilizado como método complementario para prevenir la osteoartritis en caballos de deporte ecuestre en la región del Biobío?

2. HIPÓTESIS

2.1. H0: No existe una diferencia significativa en las concentraciones séricas de FNT- α entre los caballos de deporte ecuestre con osteoartritis y los caballos sanos.

2.2. H1: Si existe una diferencia significativa en las concentraciones séricas de FNT- α entre los caballos de deporte ecuestre con osteoartritis y los caballos sanos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la utilidad de la concentración sérica del factor de necrosis tumoral alfa como biomarcador para el diagnóstico del proceso de osteoartritis en caballos de deporte ecuestre.

3.2. Objetivos específicos

1. Comparar las concentraciones séricas del factor de necrosis tumoral alfa entre caballos con osteoartritis y caballos sanos de la región del Biobío.
2. Evaluar la variación de la concentración sérica de factor de necrosis tumoral alfa según la localización de la osteoartritis en miembros anteriores y miembros posteriores.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

- Ficha Clínica del hospital clínico veterinario universidad San Sebastián área equinos.
- Lápiz azul.
- Libreta.
- Consentimiento informado.
- Pinza de casco.
- Fonendoscopio.
- Termómetro.
- Jeringas de 5 mL marca NIPRO por 100 unidades.
- Aguja hipodérmica de 21G x 32mm caja por 100 unidades.
- Torulas de algodón de 0,5 g, premium de 100 unidades marca Cranberry.
- Alcohol desinfectante, solución al 70% v/v de 500 mL, marca Difem Profesional.
- Tubos BD Vacutainer® SST™, Suero con gel separador, tubo amarillo, 13x75 mm, 3,5 mL por 100 unidades.
- Caja de guantes de examen de nitrilo, talla M, sin polvo, por 100 unidades, marca TRESOR.
- Marcador Sharpie punta fina, negro.
- Centrifuga ROTOFIX 32 A, Hettich.
- Plantilla Excel para Microsoft 365 MSO (versión 2409 compilación 16.0.18025.20160) de 32 bits, para llevar el registro de los pacientes.
- Jáquima y cordel para realizar la correcta sujeción del paciente.
- Gradilla soporta tubos.

- Cooler de 4.0 litros marca WENCO.
- Gel pack refrigerante de 18 cm x 12 cm, de 150 grs, marca ECOMPANY.
- Equine TNF Alpha Reagen Kit. Código ESS0017. Thermo Fisher Scientific.
- Computador portátil marca HP, Windows 11.
- Lector de microplacas, marca BIOTEK, modelo EPOCH.

4.2. Métodos

El presente indaga en estudios con caballos de deportes ecuestres y el número de individuos a utilizar será de 32 por conveniencia. El mismo parte de dos grupos, uno será de control que hace referencia a los caballos que están clínicamente sanos y el segundo grupo es de caballos que presenten procesos de osteoartritis.

Ambos grupos serán clasificados como sanos o con procesos de osteoartritis, según la anamnesis individual, el motivo de consulta y el examen clínico, que incluirá una inspección a distancia. Posteriormente, se realizará un examen físico enfocado en el examen musculo esquelético, evaluando la locomoción de los caballos al paso, al trote y en estación. Durante esta evaluación, se llevará a cabo una palpación con movimientos articulares, incluyendo maniobras de flexión y extensión forzada, con el objetivo de identificar signos de malestar o dolor. Esta revisión se aplicará tanto a los miembros anteriores como posteriores de cada animal. Además, se registrarán las constantes fisiológicas, considerando los rangos normales en equinos, que son (Chávez, 2010):

- Frecuencia cardiaca: Desde 28 hasta 40 latidos por minuto (lpm).
- Frecuencia respiratoria: Desde 8 hasta 18 ciclos por minuto (cpm).
- Temperatura: Desde 37,5°C +/- 5 o 37,2 hasta 38,5°C.
- Tiempo de retorno del pliegue cutáneo (TRPC): Menor a 2 segundos (<2 seg).
- Tiempo de rellene capilar (TRC): Menor a 2 segundos (<2 seg).
- Condición corporal (C/C): Deberá estar en 3 que es la condición ideal, haciendo uso de la escala de 1-5.

Todo lo anterior, será realizado por un médico veterinario especializado en el área, el cual determinará si el paciente es un caballo sano o un caballo que cursa con patología muscular esquelética relacionada a osteoartritis.

El grupo experimental y grupo control estarán conformados por individuos que llegarán al Hospital Clínico de la Universidad San Sebastián, campus Las Tres Pascualas en la ciudad de Concepción y también se incluirán pacientes externos de las localidades de: Boca Sur, San Pedro de la Paz y Menque en la comuna de Tomé. Se evaluarán a través de los exámenes anteriormente mencionados, pero además solo si es posible se hará uso de exámenes complementarios como radiografías y/o ecografías, de igual forma su evaluación será tanto en ambos miembros anteriores como en los miembros posteriores.

El tipo de muestra a utilizar es de sangre, la cual será extraída de cada uno de los individuos seleccionados, estas muestras se depositan en tubos de tapa amarilla con gel separador, de 3,5 ml y se almacenarán en un cooler de 4L con gel packs previamente congelados para mantener así la cadena de frío. Para llevar a cabo esto, se deberán realizar procedimientos de sujeción directamente en campo y haciendo uso de los diferentes métodos de sujeción existentes para la especie de ser necesario.

Se debe tener en consideración, la posible previa administración de antiinflamatorios y/o antibióticos por parte de los propietarios al paciente, ya que esto podría alterar el resultado de las muestras obtenidas. Cabe destacar que no se realiza la categorización de la OA de los individuos que participan de este estudio.

4.2.1. Preparación de las muestras

1. Al llegar al laboratorio las muestras serán centrifugadas a 3500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Las muestras de suero obtenidas deberán encontrarse libre de lipemia y hemolisis, ya que estas son variables que afectarán la metodología a utilizar en el estudio.
3. Los reactivos que serán utilizados en el desarrollo del trabajo práctico deberán encontrarse a temperatura ambiente al momento de llevar a cabo el procesamiento de las muestras.
4. Preparación y realización de las placas.

4.5. Análisis de datos

Dado que los valores de FNT- α no presentaron una distribución normal en ninguno de los grupos evaluados, lo cual fue determinado mediante las pruebas de Shapiro-Wilk, y considerando además la presencia de censura inferior en los datos (valores reportados como “menor a 7.8 pg/mL”), se aplicaron dos enfoques estadísticos complementarios para el análisis.

En primer lugar, se utilizó un modelo de regresión Tobit, adecuado para variables dependientes con datos censurados, con el objetivo de estimar el efecto del grupo (caballos sanos vs caballos con osteoartritis) sobre concentraciones séricas de FNT- α . Este modelo permitió ajustar los valores observados considerando la limitación en la detección del límite inferior del ensayo. En segundo lugar, se utilizó la prueba no paramétrica de rangos de Wilcoxon Mann-Whitney para comparar las distribuciones de FNT- α entre ambos grupos, sin asumir la normalidad de los datos. Además, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las concentraciones séricas de FNT- α entre los caballos con osteoartritis en miembros anteriores y posteriores. Esta prueba no paramétrica fue elegida debido a que las concentraciones séricas de FNT- α no seguían una distribución normal, según los resultados previos del análisis de normalidad. Estos análisis realizados utilizando el entorno estadístico SAS Studio (SAS OnDemand for Academics).

5. RESULTADOS

Se estudiaron 32 caballos, con una incidencia significativa de diagnóstico de osteoartritis. El examen clínico reveló que la patología se localizaba principalmente en las extremidades, principalmente en los miembros anteriores, como la articulación OE2 (segundo miembro anterior derecho). Se cuantificó la concentración sérica del factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α) en todas estas muestras para evaluar su posible correlación con la localización y la incidencia de la osteoartritis. También se realizaron pruebas estadísticas mediante modelos de regresión de Tobit y pruebas no paramétricas como Wilcoxon Mann-Whitney y Kruskal Wallis para comparar las diferencias significativas entre los caballos enfermos y sanos, así como en función de la localización de la enfermedad en los diferentes miembros.

El análisis mediante el modelo de regresión Tobit no mostró diferencias significativas en las concentraciones séricas de FNT- α entre los caballos sanos y aquellos con osteoartritis ($p > 0.05$). Asimismo, la prueba no paramétrica de Wilcoxon Mann-Whitney indicó que no hubo diferencias significativas en las distribuciones de FNT- α entre ambos grupos ($p > 0.05$).

Los resultados obtenidos luego de realizar la prueba de Kruskal Wallis sugieren que la localización de la OA no tiene un impacto significativo en las concentraciones séricas de FNT- α , dado que el valor p fue mayor que el umbral de significancia utilizado ($\alpha = 0.05$), por lo que se concluye que no hay evidencia para rechazar la hipótesis nula ($p = 0.6200$), y no hay diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones de FNT- α en función de la localización de la osteoartritis en los miembros anteriores o posteriores.

En este estudio se evaluó la utilidad de la concentración sérica del FNT- α como biomarcador diferencial entre caballos de deporte ecuestre clínicamente sanos y aquellos diagnosticados con osteoartritis (OA). Los resultados estadísticos obtenidos y la información publicada en otros estudios permiten extraer las siguientes consideraciones:

Tabla 1: Resumen de los resultados obtenidos con la técnica de ELISA de los caballos con osteoartritis y los caballos sanos.

TNF-ALFA ENFERMOS pg/mL	TNF-ALFA SANOS pg/mL
menor a 7,8	menor a 7,8
menor a 7,8	menor a 7,8
menor a 7,8	menor a 7,8
menor a 7,8	menor a 7,8
menor a 7,8	menor a 7,8
menor a 7,8	menor a 7,8
menor a 7,8	menor a 7,8
menor a 7,8	291
menor a 7,8	231
menor a 7,8	menor a 7,8
menor a 7,8	701
711	menor a 7,8
menor a 7,8	menor a 7,8
menor a 7,8	246
796	menor a 7,8
menor a 7,8	
21	

Resultados principales del análisis estadístico

El modelo Tobit donde la censura inferior es de 7.8 pg/mL y su coeficiente asociado a la categoría enfermo es de 139,8 pg/mL (EE= 330.1 pg/mL; $p = 0.67$), no tiene un efecto significativo sobre las concentraciones de FNT- α .

Las comparaciones no paramétricas y paramétricas, en las cuales se utiliza la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney: $Z \approx 0,47$; $p = 0.32$, sin diferencias en la distribución de FNT- α entre grupos.

La proporción elevada de datos censurados, donde el 78% de las muestras (25/32) se sitúan en el límite inferior del ensayo, indicando valores séricos generalmente indetectables.

Estos hallazgos llevan a aceptar la hipótesis nula (H_0): no existe diferencia significativa en la concentración sérica de FNT- α entre caballos sanos y aquellos con OA.

6. DISCUSIÓN

Los hallazgos de este estudio concuerdan con la literatura que describe la discrepancia entre las concentraciones de FNT- α en líquido sinovial y en suero. Experimentos *ex vivo* han demostrado incrementos locales pronunciados de FNT- α tras la estimulación inflamatoria de cartílago equino, sin un aumento paralelo en la circulación sistémica. A nivel articular, el eje TNF- α -TSG-6 promueve la formación de complejos hialuronato-pesa (HC-HA) de naturaleza proinflamatoria y acelera la degeneración del cartílago, lo que subraya la acción principalmente local de esta citocina (Fasanello et al., 2021).

En estudios clínicos las concentraciones de FNT- α en líquido sinovial se elevan sobre todo durante episodios agudos de sinovitis o lesiones traumáticas recientes, mientras que en la OA crónica tienden a normalizarse (Perrone, 2016). Esta dinámica explica la elevada proporción de valores séricos por debajo del límite de detección observada en el presente trabajo tanto en caballos sanos como en los enfermos (Elkhenany, et al, 2024; Jasiński et al., 2024).

Además, los buenos resultados preliminares obtenidos con la administración intraarticular de anticuerpos anti- FNT- α en equinos, que reducen la claudicación y mejoran la función articular, respaldan la relevancia terapéutica de esta vía, aun cuando la medicación del FNT- α no resulte diagnóstica (Fasanello et al., 2021; Elkhenany et al., 2024).

En cuanto a la interpretación fisiopatológica se puede encontrar que:

La producción local y vida media breve del FNT- α se sintetiza principalmente por sinoviocitos y condrocitos en respuesta al daño articular; su vida media plasmática es inferior a 30 min, lo que explica la rápida depuración sistémica y la dificultad para detectarlo en suero (Caron, 2011; Elkhenany et al, 2024). Además, el volumen sanguíneo total del equino (\approx 8% del peso corporal) diluye aún más la citocina liberada desde articulaciones relativamente pequeñas, atenuando las concentraciones sistémicas (Anderson et al., 2020).

La mayoría de los caballos con OA incluidos presentaban lesiones establecidas; en modelos *ex vivo* los picos de FNT- α se observan durante las primeras 24 a 48 horas

después de la formación de una noxa inflamatoria, disminuyendo en fases crónicas (Jasiński et al., 2024).

Limitaciones del estudio

Una de las limitaciones presentadas en este estudio fue el tamaño muestral y poder estadístico ya que un total de 32 ejemplares otorga un poder <0.80 para detectar diferencias pequeñas, según estimaciones clásicas de sensibilidad de pruebas biomédicas (Jasiński, 2024).

En cuanto al diseño transversal de este, la toma única de muestras impide caracterizar variaciones temporales del FNT- α , ya descritas tras ejercicio o intervenciones terapéuticas (Perrone, 2016).

Además, se debe tener en cuenta la ausencia de estratificación por severidad, puesto que no se diferenciaron los grados radiológicos ni el nivel de sinovitis, variables que modulan la producción local de FNT- α (Caron, 2011).

Implicancias clínicas y proyecciones

El valor diagnóstico limitado del FNT- α sérico y su escasa sensibilidad, sugiere que no debe utilizarse como marcador único para OA crónica; su ausencia no descarta la enfermedad (Fasanello et al., 2021).

Se recomienda combinar citocinas (IL-1 β , IL-6), fragmentos de colágeno II y lubricina tanto en suero como en líquido sinovial para aumentar la sensibilidad y especificidad (Anderson et al., 2020).

Se sugiere realizar estudios longitudinales ya que estos diseños con muestreos seriados antes y después del ejercicio controlado o tratamientos podrían detectar picos transitorios de FNT- α que pasen inadvertidos en un corte transversal (Jasiński et al., 2024).

En cuanto al potencial terapéutico, el bloquear la vía del FNT- α en estadios tempranos o agudos ha demostrado reducir la cojera y la degradación del cartílago, lo que refuerza su interés como diana intraarticular (Elkhenany et al., 2024).

7. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio muestran que la concentración sérica de FNT- α no discrimina entre caballos sanos y aquellos con osteoartritis (OA) crónica, ni varía según la localización de la lesión, ya sea en miembros posteriores o miembros anteriores. Además, la elevada proporción de valores por debajo del límite de detección impidió relacionar la citocina con el grado de severidad articular.

En conjunto, estos hallazgos respaldan la idea de que la acción patogénica del FNT- α es predominantemente local y confirman que su medición en suero carece de valor diagnóstico cuando se usa de forma aislada. Por ello, se recomienda integrar biomarcadores sinoviales y paneles combinados como pueden ser otras citocinas y fragmentos de cartílago para mejorar la detección temprana y el seguimiento clínico de la OA en caballos de deporte ecuestre.

Se debe aclarar que este estudio no cumple con los estándares necesarios para poder afirmar que los resultados entregados son fidedignos, debido a que no se controlaron algunos factores que pudieron afectar de forma directa las mediciones, entre estos se encuentran la temperatura del laboratorio al momento de realizar la técnica, el no haber realizado exámenes previos a los caballos participantes como hemogramas para descartar patologías previas que pudieran alterar los resultados y finalmente el mismo kit utilizado, ya que el fabricante entre sus advertencias informa que los resultados no son válidos para realizar diagnósticos sino que solo se debe utilizar para estudios y propósitos investigativos.

8. REFERENCIAS

- Anderson, J. R., Phelan, M. M., Foddy, L., Clegg, P. D., & Peffers, M. J. (2020). Ex Vivo Equine Cartilage Explant Osteoarthritis Model: A Metabolomics and Proteomics Study. *Journal of Proteome Research*, 19(9), 3652–3667.
<https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00143>
- Andrades, A. (2013). *La artritis en el caballo, ¿una patología fatal?*. Portal Veterinaria. Consultado el 13 de diciembre de 2024, de <https://shorturl.at/tBfcY>
- Barros de Oliveira, C., Kimiko, R., Machado, A., Gerola, R., & Salomão, R. (2011). Citocinas y Dolor. *In Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61(2), 137- 142.
<https://shorturl.at/C5X15>
- Bassage, L. H., & Ross, M. W. (2). Enostosis-like lesions in the long bones of 10 horses: scintigraphic and radiographic features. *Equine veterinary journal*, 30(1), 35-42.
- Bertone, A. (2008). Joint physiology: responses to exercise and training. In: Hinchcliff, K., Geor, R., & Kaneps, A.(eds). *Equine Exercise Physiology*. Saunders Elsevier, London, UK.
- Bertuglia, A., Lacourt, M., Girard, C., Beauchamp, G., Richard, H., & Laverty, S. (2016). Osteoclasts are recruited to the subchondral bone in naturally occurring post-traumatic equine carpal osteoarthritis and may contribute to cartilage degradation. *Osteoarthritis and Cartilage*, 24(3), 555–566.
<https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.10.008>
- Caron, J. (2011). Arthritis: Osteoarthritis. En Ross, M y Dyson, S (Eds.), *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse* (2a ed., pp. 655-668). Elsevier Saunders.
- Chávez, H., Araya, O., Folch, H., & Morán, G. (2010). Uso de biomarcadores para el diagnóstico de enfermedad articular en el caballo. *Archivos de medicina veterinaria*, 42(1), 1-10. <https://www.scielo.cl/pdf/amv/v42n1/art02.pdf>

- Dyce, K., Sack, W., & Wensing, C. (1996). *Textbook of Veterinary Anatomy*. W.B. Saunders Company, Pennsylvania, USA.
- Elsevier. (2018). *Apuntes de anatomía. Tipos de articulaciones: sinoviales y sólidas*. Consultado el 12 de diciembre de 2024, <https://www.elsevier.com/es-es/connect/anatomia-tipos-articulaciones-sinoviales-y-solidas>
- Elkhenany, H. A., Linardi, R. L., & Ortvad, K. F. (2024). Differential modulation of inflammatory cytokines by recombinant IL-10 in IL-1 β and TNF- α -stimulated equine chondrocytes and synoviocytes: impact of washing and timing on cytokine responses. *BMC Veterinary Research*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04403-2>
- Fasanello, D. C., Su, J., Deng, S., Yin, R., Colville, M. J., Berenson, J. M., Kelly, C. M., Freer, H., Rollins, A., Wagner, B., Rivas, F., Hall, A. R., Rahbar, E., DeAngelis, P. L., Paszek, M. J., & Reesink, H. L. (2021). Hyaluronic acid synthesis, degradation, and crosslinking in equine osteoarthritis: TNF- α -TSG-6-mediated HC-HA formation. *Arthritis Research and Therapy*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s13075-021-02588-7>
- Frisbie, D. D. (2012). Synovial Joint Biology and Pathobiology. In *Equine Surgery, Fourth Edition* (pp. 1096–1114). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0867-7.00078-8>
- Jara, E., & Correa, F. (2016). Osteoarthritis en equinos: descripción, diagnóstico y alternativas terapéuticas. *Sustainability, Agri, Food and Environmental Research*, 4 (3), 16-39. <https://safer.uct.cl/index.php/SAFER/article/view/86>
- Jasiński, T., Turek, B., Kaczorowski, M., Brehm, W., Skierbiszewska, K., Bonecka, J., & Domino, M. (2024). Equine Models of Temporomandibular Joint Osteoarthritis: A Review of Feasibility, Biomarkers, and Molecular Signaling. *Biomedicines* 12(3), 542. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12030542>

- Kidd, J., Fuller, C., & Barr, A. (2001). Osteoarthritis in the horse. *Equine Veterinary Education*, 13(3), 160–168. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2001.tb00082.x>
- Kusch, K. (2013). *Proteína antagonista de receptores de interleukina (IRAP) y sus aplicaciones en la traumatología equina* [Tesina para optar al Título de Especialista en Medicina Deportiva del Equino, Universidad de Buenos Aires]. Repositorio Institucional. <http://www.fvet.uba.ar/fcvanterior/equinos/eqcemde/TESINAhttp://www.fvet.uba.ar/fcvanterior/equinos/eqcemde/TESINA-KUSCH-ALARCON.pdf>
- Loving, N. S. (2010). *Todos los sistemas del caballo*. Editorial Hispano-Europea. [https://books.google.cl/books?hl=es&lr=&id=DAH8mF0rFJkC&oi=fnd&pg=PA191&dq=Loving,+N.+S.+\(2010\).+Todos+los+sistemas+del+caballo.+Editorial+Hispano+Europea&ots=u20M2YP7IA&sig=R3kUQ9rWM3-zpPLdWQF-ug4dNRo&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.cl/books?hl=es&lr=&id=DAH8mF0rFJkC&oi=fnd&pg=PA191&dq=Loving,+N.+S.+(2010).+Todos+los+sistemas+del+caballo.+Editorial+Hispano+Europea&ots=u20M2YP7IA&sig=R3kUQ9rWM3-zpPLdWQF-ug4dNRo&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)
- Mcllwraith, C. (2005). Use of synovial fluid and serum biomarkers in equine bone and joint disease: a review. *Equine Veterinary Journal* 37(5), 473-482. <https://doi.org/10.2746/042516405774480102>
- Perrone, G. (2016). *Diagnóstico de la osteoartritis en el equino relación entre signos clínicos y biomarcadores proinflamatorios en el líquido sinovial* [Tesis para aspirar al título de “Magister de la Universidad de Buenos Aires en Medicina Deportiva del Equino”]. Repositorio Institucional. <https://core.ac.uk/download/pdf/299813043.pdf>
- Ross, T., Kisiday, J., Hess, T., & Mcllwraith, C. (2012). Evaluation of the inflammatory response in experimentally induced synovitis in the horse: A comparison of recombinant equine interleukin 1 beta and lipopolysaccharide. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(12), 1583–1590. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.08.008>
- Ramírez, M., & Sánchez, C. (2012). El factor de necrosis tumoral- α , la resistencia a la insulina, el metabolismo de lipoproteínas y la obesidad en humanos. *Nutrición Hospitalaria*, 27(6), 1751–1757.

https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000600001

Ross, M. W., & Dyson, S. J. (2011). *Diagnosis and management of lameness in the horse* (2nd ed.). Elsevier Saunders.

Saldivia Paredes, M. A., & Yaeger Jaramillo, P. L. (2022). Descripción morfológica y biomecánica de la rodilla del caballo. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 17(3), 46-64. <https://doi.org/10.21615/cesmvz.7008>

Sommer, N. (2012). *Avances en osteoartritis equina* [Memoria para optar al Título de Médico Veterinario, Universidad Austral de Chile]. Repositorio Institucional. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2012/fvs711a/doc/fvs711a.pdf>

Universidad San Sebastián. (s. f.). Guía de estructura para la presentación de trabajos de título profesional o grado académico. Universidad San Sebastián.

Van Weeran, R. (2014). Joint physiology: responses to exercise and training. In: Hinchcliff, K., Kaneps, A., Geor, R. (eds). *Equine Sports Medicine and Surgery* (2nd ed.). Saunders Elsevier, London, UK.

Van Weeran, P., & Brama, P. (2001). Physiology and pathology of the equine joint. *Pferdeheilkunde Equine Medicine*, 17(4), 307-318. DOI:10.21836/PEM20010401

9. ANEXOS

En el cuadro que se presenta a continuación se detalla la información correspondiente a cada uno de los pacientes a los cuales se les tomó una muestra de sangre para realizar este estudio.

Tabla 2: Descripción de la historia clínica de los pacientes muestreados.

ID	RAZA	EDAD	SEXO	HISTORIA CLINICA	DIAGNOSTICO
Caballo					
1	Chileno	10 años	Macho	Claudicación MAI, inicio hace un mes.	Síndrome Navicular MAI
2	Mezcla pelche/chileno	4 años	Hembra	Claudicación ambos MA	Artropatía MA
3	Chileno	10 años	Macho	Claudicación 3/5 MPI	Síndrome Navicular MPI
4	Cuarto de milla	4 años	Hembra	Claudicación 1/5 MAD	Artropatía MAI del nudo
5	Cuarto de milla	6 años	Hembra	Claudicación 4/5 MAI	Fisura en el nudo
6	Cuarto de milla	2 años 4 meses	Macho	Claudicación MPI	Artropatía MPI
7	Cuarto de milla	8 años	Macho	Claudicación 2/5 MPI	Artropatía Nudo
8	Cuarto de milla	3 años	Macho	Claudicación 2/5 MAI	Artropatía carpo izquierdo
9	Cuarto de milla	3 años	Macho	Claudicación 2/5 MAI	Artropatía carpo izquierdo
10	Chileno	10 años	Hembra	Clínicamente sano	Clínicamente sano
11	Cuarto de milla	3 años	Macho	Clínicamente sano	Clínicamente sano
12	Cuarto de milla	5 años	Macho	Clínicamente sano	Clínicamente sano
13	Cuarto de milla	5 años	Macho	Clínicamente sano	Clínicamente sano
14	Cuarto de milla	7 años	Macho	Clínicamente sano	Clínicamente sano
15	Cuarto de milla	6 años	Macho	Claudicación MPI	Artropatía MPI
16	Cuarto de milla	10 años	Macho	Aumento de volumen MP	Artropatía MPI
17	Chileno	12 años	Hembra	Clínicamente sano	Clínicamente sano

ID Caballo	RAZA	EDAD	SEXO	HISTORIA CLINICA	DIAGNOSTICO
18	Cuarto de milla	7 años	Hembra	Clínicamente sano	Clínicamente sano
19	Chileno	1 año 6 meses	Macho	Clínicamente sano	Clínicamente sano
20	De tiro	3 años	Macho	Clínicamente sano	Clínicamente sano
21	Chileno	8 años	Macho	Clínicamente sano	Clínicamente sano
22	Cuarto de milla	8 años	Macho	Aumento de volumen MAD	Artropatía MAD
23	Cuarto de milla	6 años	Hembra	Claudicación MPI	Artropatía MPI
24	Chileno	8 años	Macho	Aumento de volumen MP	Artropatía MPI
25	Cuarto de milla	10 años	Macho	Clínicamente sano	Clínicamente sano
26	Chileno	9 años	Macho	Heridas leves en ambos MP y aumento de volumen en MPI en zona del calcáneo	Artropatía MPI
27	Chileno	7 años	Hembra	clínicamente sano	Clínicamente sano
28	Chileno	8 años	Hembra	Aumento de volumen MPI	Artropatía MPI
29	Cuarto de milla	3 años	Macho	clínicamente sano	Clínicamente sano
30	Cuarto de milla	20 años	Macho	Sufrió de linfangitis	Artrosis leve
31	Chileno	10 años	Macho	clínicamente sano	Clínicamente sano
32	Cuarto de milla	10 meses	Macho	Claudicación 2/5	Artropatía de tarso izquierdo

Los siguientes gráficos mostrarán los resultados en los diferentes tipos de estudios realizados:

Figura 1: Distribución del total de los caballos muestreados por raza.

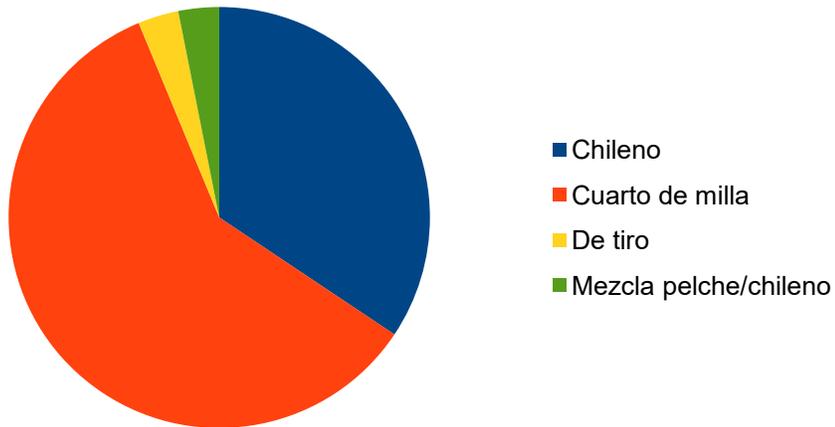


Figura 2: Distribución del total de caballos muestreados por sexo.

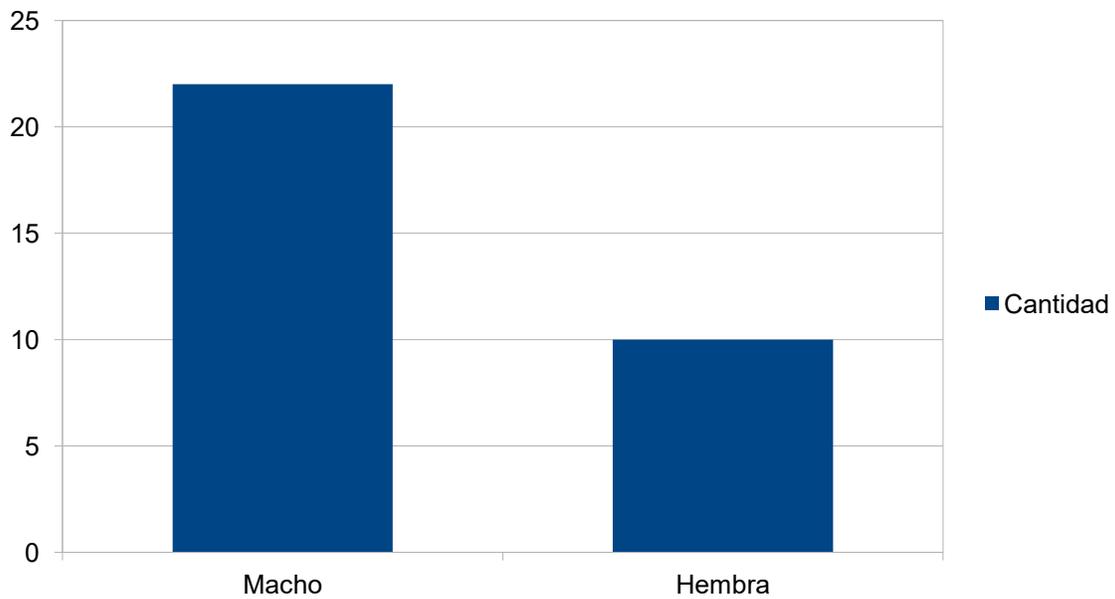


Figura 3: Clasificación de cada uno de los individuos que participaron del estudio según su historia clínica.

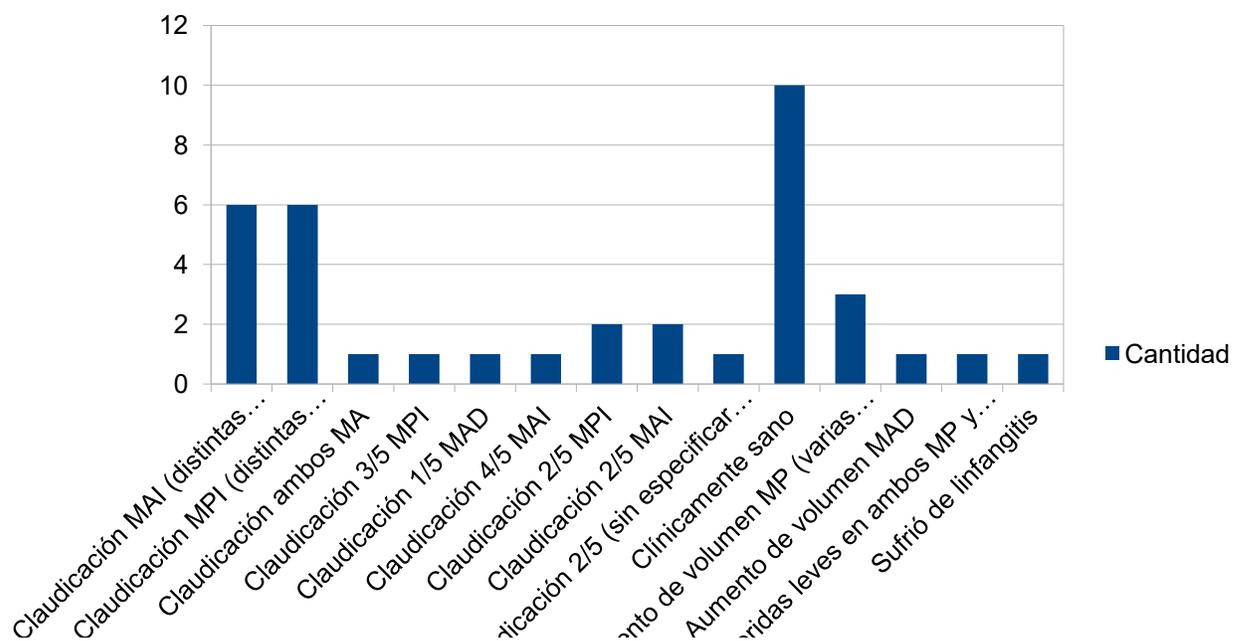


Figura 4: Clasificación por diagnóstico del total de individuos participantes del estudio.

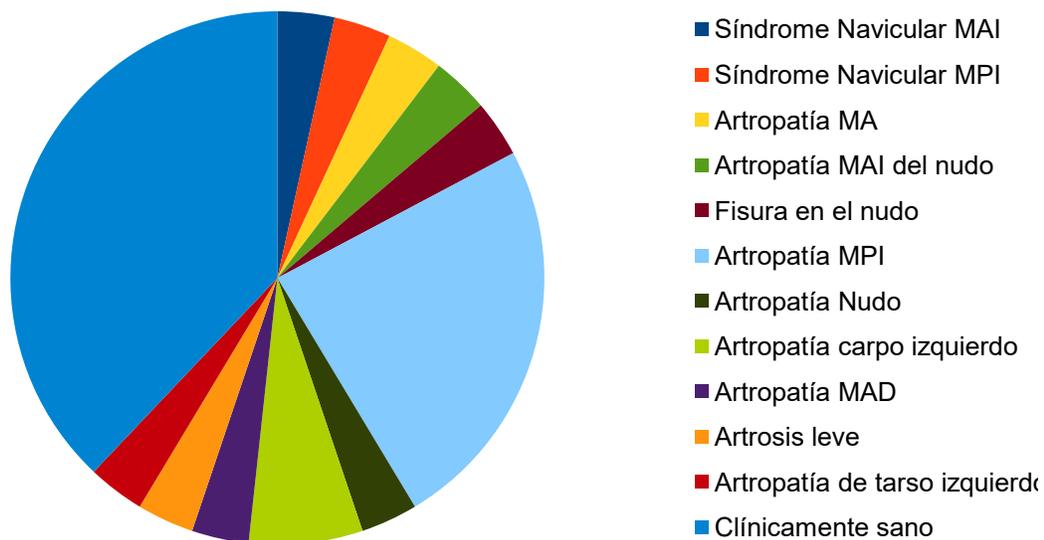


Tabla 3: Resultados de las pruebas de normalidad del FNT- α (Categoría 1).

Variable: TNF-ALFA pg/mL (TNF-ALFA pg/mL)
Categoría = 1

Test para normalidad				
Test	Estadístico		P valor	
Shapiro-Wilk	W	0.575327	Pr < W	<0.0001
Kolmogorov-Smirnov	D	0.422289	Pr > D	<0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq	0.538906	Pr > W-Sq	<0.0050
Anderson-Darling	A-Sq	2.77398	Pr > A-Sq	<0.0050

Tabla 4: Comparación no paramétrica de las concentraciones séricas de FNT- α entre grupos (Prueba de Wilcoxon).

Test de dos muestras de Wilcoxon					
Estadístico	Z	Pr > Z	Pr > Z	Aproximación t	
				Pr > Z	Pr > Z
257.0000	0.4697	0.3193	0.6385	0.3209	0.6418
Z incluye una corrección de continuidad de 0.5.					

Test de Kruskal-Wallis		
Chi-cuadrado	DF	Pr > ChiSq
0.2459	1	0.6200

En cuanto a la evaluación de la concentración de niveles de FNT- α

Para la medición de los niveles séricos de FNT- α , se realizará un ensayo inmunoenzimático para la detección cuantitativa de este marcador inflamatorio en caballos. El protocolo que se utilizará en la metodología será el siguiente:

1. Se agregará un volumen de 100 μ L de cada muestra de suero de caballo por cada pocillo de la tira de ELISA en un análisis en duplicado, una vez agregada la totalidad de los sueros, se llevará a cabo una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente.

2. Concluida esta primera incubación, se hará un lavado a todos los micropocillos utilizando buffer fosfato salino (PBS) de pH 7.2. El lavado se efectuará con 300 microlitros del buffer (μl), procedimiento que será repetido consecutivamente en 3 oportunidades.

3. Después de haber realizado los 3 lavados de cada micropocillo se agregará a cada uno de ellos un volumen de conjugado, el que estará conformado por un segundo anticuerpo de la marca Thermo Fisher marcado con Streptavidina - peroxidasa. A continuación, se llevará a cabo una incubación por 60 minutos a temperatura ambiente.

4. Al cabo de este tiempo se realizarán nuevamente 3 lavados por PBS practicado sobre cada uno de los pocillos con un volumen de 300 μl por cada oportunidad.

5. Finalmente se agregará una solución de TMB (tetrametilbencidina) para generar una reacción colorimétrica, en que la intensidad de color desarrollado será proporcional a la concentración de FNT- α en cada una de las muestras.

6. La reacción final involucrará por lo tanto una producción de color que será leída fotométricamente en el laboratorio de Biotecnología de la sede Tres Pascualas, Concepción. Se realizará una lectura a 450 nanómetros (nm) como longitud de onda y se establecerá una segunda lectura diferencial a 550 nanómetros para eliminar absorbancias inespecíficas y contaminantes de la reacción final. Es decir, a la lectura obtenida a 450 nm se le restará la absorbancia obtenida a 550 nm para minimizar el efecto indicado, procedimiento que se llevará a cabo en un lector de micropocillos de marca BIOTEK, modelo EPOCH.

Simultáneamente al procesamiento de la totalidad de las muestras se realizará el procesamiento de calibradores para elaborar una curva de calibración que permitirá determinar la concentración de FNT- α en cada una de las muestras analizadas y de acuerdo con el nivel de absorbancia de la reacción final. El rango de concentración cubierto por los estándares fue de 1000, 500,250,125,62.5, 31.3, 15.6 y 7.8. Los niveles séricos de FNT- α en las muestras y calibradores se informarán en picogramos por mililitro (pg/mL).

A continuación, se presentan radiografías tomadas en la Universidad San Sebastián, sede Concepción, en las que se observan cambios radiológicos en las estructuras óseas compatibles con la presencia de osteoartritis (OA). Estas imágenes corresponden a cuatro de los pacientes incluidos en el estudio.

Radiografía



Figura 6: Vista latero medial del nudillo izquierdo, se observa una fractura consolidada e inactiva del extremo distal del segundo metatarsiano, presencia de capsula articular mineralizada.



Figura 5: Vista oblicua externa, se observa mineralización de la capsula articular del nudillo, además del colapso articular medial.

Radiografía

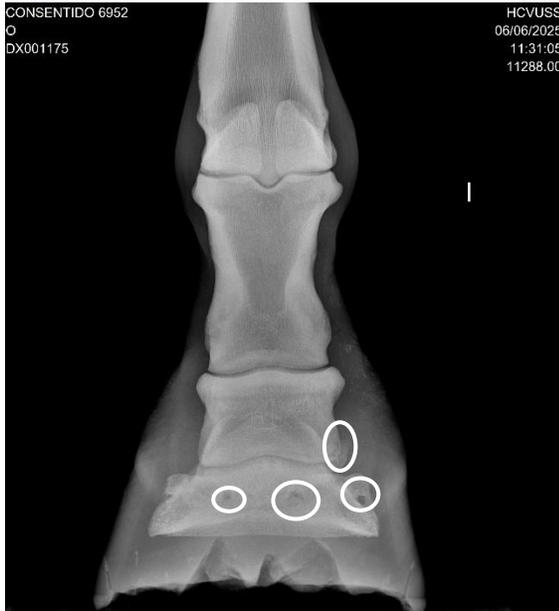


Figura 7: Vista dorsoproximal-palmarodistal del casco del miembro anterior derecho, se encuentra una ligera entesopatía del ligamento colateral del navicular lateral y hay pérdida de diferenciación de las capas compacta y esponjosa además de un aumento de las foraminas sinoviales.



Figura 8: Vista dorsoproximal – palmarodistal oblicua del MAI, se observa entesopatía y mineralización del ligamento colateral del navicular lateral, también hay aumento de las foraminas sinoviales y hay presencia de un quiste subcondral. También se observa hueso esclerótico y pérdida de diferenciación de las capas esponjosas y compactas.

Radiografía



Figura 9: Vista dorsomedial-palmarolateral oblicua de la articulación del carpo derecho, se aprecia colapso articular del carpo metacarpo por el lado lateral.



Figura 10: Vista oblicua externa del miembro posterior derecho, se observa colapso articular metatarso falángica e interfalángica proximal.

PROPÓSITOS Y JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

FUNDAMENTACIÓN CIUDADANO COMÚN: Señale de qué se trata el proyecto, indique el modelo animal y la relevancia principal. (250 palabras)

El proyecto trata sobre la evaluación de la concentración sérica del FNT- α como un biomarcador en la osteoartritis en caballos de deporte ecuestre, esta citocina puede llegar a ser usada como herramienta diagnóstica, preventiva y de monitoreo en cuanto a los tratamientos de la OA para los médicos veterinarios que practican la medicina equina. El FNT- α es una citocina que es secretada por los macrófagos y los linfocitos T, es el mediador clave en las inflamaciones agudas, aunque también puede actuar como mediador en la respuesta inmune crónica. Por otra parte, los caballos son animales domésticos que son para el uso deportivo, recreativo o de trabajo. Son susceptibles a contraer patologías, ya sea por traumas o por desbalances metabólicos, esto asociado al uso que les da el humano.

2: DISEÑO DEL ESTUDIO y JUSTIFICACIONES

Tipo de animal(es) (de laboratorio; granja; silvestre; compañía; Otro)	Especie(s)
Doméstico (de deporte)	Equinos (<i>Equus caballus</i>)

2.1 JUSTIFICACIÓN DEL USO DE ANIMALES Y DE LA ESPECIE SELECCIONADA Justifique por qué requiere usar animales versus modelos alternativos y por qué requiere usar la(s) especie(s) en particular versus otras especies (máximo 250 palabras)

El uso de caballos como especie en particular se justifica por las exigencias físicas a las que están sometidos, como actividades deportivas y laborales que los hacen propensos a padecer afecciones musculoesqueléticas como osteoartritis. Estas condiciones no solo afectan su bienestar y rendimiento, sino que también generan importantes pérdidas económicas para sus propietarios. Es importante mencionar que para efectos de este tipo de estudios no son viables modelos alternativos (como estudios *in vitro* o simulaciones).

2.2 DESCRIPCIÓN DEL DISEÑO DEL ESTUDIO

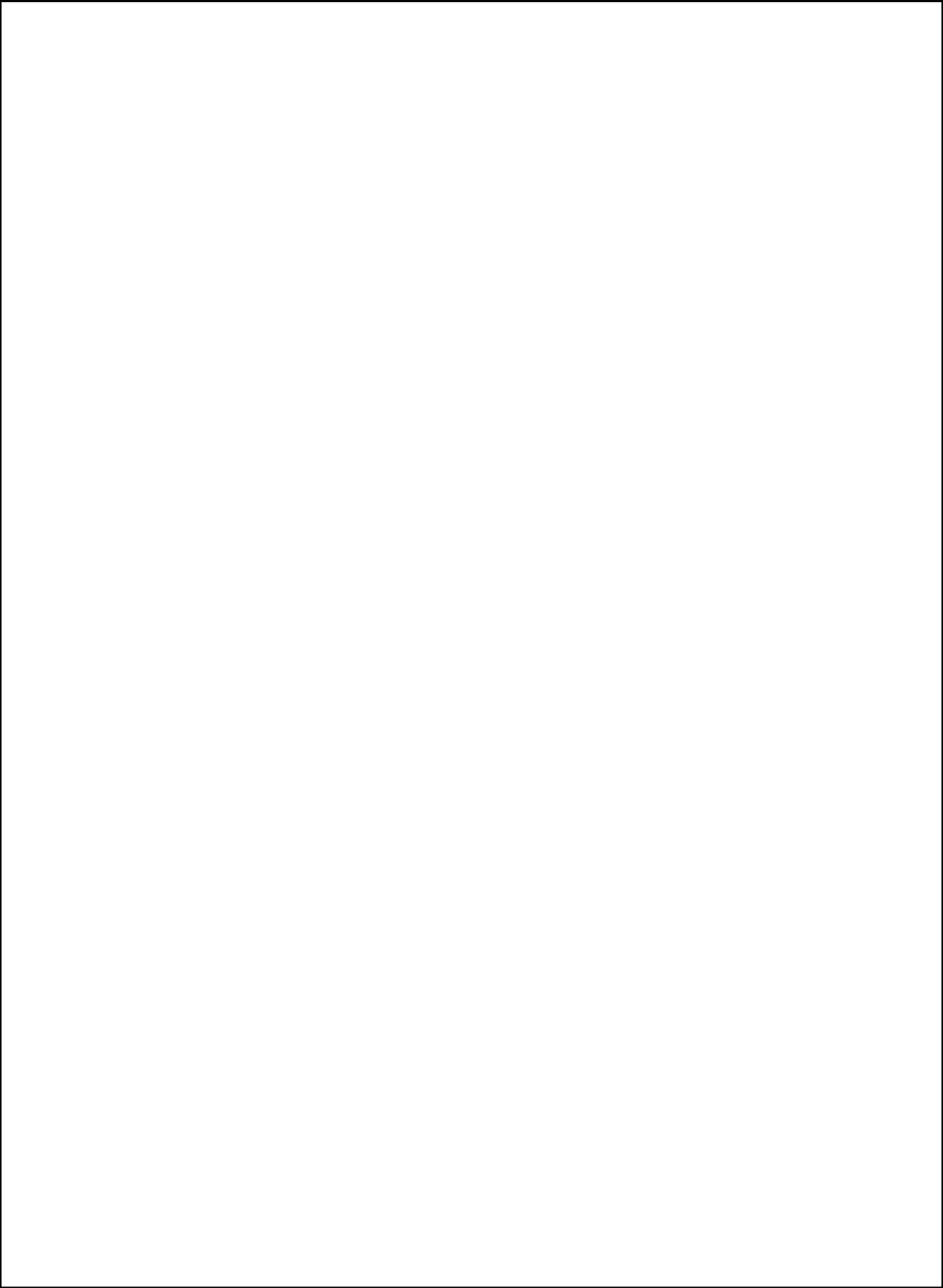
Describa los procedimientos del proyecto y su temporalidad, para cada grupo de animales. Identificar grupos controles y tratamientos en caso de que corresponda. Indique el n (n=número) de cada grupo y el n total por objetivo. Mencione las variables que serán cuantificadas y que serán objeto de análisis estadístico posterior.

Incluir, en caso de que corresponda, zonas geográficas, poblaciones, número de réplicas, número máximo de individuos. Incluir además el método de captura.

Debe incluir uno o más diagrama(s) de flujo, que incluya los grupos de animales, controles, tratamientos, tiempos, n de animales, parámetros/variables a analizar, etc.

El proyecto se desarrollará en tres lugares diferentes, uno está ubicado en Boca Sur, comuna de San Pedro de la Paz, la segunda ubicación es en Menque, comuna de Tomé y el tercer lugar es el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad San Sebastián, en la comuna de Concepción, en la sede Tres Pascualas, las tres localidades hacen parte de la Región del Biobío Chile. Acá se llevarán a cabo los muestreos de los caballos sanos y enfermos desde el 29 de abril hasta el 06 de junio de 2025. Dentro del muestreo el "n" total será de 32 ejemplares por conveniencia, divididos en: grupo A constará de 15 caballos clínicamente sanos y el grupo B constituido por otros 17 individuos que cursarán con osteoartritis, estos antecedentes se obtendrán del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad San Sebastián y de los otros 2 lugares antes mencionados y utilizando criterios médicos, radiográficos o ecográficos. Antes de realizar las muestras, propietarios y/o entrenadores deberán firmar un consentimiento informado sobre el proyecto. De cada caballo se tomará una muestra de sangre de aproximadamente 5 ml por venopunción yugular externa ya sea del lado izquierdo o derecho del segundo tercio de la tabla del cuello del caballo y se conservará en refrigeración hasta su traslado al laboratorio clínico del Hospital Veterinario de la Universidad San Sebastián, Concepción. En el laboratorio, las muestras de sangre se centrifugarán a 3500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para obtener el suero sanguíneo, este se verterá en micropocillos de la tira de ELISA (técnica del Sándwich) en análisis en duplicado, después se llevará a cabo una incubación por 60 minutos a temperatura ambiente, se lavarán los pocillos con un buffer fosfato salino de pH 7,2, esto se repetirá 3 veces, después se añadirá un conjugado con un segundo anticuerpo, se incubará de nuevo por 60 minutos a temperatura ambiente, se lavará de nuevo 3 veces, se agregará TMB (tetrametilbencidina) para generar reacción colorimétrica que nos dirá la concentración del FNT- α presente en las muestras. La reacción colorimétrica será leída por un espectrofotómetro en un lector de micropocillos marca BIOTEK, modelo EPOCH para finalmente poder obtener la concentración del FNT- α en las muestras procesadas esto de acuerdo con los niveles de absorbancia de la reacción final.

FLUJOGRAMA SOBRE MANEJO ANIMAL:



2.3 DETALLE DE ANIMALES A UTILIZAR POR OBJETIVO ESPECÍFICO (OE)

Indique el número de animales a utilizar según especie, cepa, peso, sexo y estado de desarrollo. Verifique que sea coherente con el diagrama de flujo.

OE 1	Descripción objetivo: Comparar las concentraciones séricas del factor de necrosis tumoral alfa entre caballos con osteoartritis y caballos sanos de la región del Biobío.				
	Especie/ Cepa/ Raza:	Edad/ estado desarrollo	Peso	Sexo	Número
	Equino	Potrillos y adultos	250-600 kg	Machos y hembras	32
	Estado de conservación de la especie en Chile (en peligro / vulnerable/rara/N/A) (revisar <u>Ley de caza</u> y <u>clasificación de especies del Ministerio de Medio Ambiente</u>)			Requiere Autorización SAG/ Sernapesca/otro (Si/No)	
	No aplica			Si, propietario o entrenador	
OE 2	Descripción objetivo: Evaluar la variación de la concentración sérica de factor de necrosis tumoral alfa según la localización de la osteoartritis en miembros anteriores y miembros posteriores.				
	Especie/ Cepa/ Raza:	Edad/ estado desarrollo	Peso	Sexo	Número
	Equino	Potrillos y adultos	250-600 kg	Machos y hembras	32
	Estado de conservación de la especie en Chile (en peligro / vulnerable/rara/N/A) (revisar <u>Ley de caza</u> y <u>clasificación de especies del Ministerio de Medio Ambiente</u>)			Requiere Autorización SAG/ Sernapesca/otro (Si/No)	
	No aplica			Si, propietario o entrenador	
OE 3	Descripción objetivo: Analizar la relación entre la concentración de factor de necrosis tumoral alfa y la gravedad de la osteoartritis en caballos estableciendo posibles valores de referencia diagnóstica.				
	Especie/ Cepa/ Raza:	Edad/ estado desarrollo	Peso	Sexo	Número
	Equino	Potrillos y adultos	250-600 kg	Machos y hembras	32
	Estado de conservación de la especie en Chile (en peligro / vulnerable/rara/N/A) (revisar <u>Ley de caza</u> y <u>clasificación de especies del Ministerio de Medio Ambiente</u>)			Requiere Autorización SAG/ Sernapesca/otro (Si/No)	
	No aplica			Si, propietario o entrenador	

2.4 JUSTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE ANIMALES

Justifique número de animales (n) a utilizar, incluya el cálculo del tamaño muestral, incluyendo la/s fórmula/s, valores de variables para el cálculo y fundamente si es que existe una excepción. Considere si tendrá un porcentaje de pérdida de animales y justifique.

Puede apoyarse en <https://www.nc3rs.org.uk/experimental-design-assistant-eda>

El tamaño muestral se determinará mediante muestreo por conveniencia, seleccionando las muestras a partir de una población de equinos disponibles que presenten osteoartritis, con el objetivo de comparar las concentraciones séricas de FNT- α entre estos y equinos clínicamente sanos.

SECCIÓN 3. DETALLE DEL USO DE ANIMALES

3.1 ORIGEN DE LOS ANIMALES (identifique el origen de los animales)

Menque, comuna de Tomé, Boca Sur, comuna de San Pedro de la Paz, Región del Biobío y Hospital Clínico de la Universidad San Sebastián, comuna de Concepción, sede las Tres Pascualas, Región del Biobío, Chile.

3.2 MANTENCIÓN DE LOS ANIMALES:

Lugar de mantención durante el desarrollo del estudio	El animal no será trasladado de su origen
Encargado del lugar de mantención (Nombre y correo electrónico)	No aplica
¿Se utilizará enriquecimiento ambiental? Descríbalo o justifique la no utilización	No será necesario debido a la corta duración del muestreo
Características del lugar de mantención: Densidad animal, área disponible por animal, tipo de comida, disponibilidad de agua, etc. Condiciones de temperatura, humedad y fotoperíodo	No aplica
Lugar de procedimientos y su ubicación física	No aplica
Método(s) de Identificación del animal	A través del propietario o entrenador, identificando al caballo con el nombre, número o filiación, también por número de ficha.
En caso de transporte de los animales, describa las condiciones en que se realizará el movimiento de estos y la duración del viaje.	No aplica

SECCIÓN 4. PROCEDIMIENTOS A REALIZAR CON LOS ANIMALES

<p>4.1 PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS Detalle los procedimientos NO QUIRÚRGICOS, incluyendo aquellos realizados bajo anestesia. Ejemplos: administración de sustancias, obtención de muestras, métodos de sujeción o inmovilización, etc. Indicar en detalle las vías de administración, de obtención de muestras, características del material a utilizar, frecuencia, volumen, etc.</p>
<p>Obtención de muestra sanguínea de aproximadamente 5 ml por venopunción yugular externa que puede realizarse tanto del lado derecho como del izquierdo del segundo tercio de la tabla del cuello del caballo con implementos mínimamente invasivos como agujas NIPRO 21G con jeringas de 5 mL marca NIPRO para depositar de forma rápida la sangre en tubos amarillos con gel separador Vacutainer al vacío. Este procedimiento se realizará una vez, de forma rápida mediante los métodos de sujeción existentes para la especie para mantener la seguridad de las personas y del animal.</p>

<p>4.2 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS Escriba aquí el detalle de los procedimientos quirúrgicos a realizar:</p>			
No aplica			
<p>a) Indique las medidas de apoyo intraoperatorio. Marcar con una X.</p>	<input type="checkbox"/>	Suero	<input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/>	Calor (indique cómo lo proporcionará):	
	<input type="checkbox"/>	Otro (indique):	
<p>b) Métodos de asepsia durante la cirugía:</p>			
<p>c) Condiciones del lugar donde se efectuará el procedimiento quirúrgico.</p>			
<p>d) Si el o los procedimientos(s) quirúrgico(s) incluye(n) supervivencia del animal, defina la duración y cuidado del periodo postoperatorio inmediato y mediato. Indique la frecuencia de los cuidados. Identifique a la persona responsable.</p>			

SECCIÓN 5. BIENESTAR ANIMAL

5.1 IMPACTO EN EL BIENESTAR ANIMAL

¿Se espera que los procedimientos no-quirúrgicos o quirúrgicos tengan un impacto negativo en el bienestar animal que pueda ser reducido a través de un manejo adecuado?

Explique el manejo adecuado según el impacto esperado

Se espera que los procedimientos realizados, como la obtención de muestras sanguíneas tengan un impacto mínimo en el bien estar animal. Para mitigar el estrés temporal o incomodidad del animal, se deben implementar las siguientes medidas de manejo: Sujeción adecuada, personal capacitado y experimentado en el manejo de equinos, insumos médicos de calidad adecuada y de único uso, además de un ambiente controlado y tranquilo.

5.2 SUPERVISIÓN

Indique frecuencia y periodo de supervisión de los animales en caso de ser requerido. Recuerde esta información también debe quedar establecida en la pauta de supervisión, ficha clínica o de hospitalización de los animales.

Se realizará el procedimiento una vez y no requerirá mantener al animal bajo supervisión posteriormente

¿Anexa la (s) pauta(s) de supervisión de los animales o no aplica?, marcar con una X

Recuerde esta pauta deberá ser ESPECÍFICA, es decir, aplicable al procedimiento al que se va a someter cada animal.

	SI
x	NO
	N/A

5.3 ANESTESIA Y ANALGESIA

Indique los compuestos que utilizará para inducir anestesia, analgesia y otros cuidados paliativos, es decir, incluya antiinflamatorios, tranquilizantes y sedantes. En caso de que utilice compuestos para revertir el efecto de la anestesia, inclúyalo.

Detallar nombre del compuesto, dosis, vía de administración y frecuencia

No aplica

SECCION 6. FINAL

Si el estudio implica un procedimiento que debido a su naturaleza podría tener que interrumpirse, si el estudio implica eutanasia o el procedimiento quirúrgico está asociado a la posibilidad de tener que eutanasiar al animal, debe completar las siguientes tablas:

6.1. CRITERIOS INTERRUPCIÓN CON SOBREVIVENCIA

Describa el o los criterios para interrupción del trabajo con animales y los indicadores que permitirán una sobrevivencia en condiciones de bienestar adecuadas

No aplica

6.2. CRITERIOS Y MÉTODOS DE EUTANASIA COMO PUNTO FINAL HUMANITARIO o FINAL DEL ESTUDIO

Describa el o los criterios para interrupción del trabajo con animales que indicarían la eutanasia y los métodos correspondientes (método, compuesto, dosis y vía)

No aplica.

Puede ingresar a link: [AVMA Euthanasia 2020](#). (American Veterinary Medical Association Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition) y consultar los métodos aceptados por especie.

6.3. FECHAS DE EJECUCIÓN de los procedimientos con animales. Incluya carta Gantt

Toma de muestra en caballos sanos: Desde el 29 de abril hasta el 06 de junio del 2025.

Toma de muestras en caballos enfermos: Desde el 29 de abril hasta el 06 de junio del 2025.

Preparación de las muestras de animales sanos: Desde el 29 de abril hasta el 06 de junio del 2025.

Preparación de las muestras de animales enfermos: Desde el 29 de abril hasta el 06 de junio del 2025

Realización ELISA: Desde 06 de junio hasta el 10 de junio del 2025.

Obtención de resultados: Desde el 06 de junio hasta el 10 de junio del 2025.

Nº	Actividades	Abril					Mayo					Junio					Julio					
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
1	Toma de muestra caballos sanos																					
2	Toma de muestra caballo enfermo																					
3	Preparación de las muestras de animales sanos																					
4	Preparación de las muestras de animales enfermos																					
5	Realización ELISA																					
6	Obtención de resultados																					