

31



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACION DE ESTACIONALIDAD
REPRODUCTIVA EN OCELOTES (*Leopardus pardalis*)
HEMBRAS MANTENIDAS EN CAUTIVERIO POR
MEDIO DE RADIOINMUNOANALISIS EN HECES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
SANDRA ELIZABETH HERNANDEZ MENDEZ

ASESORES: MVZ. DULCE MARIA BROUSSET HERNANDEZ JAUREGUI
DRA. MARTA ROMANO PARDO



MEXICO, D. F.

2002

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

**DETERMINACIÓN DE ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA EN
OCELOTES (*Leopardus pardalis*) HEMBRAS MANTENIDAS EN
CAUTIVERIO POR MEDIO DE RADIOINMUNOANÁLISIS
EN HECES.**

**Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

de la

**Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista**

por

Sandra Elizabeth Hernández Méndez.

Asesores: MVZ. Dulce María Brousset Hernández Jauregui.

Dra. Marta Romano Pardo.

México, D.F., 2002.

DEDICATORIA.

A mis padres Alfonso y Viky y a mi hermano por su apoyo y paciencia.

A Angélica que nos ha adoptado como su familia y que ha sido un ejemplo de vida para mí y muchas personas más.

....dijo el zorro. He aquí mi secreto, que no puede ser más simple: solo con el corazón se puede ver bien; lo esencial es invisible para los ojos...

Antoine de Saint-Exupéry.

Fragmento tomado de EL PRINCIPITO

AGRADECIMIENTOS.

A Dulce, la Dra Romano Y Ricardo; a todos los integrantes del laboratorio de fisiología del IPN y del departamento de etología especialmente al Dr. Galindo.

A todos mis amigos y los que de una u otra manera contribuyeron para que terminara este trabajo.

A los MVZ. Emilio Palma, José Luis Ramírez y Martín Araiza que han sido mis amigos y maestros.

A los zoológicos de Chapultepec, Aragón y ZOOMAT, por su colaboración para realizar el presente estudio.

CONTENIDO.

	Página
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
1.1.1. Situación actual de los felinos neotropicales.....	2
1.1.2. Estrategias de conservación en felinos.....	3
1.1.3. Investigaciones en fisiología reproductiva en felinos.....	3
1.1.4. Métodos en la evaluación longitudinal hormonal.....	6
1.1.5. El radioinmunoanálisis como herramienta en la evaluación hormonal ovárica en felinos.....	7
1.1.6. Características de la especie.....	10
1.2. HIPÓTESIS.....	13
1.3. OBJETIVOS.....	13
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
3. RESULTADOS.....	23
4. DISCUSIÓN.....	29
5. CONCLUSIONES.....	33
6. LITERATURA CITADA.....	34
CUADROS.....	43
FIGURAS.....	45

RESUMEN

HERNÁNDEZ MÉNDEZ SANDRA ELIZABETH. Determinación de estacionalidad reproductiva en ocelotes (*leopardus pardalis*) hembras mantenidas en cautiverio por medio de radioinmunoanálisis en heces (bajo la dirección de la MVZ. Dulce María Brousset Hernández Jauregui y la Dra. Marta Romano Pardo).

El objetivo del presente estudio fue estandarizar la evaluación de metabolitos de esteroides reproductivos (estradiol y progesterona) por medio de RIA, a partir de muestras de heces en hembras de ocelote, así como identificar el patrón longitudinal de estos esteroides fecales y determinar la existencia de estacionalidad en esta especie. Para ello se colectaron muestras fecales 3 días a la semana durante 12 meses en un total de 5 hembras cuatro de estas en edad reproductiva y una juvenil. Las muestras fueron remitidas al laboratorio de Fisiología del CINVESTAV del IPN para su evaluación. Para la elaboración del extracto a partir de las muestras fecales se utilizó el protocolo desarrollado por Brown *et al.* Los ensayos RIA tanto para estradiol como progesterona fueron realizados por medio de kits comerciales. Se realizó una correlación entre niveles de estradiol fecal y variables climatológicas (Temperaturas máximas, mínimas y promedio, horas con luz solar, precipitación pluvial y radiación global) para determinar si existía alguna relación entre ellos. Los análisis dieron como resultado que es factible utilizar anticuerpos con alta especificidad para progesterona en esta especie ya que todas las cuentas entraron dentro de la curva estándar y los ensayos cumplieron con los parámetros recomendados por el control de calidad. El promedio de los picos máximos para progesterona en las 4 hembras adultas fue de 7407.5 ± 2187.59 ng/gr y el mínimo fue de 49.92 ± 9.80 ng/gr. Para estradiol el promedio máximo en las 4 hembras adultas fue de 119.10 ± 8.67 ng/gr y el mínimo fue de 1.22 ± 0.16 ng/gr. En ninguna de las hembras se encontró un factor climatológico en común que estuviera relacionado con los niveles de estradiol fecal. Al parecer horas luz, temperatura máxima y precipitación pluvial pudieran estar relacionados con los niveles de estradiol. Se observó un aumento del promedio de los niveles de estradiol fecal durante los meses que corresponden a primavera y verano ($P < 0.05$), en tres de las cuatro hembras adultas, pero no se observó una caída drástica tanto de progesterona como de estradiol que pudieran indicar un anestro. Por ello los resultados pudieran sugerir que no existe una estacionalidad marcada en esta especie. El patrón hormonal corroborado con observaciones conductuales en una de las hembras podría sugerir, que el número de montas influyen en la presentación de la ovulación. También se observó la presentación de ovulación inducida sin monta en dos de las hembras y en una de ellas pseudogestación con una duración aproximada de dos tercios de una gestación normal.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

1.1.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LOS FELINOS NEOTROPICALES.

La región Neotropical en el continente Americano es hábitat de diez de las 37 especies de felinos reconocidas en el mundo y de estas diez, seis habitan dentro del territorio mexicano, las cuales son el jaguar (*Panthera onca*), puma (*Felis concolor*), gato montes (*Lynx rufus*), ocelote (*Leopardus pardalis*), jaguarundi (*Herpailurus yagouarondi*) y margay (*Leopardus weidii*), siendo las cuatro últimas especies de felinos pequeños (<20kg) y estando consideradas todas como amenazadas o en peligro de extinción (1,2,3,4,5).

El incremento en el número de especies animales en peligro de extinción ha provocado la planeación de estrategias efectivas de conservación que involucran la preservación de su hábitat natural, así como la reproducción natural y asistida de estas especies en zoológicos, ya que son básicas para mantener la viabilidad genética, tanto para las poblaciones mantenidas en cautiverio como para las de vida silvestre (1,2,4).

Dentro de las especies en peligro de extinción, la familia felidae ha sido una de las más afectadas. Su rango de distribución geográfica ha disminuido debido a la pérdida ó fragmentación de su hábitat, competencia con el humano, tráfico de pieles y de animales y su consecuencia en pérdida genética, así como falta de aplicación de las leyes para su conservación (1,2,4).

Aunque se han promovido más acciones para programas de conservación y reproducción enfocadas a grandes felinos, por ser considerados más atractivos para las colecciones zoológicas, en los últimos años estas acciones se han enfocado también hacia los felinos pequeños, los cuales no han podido ser reproducidos con tanto éxito en comparación con los anteriores (1,2).

1.1.2. ESTRATEGIAS DE CONSERVACIÓN EN FELINOS.

Las estrategias efectivas para la conservación de especies en cautiverio y de vida libre, sugieren la preservación del hábitat y de conocer la biología reproductiva de la especie (6,7). Así mismo, varios autores plantean que es necesario conocer los elementos biológicos necesarios para que la reproducción de una especie sea exitosa, los cuales son: fisiología reproductiva; planeación entre cruza y demografía; medio ambiente físico y social; nutrición; interacción con los guarda animales y proximidad de los albergues con depredadores naturales (8).

Las causas a las que se atribuyen las fallas reproductivas en la mayoría de los felinos pequeños mantenidos en cautiverio se asocian a dos factores principales: a altos niveles de estrés y deficiencias nutricionales por dietas inadecuadas (3, 7, 8, 9, 10).

La determinación del estado reproductivo es uno de los factores más importantes para un manejo efectivo de programas de conservación de la especie. En estos programas se contemplan, la reproducción natural o asistida por medio de inseminación artificial, fertilización *in vitro* y transferencias embrionales. Para ello es necesario el conocimiento de la fisiología básica reproductiva de la especie (6,10).

1.1.3. INVESTIGACIONES EN FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA EN FELINOS.

En felinos silvestres la investigación en fisiología reproductiva se ha enfocado principalmente a especies grandes como son tigre (*Panthera tigris*), león (*Panthera leo*), leopardo de las nieves (*Uncia uncia*), pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*) y guepardos (*Acinonyx jubatus*) (9). Estas investigaciones han sido dirigidas a la biología de los gametos y fertilización para el desarrollo de técnicas de inseminación artificial y de fertilización *in vitro* con éxitos variables (9,10).

A excepción de algunos estudios de niveles séricos hormonales longitudinales en el género *Panthera* (9), no a habido más investigaciones de este tipo en felinos silvestres. En el caso de felinos pequeños, con la excepción de 15 años en forma pausada del estudio de su biología, taxonomía, características de su hábitat, algunos parámetros reproductivos y de conducta; el estudio de su biología reproductiva ha sido poca, por lo que se sigue tomando al gato doméstico (*Felis catus*) como modelo animal para esta especie, dada su facilidad de manutención y manejo (6,10,11).

La hembra del gato doméstico, se considera poliéstrica estacional, de ovulación inducida, con anestro durante los meses con poca luz. En nuestro país puede llegar a ciclar todo el año, por influencia de la latitud. Su ciclo estral presenta cinco etapas (12,13, 14):

a) Proestro. Período en el cual los machos son atraídos a hembras no receptivas, su duración varía de 12 a 48 hrs. y se encuentra influenciado principalmente por la hormona foliculo estimulante (FSH), que promueve el desarrollo folicular y el inicio del aumento de niveles séricos basales de estradiol de 15 pg/ml hasta 20 pg/ml (12,13, 14,15).

b) Estro. Es el período en el que la hembra presenta comportamiento reproductivo y es receptiva al macho. En esta etapa se presentan niveles séricos de estradiol por arriba de 20 pg/ml. Su duración es entre 5 a 6 días, pudiendo durar hasta 20 días seguidos y en este caso se le considera como un estro continuo (13, 14, 15).

c) Interestro. Este se presenta en el caso de que no ocurra cópula y se caracteriza por niveles de estradiol menores a 20 pg/ml y sin actividad sexual de 3 a 15 días debido a la regresión y atresia folicular e inicio del desarrollo de la siguiente oleada folicular (12,13, 16, 17).

d) Diestro. Se define como el período dominado por altos niveles de progesterona, causado por la inducción de la ovulación por una cópula que ocurre de 24 a 36 hrs. después del coito. Para que se suscite la ovulación es imprescindible que el macho monte y penetre a la hembra para que provoque un estímulo neural a nivel de vagina, que aumente la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) a nivel de hipotálamo. Ésta a su vez provoca la liberación de hormona luteinizante (LH) la cual causa a nivel folicular el aumento de la

producción de progesterona y la liberación de relaxina y prostaglandina, las cuales provocan la ruptura del folículo y la liberación del óvulo. Después de la ovulación el desarrollo del cuerpo luteo ocurre entre 24 a 48 horas y los niveles de progesterona aumentan rápidamente hasta alcanzar niveles mayores a 20ng/ml entre los días 14 al 18. Si la hembra queda gestante estos niveles pueden ir de 50 hasta 95 ng/ml, alcanzando su pico máximo en el día 25 de gestación. La duración de la gestación es de 63 a 69 días (12, 14, 16, 18, 19).

Dentro del diestro se pueden presentar dos fenómenos que son la ovulación inducida sin monta (espontanea) y la pseudo gestación. La ovulación inducida sin monta puede ser causada por estímulos de tipo olfatorio, visual, o por contacto, siendo más común en hembras adultas (12, 14, 16, 18, 19). La pseudo gestación es una alteración fisiológica que usualmente ocurre cuando la hembra es inducida a ovular pero no queda preñada. Tiene una duración de 40 a 50 días, aproximadamente dos tercios de una gestación normal (12, 14, 16, 19) y durante este tiempo no se presentará un ciclo nuevo, ya que la vida media del cuerpo lúteo es de aproximadamente 35 días y la progesterona producida por este, inhibe la secreción de GNRH y por lo tanto no es posible la formación de un nuevo folículo (12, 14, 16, 19).

e) Anestro. Se caracteriza por la ausencia de actividad sexual, inducido por la reducción de horas luz. Hormonalmente se encuentran niveles basales de estrógenos (<20 pg/ml) y progesterona (<1-2 ng/ml), en plasma (12, 14, 16, 19).

En los machos no existen cambios hormonales estacionales ni cambios en la producción de espermatozoides. Su pene es ventral al escroto y dirigido caudalmente y presenta en su porción craneal entre 100 y 200 papilas cornificadas o espículas, dirigidas hacia la base del pene. El tamañ o y el desarrollo de estas espículas son dependientes de testosterona y se ha sugerido que probablemente ayuden a la inducción de la ovulación durante la cópula. Solo presentan glándulas bulbouretrales y próstata, siendo las primeras las responsables de producir líquido seminal (13, 14).

1.1.4. METODOS EN LA EVALUACIÓN LONGITUDINAL HORMONAL.

Para una exitosa investigación de los niveles longitudinales hormonales, es necesaria la recolección de muestras repetidas a lo largo de un período de tiempo para su evaluación. En la mayoría de las especies no domésticas el muestreo sanguíneo no es posible a menos que se realice algún método de contención y esta clase de manejo provocaría una situación estresante, aunada al estrés crónico causado por el confinamiento (9, 20). Luego entonces, al tratar de ayudar al éxito reproductivo, se aumenta el problema, ya que corticoesteroides y opioides endógenos (21, 22) pueden suprimir la secreción de GnRH a nivel hipotalámico (22,23).

En gatos domésticos confinados en medio ambientes pobres y expuestos a estrés crónico se ha descubierto que hay un incremento de la hormona adeno corticotropica (ACTH), asociado a un descenso de la respuesta pituitaria a LH (24). También hay evidencia experimental en ganado vacuno que indica que la foliologénesis y la ovulación son las fases de la reproducción más vulnerables al estrés crónico, así como la implantación del embrión y la expresión de comportamiento sexual (22, 23). Por ello la importancia del desarrollo de técnicas que permitan obtener muestras de formas no invasivas para estudios endocrinológicos.

Una de las alternativas que se plantean hoy en día para la determinación de niveles hormonales es la medición de esteroides en heces y orina. Estas investigaciones inician en los 70's y se determinó que era posible monitorear la función ovárica, tanto en humanos como en primates mediante la medición de los metabolitos excretados por la función endocrina gonadal, tanto en heces como en orina. Sin embargo, la cantidad de hormonas y metabolitos excretados en cada una de estas vías varía dependiendo de la especie (25).

El hígado es el principal responsable del metabolismo de las hormonas esteroideas al conjugarlas con glucurónidos o sulfatos para volverlas hidrosolubles y que puedan ser excretadas por medio de la orina o las heces. Por ejemplo la progesterona en humanos es convertida a pregnanediol y conjugada a ácido glucurónido en el hígado, para posteriormente ser excretada en orina. El estradiol en humanos es rápidamente convertida en el hígado a

estrona y estriol por medio de deshidrogenasas. La estrona es conjugada a sulfatos y el estriol a glucurónidos para poder ser excretadas por medio de la bilis al intestino delgado y de aquí ser eliminadas del organismo por medio de las heces u orina (26, 27).

1.1.5. EL RADIOIMUNOANÁLISIS COMO HERRAMIENTA EN LA EVALUACIÓN HORMONAL OVÁRICA EN FELINOS.

En la década de los 80's se inician las investigaciones de determinación hormonal por medio de radioinmunoanálisis en varias especies de animales domésticos y silvestres (6,28, 29, 30). Este método se basa en la especificidad que tienen los anticuerpos de unirse a los antígenos, que en este caso son las hormonas. Así, al añadir una cantidad conocida de hormona esteroide marcada radioactivamente más un anticuerpo contra ella, a los extractos que contienen hormonas desconocidas, se produce una competencia entre la hormona marcada y la desconocida por el anticuerpo. Entonces es posible medir la cantidad de hormona marcada unida al anticuerpo que será inversamente proporcional a la cantidad de hormona no marcada de la muestra y es así como se puede calcular la concentración de hormona en la muestra desconocida (31).

Antes de establecer un protocolo para la determinación de metabolitos de algunos esteroides en heces u orina por medio de radioinmunoanálisis, es importante determinar la vía principal de excreción y el tipo de metabolito excretado para decidir el tipo de muestra y de anticuerpo a usar (6). Para esto es necesaria la administración del esteroide marcado radioactivamente que permite obtener información de la ruta y el tiempo de excreción. Por medio de cromatografía de alta sensibilidad (HPLC) se podrá entonces detectar el tipo de metabolito final en heces y orina (29, 32). Los estudios de radioinfusión han contribuido a entender la circulación entero hepática de las hormonas esteroidales y se ha determinado que la excreción de los esteroides al intestino se produce principalmente por la bilis (6, 25) y estos se encuentran primordialmente conjugados a sulfatos o glucurónidos (26,27). Una vez que los ácidos biliares llegan al intestino los esteroides sufren una reabsorción pero durante su circulación en el intestino están expuestos a

procesos metabólicos por parte de los microorganismos presentes en la flora normal intestinal, principalmente en el íleo y colon (26). Se ha descubierto que estos microorganismos de la flora normal en humanos son los responsables de que se encuentren metabolitos de estrógenos en su forma no conjugada principalmente en heces a causa de la hidrólisis que ejercen sobre ellos(26). Esto da como resultado que los factores más importantes que determinan el tipo de metabolito que se puede obtener a partir de heces, dependen del tiempo de tránsito intestinal y el tipo de flora intestinal y cualquier factor que pueda llegar a modificarlos (20, 26).

El tiempo entre la circulación y la excreción en orina es corta (menos de 5hrs), pero en heces es más larga, aproximadamente el tiempo necesario entre el paso de la bilis al recto que es de 24-48hrs en animales con fermentación cecal y en carnívoros de 12-24hrs. (6, 25, 33).

Estudios realizados con gatos domésticos han demostrado que los metabolitos de estrógenos, aún y cuando sufren una circulación enterohepática y son reabsorbidos a nivel intestinal, son excretados en más de un 90% en heces (9, 20, 25, 34). Y también que más del 60% de estos, son estrógenos conjugados no hidrolizables por enzimas β -glucuronidasas y aril-sulfatasas (25). Estos consisten predominantemente en estrona y estradiol 17α o 17β , por lo tanto los anticuerpos específicos para estrógenos o estrógenos totales pueden ser usados para su determinación (6, 25,35). En especies no domésticas como leopardos (*Panthera pardus*), guepardos (*Acinonyx jubatus*), pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*), leopardo de las nieves (*Uncia uncia*) se ha reportado que la inmunoreactividad para estradiol coincide primordialmente con el estradiol no conjugado. Una excepción es la pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*), que obtuvo una inmunoreactividad del 60% con fracciones conjugadas de estradiol (20, 30).

En el caso de progesterona, al igual que en el de estradiol, se encontró mayor radioactividad en heces en comparación con lo que ocurre en orina (20, 30, 33). Schwarzberg et al (1996) (6) concluyeron después de realizar estudios en varias especies animales, que el ensayo más útil para progesterona es aquel que muestra una reacción cruzada considerable con varios 20-oxo-pregnanos y que la medición de metabolitos de pregnanos combinados que detectan

metabolitos con el grupo C20 es superior a los que únicamente detectan un limitado número de metabolitos de progesterona (6). Así mismo, estos autores sugieren que los anticuerpos usados para analizar esteroides fecales se deben parecer a inmunógenos para 5α o 5β -pregnanos conjugados en la posición 3, ya que estos anticuerpos tienen alta reactividad cruzada con pregnanos que comparten un grupo C20 similar (6).

En el caso de felinos, investigaciones con gatos domésticos y guepardos, demostraron que habían diez veces más 20-oxo-gestágenos que 20α -gestágenos (20α -dihidroprogesterona), en muestras fecales (35, 36, 37, 38). La HPLC demostró que la reacción cruzada no es contra progesterona y que los metabolitos tienen polaridad similar a progestágenos no conjugados monohidroxilados (6, 35). Estudios en felinos silvestres (leopardo, guepardos, pantera nebulosa, leopardo de las nieves) demostraron que las alícuotas purificadas con HPLC están igualmente asociadas con metabolitos conjugados y no conjugados de progestagenos (20,33), a diferencia de otras especies no felinas, que son principalmente metabolitos no conjugados (20). Esto presumiblemente es a causa de la hidrólisis bacteriana que puedan experimentar en el intestino especies con tránsito intestinal lento a causa de fermentación cecal o ruminal del alimento (20), y que no ocurre en los felinos.

Finalmente, al existir un gran número de metabolitos de progesterona en heces, se explica el por qué es posible utilizar varios ensayos para su medición. En general los anticuerpos para el análisis de metabolitos de progesterona se basan en identificar las posiciones C20 (20-oxo, 2α -OH, 20β -OH) de la molécula de progestágeno. Por ejemplo, si los anticuerpos tienen una reacción cruzada con 20-oxo-pregnadiol y la progesterona no se encuentra presente en la muestra fecal, el ensayo usado para medir progesterona no reportará progesterona; pero sí los valores de reacción cruzada con metabolitos de 5α y 5β pregnadiol-reducido, así como los que contienen el grupo 20-oxo.

Debido a esto un anticuerpo específico para progesterona es poco práctico (6).

Los análisis de esteroides fecales son una herramienta invaluable para el estudio de la biología de la reproducción básica en felinos incluyendo: 1) caracterización del ciclo estral, 2) determinación de la prevalencia de ovulación inducida contra espontánea, 3) estudio de la

influencia de la estacionalidad en la reproducción, 4) determinación de gestación y pseudogestación. Y finalmente determinar causas hormonales de infertilidad, fallas en inseminación artificial y en transferencia de embriones (20, 29, 33, 38).

El análisis de metabolitos fecales para monitorear patrones hormonales en felinos ha sido utilizado recientemente en guepardos (*Acinonyx jubatus*) y panteras nebulosas (*Neofelis nebulosa*) (20, 36, 37, 38, 39). En leopardos se ha utilizado para caracterizar su perfil hormonal resultando estas investigaciones en un parto exitoso por inseminación artificial (39). También se ha utilizado en leones (*Panthera leo*), tigres (*Panthera tigris*) y caracal (*Felis caracal*) (38). En felinos pequeños como son ocelotes (*Leopardus pardalis*), margays (*Leopardus weidii*) y tigrillo (*Leopardus tigrinus*) se ha utilizado para determinar función testicular y ovárica (10, 40), así como determinación de estacionalidad y ovulación espontánea (10).

Finalmente, un punto que debe de ser cuidado son las posibles causas de variación en la concentración de esteroides en heces, influenciado por cambios en la dieta, contenido de agua o por la acción bacteriana intestinal (9, 41, 42). El eliminar el líquido de las muestras fecales no provoca una diferencia significativa en la concentración de esteroides fecales (6,9), y una de las ventajas de la liofilización es que después del secado se pueden retirar huesos o materia vegetal que pueden modificar los resultados (9). Se debe de tomar en cuenta que la flora bacteriana del tracto digestivo tiene una función importante en la hidrólisis de los metabolitos fecales (20, 26) y esta sufre cambios a causa de enfermedades de tipo digestivo así como al administrar medicamentos (9,20,41,42,43).

1.1.6. CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE.

El presente estudio se realizó en una especie de felino mexicano que es el ocelote (*Leopardus pardalis*). La información mencionada a continuación fue obtenida de publicaciones recientes las cuales realizaron una recopilación de autores, por ello se mencionan a los autores antes de las referencias que los citan, ya que no fue posible consultar directamente las fuentes originales.

El ocelote es miembro de la familia felidae, del orden de los carnívoros, compuesto por 361 especies, distribuidas en 93 géneros y 7 familias (1, 3). El ocelote junto con 25 especies de felinos sudamericanos es considerado dentro de la categoría de peligro de extinción, por la UICN y como amenazada en México, según la norma oficial mexicana (NOM 069 ECOL SEDESOL, 1994) (2, 40).

Habita la región neotropical y es considerado un felino de talla pequeña, siendo que el promedio de peso en machos adultos es de 10 (n=8: Mondorffi 1986) a 11.5Kg (n=8: Enders 1935, Emmons 1988, Sunquist *et al.* 1989), y en hembras de 8.8 (n=5: Mondolfi 1986) a 9.4Kg (n=11: Husson 1978, Emmons 1988, Crawshaw y Quigley 1989, Konecny 1989, Sunquist *et al.* 1989) (citados por 1,4). Su distribución comprende desde el sudeste de Estados Unidos, hasta México, Centro y Sudamérica, excepto Chile, Trinidad y Uruguay (1, 4, 44).

Se reconocen 11 subespecies y cuatro de ellas son mexicanas, localizadas desde Sonora y Tamaulipas hasta el istmo de Tehuantepec hacia el sur y de ahí hacia el este por Chiapas y la península de Yucatán. Estas subespecies se encuentran distribuidas dentro de la República Mexicana de la siguiente forma: la *albescens* y *sonorensis* en el nordeste, *pardalis* a lo largo del sur y sudeste y finalmente *nelsoni* en el occidente del país (1,4). Ocupan hábitats desde el nivel del mar hasta los 1200 mt (Mondolfi 1986, Bisbal 1989, Einsenberg 1990) (citados en 1) y hasta los 3800 mt (Vaugam 1983, Tewes y Schmidly 1987) (citados por 1, 3). Estos incluyen, selvas tropicales de todo tipo (caducifolia, subtropical, húmeda y montañosa), manglares, sabana, sabana húmeda pantanosa, bosques de encino, pino, ciprés pino y pino encino. (Koford 1973, Guggisberg 1975, Mondolfi 1986, Tewes 1986, Bisbal 1989)(citados por 1, 3, 4).

El pelaje es corto, marcado con manchas oscuras abiertas y parches negros que varían en su forma, sobre un fondo de color amarillo claro que puede llegar a ser blanco en su región ventral. Su promedio de vida es de 10 años en vida silvestre y hasta 20 en cautiverio (3).

Son animales de hábitos crepusculares y nocturnos siendo generalmente activos en más de la mitad del período de 24 horas y dependen de una buena cobertura vegetal para poder descansar, cazar, esconderse y dispersarse. Los machos son más activos durante el día a comparación de las hembras ya que pasan alrededor del 60% o más de las horas de luz

activos; sin embargo, el patrón de actividad en hembras gestantes o durante la lactancia se incrementa considerablemente. (1, 3). La superficie que recorren diariamente varía 1.8-7.6 km, siendo la mitad de esta distancia la recorrida por las hembras (Ludlow y Sunquist 1987, Emmons 1988, Konecny 1989)(citados por 2, 3). Un estudio realizado en el estado de Tamaulipas, México, reporta que el ámbito hogareño es de hasta 8.1 km² para machos y 9.6 km² para hembras. Son animales solitarios y los territorios de un macho pueden abarcar el de una o varias hembras y las distancias que recorren dependen en gran medida de la disponibilidad de alimento y agua (1, 3,5).

Se alimentan principalmente de mamíferos medianos y roedores además de reptiles, serpientes, lagartijas y puede llegar a pescar. Su consumo es de 558-837gr/día u 88gr/kg PV (2, 3).

Existe una gran discrepancia en el caso de la presentación de la época reproductiva en esta especie; por un lado se reporta que la mayor actividad de comportamiento sexual es principalmente en primavera y verano en confinamiento (44) y que en vida silvestre los picos de nacimientos son principalmente en otoño (de septiembre a noviembre) en Texas y al norte de nuestro país (Leopold, 1959) (citado en 1, 2). Estudios realizados por Mellen (1989) en varios zoológicos de Norteamérica reportan nacimientos en todos los meses excepto octubre y diciembre (45). Así mismo Ewer (1973) y Grzimek (1975), comentan que la reproducción de estos animales ocurre a lo largo del año (citados en 3). En el hemisferio sur del continente se han observado nacimientos principalmente en los meses de octubre a enero (Rengger, 1959; Crespol, 1982)(citados en 1 y 2). Finalmente, estudios realizados por medio de esteroides fecales han mostrado que se presentan picos de estradiol fecal que correspondieron a signos de comportamiento en estro en los meses de marzo a septiembre que corresponden a primavera y verano en el hemisferio sur (40). Por lo tanto, con base a lo anterior la estacionalidad reproductiva en esta especie puede no estar muy marcada.

Los parámetros reproductivos reportados para la especie son los siguientes:

Su ciclo estral es de 4.63 ± 0.63 días ($n=9$) (45) y el estro tiene una duración de 7 a 10 días (45) (Eaton, 1977 citado en 3). Pueden copular de seis a diez veces al día y la probabilidad de concepción es del 60% (45) (Eaton, 1977 citado en 3). El periodo de gestación de 70 a 85 días (45) (Eaton, 1977 citado en 3 y Mondolfi, 1986 citado en 1), con un tamaño de camada de 1.4 ± 0.24 ($n=28$) (45). Su periodo inter estro es de 6 meses y de hasta dos años en vida silvestre (Eaton, 1977 citado en 3) y la edad a la cual alcanzan su madurez sexual es de los 18 a los 22 meses en hembras y en machos a los 2.5 años (45) (Mondolfi, 1986 citado en 1).

1.2. HIPÓTESIS.

Los patrones longitudinales de metabolitos fecales de estrógenos y progesterona medidos por medio de radioinmunoensayo, permiten reconocer las variaciones de estacionalidad reproductiva en ocelotes mantenidos en cautiverio.

1.3. OBJETIVOS.

a) Estandarizar por RIA la evaluación de metabolitos de esteroides reproductivos (estradiol y progesterona) en muestras de heces de hembras de ocelotes.

b) Identificar el patrón longitudinal de los metabolitos de estrógenos y progesterona de hembras de ocelotes mantenidas en cautiverio, a lo largo de 12 meses.

c) Identificar la existencia de estacionalidad en esta especie a través de identificar diferencias mensuales a lo largo del año.

2. MATERIAL Y METODOS.

2.1. LOCALIZACIÓN Y SUJETOS.

Se evaluaron en este trabajo un total de cinco hembras, cuatro de estas en edad reproductiva y una juvenil. Solo dos de ellas han tenido crías y de estas solo una ha sido de forma anual. Los ejemplares pertenecen a 3 zoológicos diferentes localizados dentro de la República Mexicana; dos confinadas en zoológicos dentro del Distrito Federal y las tres restantes en un zoológico localizado en el estado de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Sus antecedentes se citan a continuación.

La primer hembra (hembra 1), se encuentra confinada en el zoológico de Chapultepec, dentro de la delegación Miguel Hidalgo, con ubicación geográfica de 19°25' de latitud norte y a 99°12' de longitud oeste, a una altitud de 2250 metros sobre el nivel del mar (msnm). El clima presente en esta zona es templado subhúmedo con lluvias en verano de humedad media (CW1), la temperatura media anual es de 15°C y la precipitación pluvial anual en promedio es de 801 mm (46).

La hembra fue donada por un particular el 23 de enero de 1996, presentaba al llegar onicofalangiectomia y zonas atopécicas en la grupa y región dorsal, las cuales se presentan aún en ciertas épocas del año y sin que exista un diagnóstico de ella. Esta hembra se encuentra junto con un macho obtenido de un decomiso el 23 de septiembre de 1993. Ambos animales llegaron al zoológico siendo ya adultos y el acoplamiento de esta pareja se realizó en el mes de junio de 1996 y desde esta fecha los ocelotes han permanecido juntos, presentando intentos de cópula pero sin haber tenido crías.

El encierro cuenta con una zona de exhibición con un área de 38.63m² totalmente ambientado con vegetación y dos albergues nocturnos de 4m² cada uno (47). La alimentación se

les proporciona a las 4:30p.m, hora que son guardados en albergues nocturnos separados y esta consiste en carne de caballo y pollo con hueso (500g/animal) y agua *ad libitum*. Son liberados al exhibidor todos los días a las 9:00a.m, donde permanecen juntos.

Como medida de prevención se aplica anualmente la vacuna triple felina (PCR) y rabia. Así como estudios coproparasitológicos semestrales para determinar la necesidad de desparasitación.

La segunda hembra (hembra 2), se localiza en el zoológico de San Juan de Aragón, en la Delegación Gustavo A. Madero, México, D.F., con una ubicación geográfica de 19°28' de latitud norte y a 99°04' de longitud oeste. El clima de esta zona es semiseco templado con lluvias en verano (BS1K), la temperatura media anual es de 16.8°C y la precipitación pluvial anual promedio es de 580.9mm (48). La hembra fue donada el 12 de agosto de 1991 llegando en edad adulta. El macho fue donado el 6 de junio de 1991, también adulto; ambos fueron mascotas.

Esta pareja fue acoplada en el mes de julio de 1994, en este mismo año nacieron dos crías por monta natural, las cuales murieron por enfermedad y desde ese año no se han presentado nacimientos. El encierro cuenta con un área de exhibición con un área de 21m², ambientado con un sombreadero, una tarima elaborada con troncos, un estanque en forma rectangular y pequeñas áreas con pasto y lo demás es concreto. El albergue nocturno posee un area de 14.63m² (47). La alimentación se les proporciona por las mañanas diariamente y es a base de pollo crudo troceado con hueso y carne roja (600g/ animal) empanizados con alimento seco comercial molido para gatos adultos (50gr), el agua se les da de forma *ad libitum*. Los animales permanecen juntos todo el día y solo se restringe el acceso al exhibidor durante la limpieza del mismo, que se realiza por la mañana. El albergue nocturno permanece abierto todo el resto del día por lo que los animales tienen libre acceso al mismo. El programa de medicina preventiva consiste en aplicar anualmente la vacuna triple felina (PCR) y antirrábica así como desparasitaciones semestrales dependiendo del resultado del examen coproparasitológico.

Las últimas tres hembras se encuentran confinadas en el zoológico Miguel Álvarez del Toro ubicado en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Se localiza a 16°45' de latitud norte y a 93°07' de longitud oeste (49), dentro de la reserva ecológica de "EL Zapotal", localizada a 3km al sur de la ciudad de Tuxtla Gtz., y al norte colinda con el ejido Francisco I. Madero, el cual cuenta con casas habitación. Al oriente colinda con la prisión estatal de Cerro Hueco, el resto de la reserva está rodeada con selvas bajas caducifolias. Posee 70ha de reserva ecológica, representada por bosque subperinifolio y selva baja caducifolia. Con una altitud de 520msnm, el clima que se presenta en esta región es cálido subhúmedo con lluvias en primavera y verano (AW), la temperatura media anual es de 23.5°C y la precipitación pluvial anual es de 923.2 msnm (47).

En el zoológico una de estas hembras se encuentra en exhibición (hembra 3); fue donada en el mes de julio de 1985, siendo antes mascota. Fue acoplada con el macho en el año de 1993 y desde entonces se reproduce de forma anual naciendo una cría por parto. En la fecha próxima al parto se retira al macho del albergue y se deja sola a la hembra con la cría hasta el destete y posteriormente se vuelve a juntar a la pareja. El albergue posee un área de 60m², totalmente ambientado con vegetación característica de la zona y un encierro nocturno (47). La alimentación se basa en carne de pollo, conejo o caballo, empanizada con alimento comercial molido para gato, adicionada cada tercer día con un complemento vitamínico y mineral. Se les da la dieta los domingos y las labores de los guarda animales son por las mañanas terminando siempre a las 11:00am. El programa de medicina preventiva consiste en exámenes coproparasitoscópicos y desparasitación semestral así como aplicación de vacuna triple felina (PCR) anualmente antes de la época de lluvias.

Las otras dos hembras (Hembra 4 y 5), están cada una en un albergue individual con piso y paredes de cemento con malla ciclónica al frente, fuera de exhibición al público. El encierro posee un tronco, un bebedero y un comedero (47). Su alimentación y programa de medicina preventiva es similar a lo descrito en la hembra 3. La hembra 4 fue donación de un particular, es de edad adulta y el único contacto con machos es visual ya que dentro de esta zona se encuentran confinados varios machos de esta misma especie. La hembra 5 es una hembra juvenil menor a un año, que llegó donada al zoológico, habiendo sido mantenida como mascota.

2.2. PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE DATOS.

En cada uno de los zoológicos se colectaron las heces 3 días a la semana, durante 12 meses, siendo identificadas de acuerdo al individuo al que pertenecen, con la fecha y condiciones de recolección de las mismas y mantenidas en congelación (-4°C). En el caso de Chapultepec la recolección inició en enero de 1999 y concluyó en enero del 2000. La recolección en Aragón inició en noviembre de 1997 y finalizó en noviembre de 1998. Finalmente en el zoológico de Tuxtla Gutiérrez la recolección inició en el mes de enero de 1999 y se interrumpió en agosto del mismo año. Por desgracia en estos ejemplares el muestreo fue muy poco ya que al encontrarse el zoológico retirado del lugar en donde se iban a procesar las muestras su recolección fue muy irregular y muchas se perdieron. Para identificar las heces de hembras con pareja, a su ración diaria de alimento se les espolvoreó colorante artificial para alimentos para que pintaran las heces.

La evaluación de las muestras se realizó en el laboratorio de fisiología del CINVESTAV, IPN.

Una vez que las heces se trasladaron al laboratorio, se homogeneizaron y se depositaron en tubos de plástico rotulados con los datos de cada una de las muestras, y nuevamente se congelaron (-4°C) hasta el día en que se procesaran para su extracción.

2.2.1. Extracción.

El procedimiento para la extracción fecal se realizó basándose en el protocolo desarrollado por Brown *et al* (9, 20, 30, 33, 36), quien ha reportado su uso en guepardo (*Acinonyx jubatus*) y pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*), además de gatos domésticos.

Los tubos de plástico con las muestras fecales húmedas se secaron en una centrifuga¹ posteriormente se pesaron en tubos de vidrio con rosca, de 0.18-0.20gr de heces secas pulverizadas y limpias de huesos, pelo y materia vegetal, registrando sus datos, peso y observaciones de cada una de ellas.

A estos tubos se agregó 5ml de etanol al 80% (4ml etanol en 1ml de agua destilada) marcando el nivel del líquido en cada tubo. Posteriormente se hirieron en baño maría con una temperatura de 90-100°C por 20 minutos, añadiendo etanol a cada tubo para evitar que el contenido de los tubos se seque. Al terminar el tiempo en el baño maría se aumentó el volumen del extracto con etanol hasta la marca del volumen inicial para posteriormente centrifugar los tubos a 1,500 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se decantó en un segundo juego de tubos de vidrio de 16x125mm numerados idénticamente y el extracto se evaporó con aire a presión en un baño de agua tibia a 36°C. Al sedimento que se obtuvo al final de la evaporación, se le añadió 1ml de etanol y se agitó en el vortex por 1 minuto y se dejaron reposar por 30 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugaron nuevamente los tubos a 1500 rpm por 20 minutos y finalmente se decantó el sobrenadante en tubos RIA identificados con los datos de la muestra. Se añadieron 2ml de bufer RIA diluido al 75% para obtener una dilución 1:2; se agitaron en el vortex por 3 segundos, se taparon y sellaron para posteriormente mantenerlos en congelación a -4°C hasta el día del ensayo.

2.2.2. Radioinmunoensayo.

Los ensayos tanto para estradiol como para progesterona fueron realizados por medio de Kits, desarrollados por los laboratorios ICN². Se corrieron pruebas previas para determinar la especificidad de los Kits para cada una de las hormonas y determinar las diluciones a utilizar en los extractos.

¹Speedvac Rotatory Evaporator., Savant Instruments, Inc., Farmingdale, NY, USA.

²ICN Biomedicals Inc. , Costa Mesa, CA. , USA.

El protocolo de trabajo para estradiol se basó en el que marca el Kit; aumentando 2 puntos para cuentas totales y con dos controles internos y externos por cada RIA de 120 tubos al inicio y final. El anticuerpo contra 17 β -Estradiol se levantó en conejos a partir de 6keto-estradiol-17 β -6-oxime-BSA (albúmina sérica de bovino). Posee una reacción cruzada del 100% contra estradiol; del 20% para estrona; del 1.51% para estriol; de 0.68% para 17 α -estradiol y menor al 0.01% para varios andrógenos, progestágenos, glucocorticoides y colesterol. La marca radioactiva fue 17 β -estradiol- 125 I, con 40,000CPM por cada 0.5ml. Los estándares poseen concentraciones de 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 pg/ml, preparados a partir de BSA.

Para progesterona se utilizó también el protocolo del Kit e igualmente se aumentaron dos puntos para cuentas totales y se trabajaron dos controles interno y externos al inicio y final del RIA por cada 120 tubos. El anticuerpo contra progesterona se cultivó a partir de 11 α -Hidroxi progesterona-11 α -hemossuccinato-HSA (albumina sérica de humano); posee una reacción cruzada del 100% contra progesterona; 5.41% con 20 α -dihidroprogesterona; 0.67% con desoxicorticoesterona; 0.70% con corticosterona; 0.67% con hidroxiprogestero; 0.41% con pregnenolona; 0.23% con androstendiona; 0.16% con testosterona y menor al 0.01% con estrógenos (estradiol, estrona y estriol), androgenos (androsterona, aldosterona, dihidro-epiandrosterona), glucocorticoides y esteroides. La marca es a base de progesterona unida a 125 I, con 65,000CPM por cada 0.2ml. Los estándares poseen concentraciones de 0.2, 0.5, 2, 5, 10, 25, 50ng/ml, preparados a partir de suero de humano.

Para controles externos se utilizó suero de gata gestante y en el caso de los controles internos se escogió un punto de la curva para cada RIA. Los conteos fueron por 1 minuto, mediante un contador de radioactividad Gama³.

³Contador cobra II Gama Counting System., A Packard Instruments Company, Camberra Austr.

2.2.3. Análisis estadístico y control de calidad.

Una vez obtenidas las cuentas (CPM) se promediaron los duplicados de cada muestra y se obtuvo el porcentaje de unión al anticuerpo de los promedios por medio de la siguiente fórmula:
(31, 50)

$$\%B/B_0 = \frac{X \text{ cpm muestra} - X \text{ cpm (UI)}}{X \text{ cpm (UT)} - X \text{ cpm (UI)}}$$

UI= Unión Inespecífica.

UT= Unión Total.

Con los datos de la concentración y porcentaje de unión de los estándares se construyó la curva estándar para obtener la regresión lineal y posteriormente las concentraciones de hormonas para cada una de las muestras. Estos datos fueron obtenidos mediante el uso de un programa estadístico. Una vez obtenidos estos datos se ajustaron a las diluciones y peso de cada muestra para obtener los ng/gr de heces secas.

El control de calidad se determinó mediante la obtención de la desviación estándar de cada uno de los duplicados, el cálculo del coeficiente de variación promedio de las muestras y controles externos; determinación de F calculada para la curva estándar; determinación Intra análisis de los controles externos e internos (31, 51).

2.2.4. Determinación de estacionalidad.

Las especies estacionales a comparación de las no estacionales, han logrado regular su actividad reproductiva a través de la interpretación de señales ambientales, que se encuentran relacionadas a la oportunidad de disponibilidad de alimento y agua, que aseguran la mantención de una gestación y la sobrevivencia de las crías. Entre estas señales se encuentra la longitud del fotoperíodo, temperatura y época de lluvias (52,53).

⁴Graph Pad Inplot. Version 4.01. Graph Pad Software, INC; 1992.

El control de la actividad reproductiva en todas las especies animales es regulado por el sistema nervioso central, mediante el hipotálamo el cual se encarga de la secreción de GnRH, que a su vez ejerce un efecto estimulador en la hipófisis para la secreción de la FSH y la LH (54). El mecanismo por el cual el fotoperíodo regula los pulsos de gonadotropinas es a través de la capacidad que tiene la retina de captar la luminosidad y de generar un mensaje que puede ser recibido por el núcleo supraquiasmático, el ganglio cervical superior y la glándula pineal, esta última es la principal productora de melatonina, en respuesta a la oscuridad (54,55). El efecto de la melatonina sobre la actividad reproductiva se ha podido comprobar en gatos, ya que un cambio de tan solo 15 minutos de aumento en el tiempo de exposición a la luz puede ser percibido y traducido por el gato dando lugar a un reinicio a la actividad ovárica (56). Otro estudio relacionado al efecto de diferentes fotoperíodos en las concentraciones plasmáticas de melatonina, prolactina y cortisol en gatos domésticos dio como resultado que principalmente la prolactina y melatonina están relacionados a cambios en el fotoperíodo (57).

El efecto de la temperatura ambiental sobre la función gonadal ha sido muy poco estudiado. Existen reportes de la depresión en la secreción de gonadotropinas correlacionadas con un incremento en la actividad adrenal causada por aumento en la temperatura causado por estrés calórico en ganado bovino (55). La relación entre lluvias y el inicio de la actividad reproductiva es comúnmente observada en especies que viven en zonas tropicales ya que a estas latitudes la variación estacional de la temperatura y las horas con luz son menos marcadas. Esta relación también es marcada en zonas desérticas principalmente por la disponibilidad de alimento y agua (55).

Por lo anterior (para este estudio) se decidió realizar una comparación entre los niveles de estradiol obtenidos con variables climatológicas para evaluar la posible existencia de una relación entre ellos. Para esto se obtuvieron datos climatológicos diarios como, precipitación pluvial, temperaturas máximas, mínimas y promedio, a partir de los registros de observaciones en hora local de las estaciones climatológicas de Tacubaya D.F., y de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, del Servicio Meteorológico Nacional a cargo de la Comisión Nacional del Agua; así

como de radiación global diaria (58) y horas con luz diarias (59) obtenidos de los boletines publicados por el observatorio de radiación solar de la UNAM y del instituto de astronomía de la UNAM, de los años en que se estuvieron recolectando las muestras.

El análisis estadístico consistió en realizar una regresión lineal múltiple entre los niveles de estradiol de cada una de las hembras y la variables climáticas para determinar si existía alguna relación entre sí. Así como una prueba X^2 para determinar la existencia de diferencias entre los niveles de estradiol promedio por estaciones del año en las cuatro hembras adultas.

3. RESULTADOS.

3.1. ESTANDARIZACIÓN.

Las pruebas previas para poder llevar a cabo el RIA dieron como resultado que era factible trabajar con anticuerpos con 100% de reacción cruzada con progesterona ya que todas las muestras entraron dentro de la curva estándar con diluciones que fueron de 1:15 a 1:30 y el control de calidad del análisis dio un coeficiente de variación promedio menor al 10%.

Para estradiol las diluciones que entraron dentro de la curva estándar fueron de 1:5 a 1:10 y el ensayo obtuvo un coeficiente de variación promedio menor al 10%.

El cuadro 1 resume los resultados del cálculo del coeficiente de variación promedio (CVP) de las muestras; la F calculada para la curva estándar (Fc); y el Intra análisis de los controles externos e internos. Se puede observar que todos los ensayos entraron dentro de los parámetros aceptables.

3.2. PATRON LONGITUDINAL HORMONAL.

3.2.1. Hembra 1.

Para progesterona el pico mínimo fue de 44.16 ng/gr de heces secas y el máximo de 6,690ng/gr de heces secas observándose 3 picos de progesterona con un promedio de 85 ± 14 días entre cada uno (figura 1).

El pico mínimo de estradiol fue de 1.14 ng/gr heces secas y el máximo de 112.79 ng/gr de heces secas; los picos máximos mostraron un promedio de 26 ± 10 días entre cada uno (figura 2).

La distribución de los niveles de estradiol y progesterona fecal mostró en el mes de febrero una posible fase lutea de 21 días, ya que los niveles de estradiol durante este mes se encontraban por abajo de los 10 ng a diferencia de los niveles de progesterona, ya que en este mes se presentaron

los picos más altos de todo el período de muestreo. De finales de febrero a junio se observaron niveles altos de estradiol sin picos marcados de progesterona seguidos de descensos de estradiol, pero en agosto se observó un aumento gradual tanto de estradiol como de progesterona para que al onceavo día se presentara un descenso en estradiol pero no así de progesterona. De finales de agosto y hasta el término del período de muestreo se observaron niveles altos de estradiol sin picos de progesterona (figura 3).

3.2.2. Hembra 2.

El pico máximo de progesterona fue de 9679.59 ng/gr con una duración de 35 ± 12 días entre cada uno. El pico mínimo fue de 63.4 ng/gr. No se observaron descensos marcados de los niveles de P4 a lo largo del período de muestreo. Los únicos dos descensos de esta hormona se presentaron en los meses de diciembre a enero y de agosto a septiembre (figura 4).

Para estradiol, el pico máximo obtenido fue de 110.54 ng/gr y el mínimo de 1.04 ng/gr. Aunque la mayoría de los niveles de estradiol no sobrepasan los 20 ng, sí se observa cierta ciclicidad de las concentraciones entre los meses a lo largo del período de muestreo, con un promedio de 33 ± 8 días entre picos (figura 5).

La distribución de los niveles de estradiol y progesterona fecales en la hembra 2, mostró en el mes de noviembre niveles altos tanto de estradiol como de progesterona, para posteriormente presentarse a finales de diciembre un pico de estradiol y una disminución en el nivel de progesterona que nuevamente sufre un incremento de los meses de enero a marzo, con un descenso de los niveles de estradiol por debajo de los 20ng durante este periodo. Los niveles más altos de progesterona se observan de finales de mayo a finales de julio con una duración de 57 días y al finalizar este tiempo se observa un pico de estradiol con una caída en el nivel de progesterona. De los meses de agosto a octubre se observa un cambio en los niveles hormonales, ya que los niveles de progesterona no se mantienen altos por periodos prolongados a comparación de los otros meses y los niveles de estradiol no sufren bajas tan drásticas como las observadas anteriormente (figura 6).

3.2.3. Hembra 3.

El pico máximo obtenido para progesterona fue de 4,697.43 ng/gr y el mínimo de 50.76 ng/gr; la presentación de los picos máximos tuvieron un promedio de 48 ± 4 días entre cada uno y los niveles más bajos se presentaron de mediados de abril a mediados de mayo (figura 7).

El pico máximo para estradiol fue de 125.56 ng/gr y el mínimo fue de 1.38 ng/gr. La presentación de los niveles más altos tuvo un promedio de 22 ± 7 días entre cada uno siendo los meses de junio y julio, en dónde se presentaron los picos más altos para esta hormona (figura 8).

La distribución de los niveles de estradiol y progesterona fecal mostró que en los meses de febrero y marzo se presentaron picos de estradiol seguidos por picos de progesterona con descenso en los niveles de estradiol. En los meses de abril y mayo se observó una caída en los niveles de P4 pero a mediados de mayo se presentó un pico de P4 (figura 9).

3.2.4. Hembra 4.

El pico máximo de progesterona fue de 8,562.9ng/gr, con una duración entre ellos de 30 ± 4 días. El pico mínimo fue de 4.37ng/gr. Los picos más altos de esta hormona se presentaron en los meses de febrero y marzo (figura 10).

El pico máximo de estradiol registrado fue de 127.5 ng/gr y el mínimo de 1.34ng/gr. Los picos máximos mostraron un promedio de 22 ± 6 días entre cada uno de ellos (figura 11).

La gráfica (figura 12) con los niveles de estradiol y progesterona mostró que se presentaron picos de progesterona posteriores a un incremento gradual en los niveles de estradiol.

3.2.5. Hembra 5.

El pico máximo de estradiol fue de 60.2ng/gr y el mínimo de 2.2ng. Para progesterona el pico máximo fue de 1,570.5 ng/gr , presentándose en el mes de agosto y el mínimo de 33 ng/gr (figura 13).

3.3. ESTACIONALIDAD.

3.3.1. Hembra 1.

La gráfica de niveles de estradiol por días (figura 2) no mostró un anestro marcado durante el año, pero con los promedios mensuales (figura 14) se observaron niveles menores de estradiol en los meses de enero y febrero y un aumento en junio y agosto; finalmente al graficar los promedios pero por estaciones del año (figura 15) se observó que hay un aumento gradual de invierno a verano para posteriormente declinar de otoño a invierno.

El análisis estadístico de la comparación de los efectos de las variables climáticas (temperaturas máximas, mínimas y promedio; precipitación pluvial, horas del día con luz y radiación global) en los niveles de estradiol, se encuentran resumidos en el cuadro 3. Este dio como resultado que solo horas con luz obtuvo la relación más alta ($R^2=0.116$), con grado de significancia de $P=0.02$; así como una correlación de tipo positiva ($\beta=0.34$) la cual se puede observar en la figura 16.

3.3.2. Hembra 2.

Los niveles de estradiol en esta hembra presentaron un aumento en los meses de julio a octubre. Esto se observa claramente en la figura 17, que muestra un aumento gradual de junio a septiembre que corresponden a verano y otoño (figura 18).

El análisis estadístico de la comparación de los efectos de las variables climáticas (temperaturas máximas, mínimas y promedio; precipitación pluvial, horas del día con luz y radiación global), sobre los niveles de estradiol dio como resultado, que tanto la temperatura máxima como radiación global obtuvieron la R^2 más alta a comparación de las otras variables y con un grado de significancia para temperatura máxima de $P=0.012$ y para radiación global de $P=0.015$ (cuadro 3). La correlación fue de tipo negativa para las dos variables climatológicas (figura 19 y 20), siendo radiación global la más alta ($\beta = -0.39$) a comparación de la temperatura máxima ($\beta = -0.38$) (cuadro 3).

3.3.3. Hembra 3.

Los promedios mensuales más altos de estradiol fecal se observaron en los meses de junio y julio (figura 21) los cuales corresponden al verano (figura 22)

El análisis estadístico de la comparación entre las variables climáticas y los niveles de estradiol fecal dio como resultado, que solo precipitación pluvial obtuvo la R^2 más alta (0.31) con un grado de significancia de $P=0.046$ y con una correlación de tipo positiva ($\beta=0.50$) (cuadro 3)(figura 23).

3.3.4. Hembra 4.

Los promedios mensuales de los niveles de estradiol en la hembra 4 (figura 24) mostraron un aumento en los meses de junio a agosto, que corresponden al verano (figura 25).

El análisis estadístico de la comparación entre las variables climáticas y los niveles de estradiol fecal no mostró una relación real entre las variables y los niveles de estradiol, ya que el grado de significancia en cada una de ellas fue mayor a 0.05 que es el valor máximo aceptable para P (cuadro 3).

3.3.5. Hembra 5.

El análisis estadístico (cuadro 3) mostró que no existió una relación real entre las variables y los niveles de estradiol y esto seguramente sucedió por el número reducido de datos que se emplearon.

Los niveles hormonales más bajos, en comparación de las otras hembras (cuadro 2), se debieron a que esta hembra es juvenil y aún no ha alcanzado su madurez sexual.

3.3.6. Análisis general de los datos

En general se puede observar que en las hembras existe una tendencia de presentar los niveles más altos durante los meses que corresponden a primavera y verano ($P < 0.05$). No se presentó un factor climatológico que afectara en común a los niveles de estradiol en las hembras del presente estudio. Horas luz, temperatura máxima y precipitación pluvial son los factores que al parecer pudieran estar afectando más los niveles de estradiol en estas hembras. Se realizó una correlación entre los promedios por estaciones del año de los niveles de estradiol y las variables climatológicas. El análisis estadístico dio como resultado que horas con luz solar obtuvo la correlación más alta, pero el grado de significancia fue mayor a 0.05 indicando que no existe una relación real.

4. DISCUSIÓN.

Reportes anteriores de radioinmunoanálisis en felinos no recomiendan anticuerpos con reacción cruzada en un 100% con progesterona (6, 35, 60) por que en gato doméstico por medio de HPLC se demostró que la reacción cruzada no es contra progesterona (35, 36, 37, 38) y que en muestras fecales de gato y guepardo se encontraron diez veces más 20-oxo-gestágenos que 20 α -gestágenos (20 α -dihidroprogesterona) (6, 35). Sin embargo, en el presente estudio se utilizó un anticuerpo con una alta especificidad para progesterona y la unión del antígeno con el anticuerpo en cada uno de los ensayos, entro dentro de la curva estándar que marcaba el kit, así como en los controles de calidad. Así que, se abre la posibilidad de utilizar un anticuerpo con 100% de especificidad para progesterona en el caso de que no se tuviera la oportunidad de obtener un anticuerpo para más de un progestágeno. Pero se debe de tomar en cuenta que el anticuerpo debe de poseer un alto porcentaje de reacción cruzada contra progesterona.

El resuspender el pelet obtenido de la evaporación del sobrenadante con aire solo en etanol y eliminar la utilización del metanol, que se menciona en el protocolo de Brown *et al* (20), no afecta los niveles de metabolitos en el extracto⁵. Tanto el metanol como el etanol son alcoholes primarios y lo único en que se diferencian es que el metanol es de cadena más corta (CH₃-OH) a comparación del etanol (CH₃-CH₂-OH). Por ello el metanol es más volátil a comparación del etanol y por lo tanto es más tóxico (61). Una de las ventajas de resuspender el pelet en diluciones de alcoholes en agua, es que la mayoría de los esteroides fecales se encuentran conjugados y por lo tanto son hidrosolubles (20). El etanol sirve como conservador y evita cambios en el contenido de esteroides en heces, de las muestras (29, 62).

⁵ Brousset, comunicación personal año 2000.

El cuadro 2 muestra los picos máximos y mínimos obtenidos para progesterona; como se observa existe mucha variación entre hembras, siendo la hembra 2 la que mostró el pico máximo más alto y la hembra 5 el más bajo, esto es comprensible ya que esta última es juvenil. El único reporte para esta especie de niveles de progestágenos en heces es una publicación de Moreira *et al* (63), y no reporta los niveles máximos encontrados, pero sí los niveles mínimos los cuales fueron menores a los 9000 ng/gr. Estos son superiores a los encontrados en este estudio, Esto se explica por el tipo de anticuerpo que utilizó para sus ensayos ya que es para más de un progestágeno.

En el caso de los niveles de estradiol se observa más homogeneidad (cuadro 3). Los promedios máximos y mínimos de estradiol fecal (cuadro 3) obtenidos en este estudio son más bajos en comparación con los obtenidos por Morais *et al* (máximos 731 ± 52.3 ng/g; mínimos 131.6 ± 4.5 en 4 hembras adultas) (40, 63). En el presente estudio los niveles máximos de estradiol fecal encontrados fueron de 119.10 ± 8.67 y de 1.22 ± 0.16 (mínimos) a partir de las 4 hembras adultas. La presentación de los picos de estradiol en las cuatro hembras adultas fue de 26 ± 5 días entre cada uno.

Observaciones de tipo conductual realizadas en la hembra 1 (47) reportan, que existe comportamiento sexual en ella y que el macho que tiene como pareja le da monta, pero al parecer no es completa, ya que no se observa la fase final de la conducta de una monta completa. Las gráficas (figuras 1-3) muestran que la hembra esta ciclando de forma regular, pero no se observa una fase lútea lo suficientemente larga que indique la presentación de una gestación o una pseudogestación. Solo se observó en el mes de agosto un aumento gradual de 8 días tanto de progesterona como de estradiol para posteriormente descender estradiol al onceavo día y aparecer un pico de progesterona. Estos datos permiten suponer que en este periodo se presentó una ovulación inducida sin monta o se dio una monta completa por parte del macho. Este tipo de ovulación no es rara en felinos, ya que existen varios reportes de este fenómeno tanto en gatos domésticos (15,14,16,18,19) así como en felinos silvestres como son guepardos (36), pantera nebulosa (39) y leones (36). Este fenómeno se observó también en la hembra 4 la cual se

encuentra confinada sin pareja pero sin embargo se observaron varios picos de progesterona con una caída de estradiol en los meses de febrero, marzo y julio (figura 12) que sugieren ovulación. En el caso de esta hembra hay contacto visual y olfativo con machos de su misma especie y estos estímulos pueden ser suficientes para provocar una ovulación, según lo observado en gatos domésticos (12,14,16,18,19).

En la hembra 2 se observó una fase lutea con los niveles más altos de progesterona de 57 días que correspondería a dos tercios de una gestación normal de hasta 85 días (1,3,45) por lo cual se sospecharía de una pseudogestación, que concuerda con lo reportado en literatura para gato doméstico(12,14,15,17,18), guepardos (34, 60), leones y caracal (60). Esto solo podría ser comprobado por medio de laparoscopia para observar los ovarios de esta hembra y buscar cicatrices de folículos previos.

La hembra 3 es la única que ha tenido partos año tras año durante todo el tiempo que ha estado con su pareja, por desgracia el muestreo fue muy irregular y solo incluye algunos meses; pero aún así es clara la existencia de picos de estradiol seguidos por picos de progesterona. Este comportamiento de los niveles de hormonas corresponde a observaciones de conducta sexual, ya que el pico más alto de progesterona fue observado en el mes de mayo y corresponde a una monta completa detectada por observaciones directas (47). En esta pareja se observó que durante el período de mayor actividad sexual el macho dió más de una monta al día a la hembra y esto corresponde con lo observado en gatos domésticos en donde la respuesta de LH es más grande y más prolongada en hembras con varias montas, en comparación a hembras con una monta única. Por lo tanto la frecuencia en montas completas en gato doméstico, contribuyen a que se mantenga el nivel de LH necesario para desencadenar una ovulación (64, 65). También se ha reportado este tipo de comportamiento en ocelotes mantenidos en cautiverio, ya que una pareja puede copular de seis hasta diez veces al día (3, 45). Por lo tanto podría suponerse que en esta especie también es necesaria la frecuencia en el número de cópulas, para que ocurra una ovulación.

En el caso de estacionalidad y su relación con las variables climáticas en ninguna de las 5 hembras se encontró que una misma variable climatológica estuviera relacionada con los niveles

de estradiol. Al realizar una correlación entre los promedios por estaciones del año y los niveles de estradiol, se encontró que la relación más alta en las 4 hembras adultas (1-4) fue entre los niveles de estradiol y horas con luz solar, pero los grados de significancia en cada una de las hembras fueron mayores a 0.05, lo que indica que la relación podría no ser real, esto causado quizás por que se redujo aún más el tamaño de la muestra.

Se observó en las hembras adultas que en los meses que corresponde a primavera y verano hay un aumento en el promedio de los niveles de estradiol ($P < 0.05$), pero no se presentó un descenso drástico en los niveles de estradiol y progesterona que indicarían un descenso en la actividad folicular que nos indicaría la presencia de un período de anestro. Esto podría sugerir que aunque las hembras no muestran una estacionalidad marcada y pueden llegar a reproducir a lo largo del año, como se ha observado en animales mantenidos en confinamiento (43), ya existe una tendencia a aumentar la actividad reproductiva en los meses que corresponden a primavera y verano. Esto puede estar influenciado quizás por factores climatológicos como son horas con luz solar, precipitación pluvial o temperatura. Las horas con luz tienen un efecto directo en los ciclos reproductivos de felinos(56, 57); pero las tres en conjunto tienen una influencia en la disponibilidad de recursos para las presas de esta especie en vida silvestre, las cuales son importantes para poder mantener una gestación y lactancia exitosa.

5. CONCLUSIONES.

1. Es factible utilizar las heces para evaluar la actividad ovárica en las hembras de ocelote.
2. Para medir progestágenos en esta especie es posible el utilizar anticuerpos con una importante especificidad para progesterona.
3. Aunque los niveles de estradiol son menores a los reportados en esta especie, la utilización de un Kit comercial para medir niveles de estradiol y progesterona fecal es factible.
4. Aunque se observó una tendencia en el aumento de los niveles de estradiol fecal durante los meses que corresponden a primavera y verano, no se podría afirmar la existencia de estacionalidad marcada en esta especie ya que no se observó un anestro marcado en las hembras adultas a lo largo del periodo de muestreo. No se encontró una relación entre los niveles de estradiol en las 5 hembras y las variables climatológicas. Al parecer las horas luz, temperaturas máximas y precipitación pluvial son los factores que influyen más sobre los niveles de estradiol fecal en las hembras de este estudio.
5. El patrón hormonal y de conducta observado en la hembra 3 podría sugerir que el número de montas en esta especie influye en la presentación de la ovulación. Los datos obtenidos en el presente estudio sugieren, que se puede presentar ovulación inducida sin monta en esta especie así como pseudogestación con un tiempo aproximado de dos tercios de la duración normal de la gestación.
6. Es necesario ampliar el número de hembras en un estudio similar así como de muestras recolectadas por cada hembra, e incluso, contar con hembras en diferentes etapas de actividad reproductiva como son: juveniles, gestantes, postparto y lactancia, etc..

6. LITERATURA CITADA.

1. IUCN/SCC Cat Specialist Group. Wild Cats. IUCN The world Conservation Union. Status Survey and Conservation Action Plan. EUA: IUCN/SCC, 1992.
2. Conservación, Análisis y Manejo Planificado (CAMP) para los Felinos de México, UICN/SCC FMVZ-UNAM, Instituto de Ecología A.C., Universidad Veracruzana, Africam Safari y AZCARM. Puebla, México 1995.
3. Gómez de Oliveira T. Neotropical Cats Ecology and conservation. EDUFMA. Press of Universidade Federal do Maranhao, Brasil 1994.
4. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, Fauna Silvestre en México. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables 1990; 534-537.
5. Caso A: Estudio de los felinos neotropicales en el nordeste de México, disertación para obtener el grado de Master in Science por la Universidad de Texas A&M, Kingsville, Estados Unidos 1992.
6. Schwarzberg F, Möstl E, Palma R, Bamberg E. Fecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science* 1996; 42: 515-526.
7. Swanson W F, Wildt D E, Cambre R C, Citino S B, Quingley K B, Brousset D, Morais N R, Moreira N, O'Brien S J, Johnson W E. Reproductive survey of endemic felid species in latin american zoos: Male reproductive status and implications for conservation. *Proceedings of the american association of zoo veterinarians*. AAZV ed, Pittsburg, USA 1994: 374-380.

8. Mellen J D. Factors influencing reproductive success in small captive exotic felids (*Felis* spp.): a multiple regression analysis. *Zoo Biology* 1991; 10: 95-110.
9. Brown J L, Wildt D E. Assessing reproductive status in wild felids by non-invasive fecal steroid monitoring. *International zoo year book* 1997; 35: 173-191.
10. Swanson W F, Wildt D E. Strategies and progress in reproductive research involving small cat species. *International Zoo Year book* 1997; 35: 152-159.
11. Wildt D E, Schiewe M C, Schmidt P M, Gooddrowe K L, Howard J G, Phillips L G, O'Brien S J, Bush M. Developing animal model system for embryo technologies in rare and endangered wildlife. *Theriogenology* 1986; 25: 33-52.
12. Feldman Edward C, Nelson Richard W. Feline Reproduction. In: Feldman E C, Nelson R W, editors. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1996: 741-768.
13. Valencia J, Calderón A, Páramo R M. Aspectos reproductivos de caninos y felinos. En Galina H C, Sattiel C A, Valencia M J, editores. *Reproducción de Animales Domésticos*. México: Limusa, 1988: 362-375.
14. Tsutsui T, Stabenfeldt. Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudo pregnancy in domestic cat. *J Reprod Fert Suppl* 1993; 47: 29-35.
15. Shille V M, Lunström K E, Stabenfeldt G H. Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 β concentrations in plasma: Relation to estrus behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biology of Reproduction* 1979; 21: 953-963.

16. Concannon P W, Lein D H, Hodgson B G. Self-limiting reflex luteinizing hormone release and sexual behavior during extended periods of unrestricted copulatory activity in estrus domestic cat. *Biology of Reproduction* 1989; 40: 1179-1187.
17. Schmidt P M, Chakraborty P K, Wildt D E. Ovarian activity circulating hormones and sexual behavior in the cat: Relationships during pregnancy, parturition, lactation and the postpartum estrus. *Biology of Reproduction* 1983; 28: 657-671.
18. Lawler D F, Johnson S D, Hegstad R L, Keltner D G, Owens S F. Ovulation without cervical stimulation in domestic cats. *Journal of Reprod Fert Supplement* 1993; 47: 57-61.
19. Mellen J D. Factors influencing reproductive success in small captive exotic felids (*Felis spp.*): a multiple regression analysis. *Zoo Biology* 1991; 10: 95-110.
20. Brown J L, Wasser S K, Wildt D E, Graham L H. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids measured noninvasively in feces. *Biology of Reproduction* 1994; 51: 776-786.
21. Knol B W. Stress and the endocrine hypothalamus-pituitary-testis system: a review. *The veterinary quarterly* 1991; 13: 104-114.
22. Moberg G P. How behavioural stress disrupts the endocrine control of reproduction in domestic animals. *J Dairy Sci* 1991; 74: 304-311.
23. Liptrap R M. Stress and reproduction in domestic animals. *Annals New York Academy of Sciences*:1992; 275-284.

24. Carlsted K, Brown J L, Strawn W. Behavioral and physiological correlates of stress. *Applied Animal Behaviour Science* 1993; 38: 143-158.
25. Shile V M, Haggerty M A, Shacleton C, Lasley B L. Metabolites of estradiol in serum bile intestine and feces of the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology* 1990; 34: 779-794.
26. Hil-J Makin. *Biochemistry of steroids hormones* 2nd ed. Blackwell scientist Publication. Great Britain , 1984.
27. Goldfien Alan, Monroe Scot E. *The Ovaries*. In Greenspan F, Forsham P, editors. *Basic and clinical Endocrinology* 2nd ed. Lange medical publication. USA, 1986: 385-430.
28. Lasley B. L., Kirkpatrick J. F. Monitoring ovarian function in captive and free ranging wildlife by means of urinary and fecal steroid. *Journal of Zoo Wildlife Medicine*. 1991; 22: 23-31.
29. Peter A. T., Crister J. K., Kapustin N. Analysis of sex steroid metabolite excreted in the feces and urine of non domestic animals. *Compendium Continue Education*. 1996; 18: 781-792.
30. Brown J. L., Wasser S. K., Wildt D. E., Graham L. H., Montert S. L. Fecal analysis for monitoring ovarian species. *Proceeding of the first international symposium on physiology and ethology of wild and zoo animal*. Berlin, Germany. 1996: 27-31.
31. Zambrano A F, Díaz S V. El radioinmunoanálisis y su control de calidad. Centro nuclear de México Nabor Carrillo e Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, México 1996.
32. Erb L, Lasley N M, Czekala N M, Monfort S L, Bercovitz A B. A dual radioinmunoassay and cytosol receptor binding assay for the measurement of estrogenic compounds applied to urine, fecal and plasma samples. *Steroids* 1982; 39: 33-46.

33. Brown J L, Bonnie R, Schwartz R, Evans M, Hoyt R, Volk T, Wildt D E, Graham L H.
Development and utility of fecal progesterone analysis to assess reproductive status in felids.
Proceeding American Association of Zoo Veterinarians, USA 1993; 273-278.
34. Karim M F, Taylor W. Steroid metabolism in the cat, Biliary and urinary excretion of metabolites
of (14-¹⁴C) estradiol. *Biochem Journal* 1970; 117:267 abstr.
35. Möstl E, Lehman H, Wenzel U. Gestagens in the faeces of mink and cats for monitoring corpus
luteum activity. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 1993; 47: 540-541.
36. Brown J L, Wildt D E, Wilebnowski N, Gooddrowe L H, Graham L H, Wells S, Howard J G.
Reproductive activity in captive female cheethas (*Acinonyx Jubatus*) assessed by fecal
steroids. *Journal of Reproduction and Fertility* 1996; 106: 337-346.
37. Czekala N M, Durrant B S, Callison L, Williams M, Millard S. Fecal steroid hormone analysis as
an indicator of reproductive Function in the cheetah. *Zoo Biology* 1994, 13: 119-128.
38. Graham L H, Raeside J I, Goodrowe K L, Liptrap R M. Measurements of fecal oestradiol and
progesterone in non-pregnant and pregnant domestic and exotic cats. *Journal of Reproduction
and Fertility Suppl* 1993; 47: 119-120.
39. Brown J L, Wildt D E, Graham L H, Byers A P, Collins L, Barret S, Howard J G. Natural versus
chorionic gonadotropin ovarian responses in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) assessed
by fecal steroid analysis. *Biology of Reproduction* 1995; 56: 93-102.

40. Morais R N, Moreira N, Moraes W, Mucciolo R G, Lacerda O, Gomes M L, Swanson W F, Graham L H, Brown J L. Testicular and ovarian function in south american small felids assessed by fecal steroids. Proceedings American Association of zoo veterinarians; 1996; Puerto Vallarta México Guadalajara (Jal): AAZV, 1996: 561-565.
41. Shideler S E, Ortuno A M, Moran F M, Lasley B L. Simple extraction and enzyme immunoassay for estrogen and progesterone metabolites in the feces of *Macacca fascicularis* during non-conceptive andceptive ovarian cycles. *Biology of Reproduction* 1993; 48: 1290-1298.
42. Wasser S K, Thomas R, Nair P P, Guldry C, Southers J, Lucas J, Wildt D E, Monfort S L. Effects of dietary fibre on fecal steroid measurements in baboons (*Papio cynocephalus cynocephalus*). *Journal of Reproduction and Fertility* 1993; 97: 569-574.
43. Winter J, Bockkenheuser V D. Bacterial metabolism of natural and syntetic sex hormones undergoing enterohepatic circulation. *Journal of Steroid Biochemistry* 1987; 27: 1144-1149.
44. Brown D E. The ocelot. In: Audubon Wild Life Repport, editor. Audubon Wild Life Repport 1989/1990, 1990: 420-433.
45. Mellen J D. Reproductive behaviour of small captive exotic cats (*Felis spp.*). (Thesis for of the degree of doctor of philosophy). California E. U.: University of California, Davis Ca, 1989.
46. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Cuademo Estadístico Delegacional Miguel Hidalgo. México (DF): INEGI, 1998.
47. Alcaraz Sosa Luz Elena. Comportamiento reproductivo de tres parejas de ocelote (*Leopardus pardalis*) en cautiverio (tesis de licenciatura). México D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2001.

48. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Cuademo Estadístico Delegacional Gustavo A Madero. México (DF): INEGI, 1998.
49. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Anuario Estadístico del Estado de Chiapas. México: INEGI, 1998.
50. Dudley R A, Edwards P, Ekins R P, Finney D J, Mc Kenzie I G M, Raab G M, Rodbard D, Rodgers R P C. Guidelines for immunoassay data processing. *Clin Chem* 1985; 31: 1264-1271.
51. Bedolla T A, Ulloa A A, Landeros V J, Pérez P G. Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis: Guía para la evaluación de los resultados.
52. Bronson Franklin H, Heideman Paul D. Seasonal regulation of reproduction in mammals. In Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction* 2nd ed. Raven Press, Ltd., New York, 1994; 541-583.
53. Bronson Franklin H. Mammalian reproductive strategies: genes, photoperiod and latitude. *Reproduction and Nutrition Development*. 1988; 28: 335-347.
54. Stabenfeldt George H. Endocrinología. En Cunningham James G, editor. *Fisiología veterinaria*. México: Interamericana McGraw-Hill, 1994; 409-493.
55. Turek Fred W, Cauter Van E. Rhythms in reproduction. In Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction* 2nd ed. Raven Press, Ltd., New York, 1994; 487-540.
56. Stabenfeldt George H. Reproducción /Lactación. En Cunningham James G, editor. *Fisiología veterinaria*. México: Interamericana McGraw-Hill, 1994; 473-505.

57. Leyva H, Addiego L, Stabenfeldt G. The effect of different photoperiods on plasma concentrations of melatonin, prolactin and cortisol in the domestic cat. *Endocrinology* 1984; 115: 1729-1736.
58. Observatorio de Radiación Solar, UNAM. Boletín de datos de radiación solar. Reportes internos de 1997 al 2000. Sección editorial del instituto de geofísica de la UNAM, México D.F.
59. Instituto de Astronomía UNAM. Anuario del observatorio astronómico nacional, de 1997 al 2000. Instituto de astronomía; ciudad universitaria UNAM. México, D.F.
60. Graham L H, Goodrowe K L, Raeside J L, Liptrap R M. Non-invasive monitoring of ovarian function in several felid species by measurement of fecal estradiol-17 β and progestins. *Zoo Biology* 1995; 14: 223-237.
61. Flores Teresita, Ramírez Arcelia. Química orgánica 7ª ed. Edit, Esfinge. México, 1994: 193-207.
62. Wasser Samuel K, Risler Linda, Steiner Robert A. Excreted steroids in primate faces over the menstrual cycle and pregnancy. *Biology of reproduction* 1988; 39: 862-872.
63. Moreira N, Monteiro-Filho E L A, Moraes W, Swanson W F, Graham L H, Pasquali O L, Gomes M L F, Moraes R N, Wildt D E, Brown J L. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. *Zoo Biology* 2001; 20: 103-116.
64. Wildt D E, Seager S W, Chakraborty P K. Effect of copulatory stimuli on incidence of ovulation and on serum luteinizing hormone in the cat. *Endocrinology* 1980; 107: 1212-1217.

65. Wildt D E, Chan S Y W, Seager S W J, Chakraborty P K . Ovarian activity, circulating hormones and sexual behaviour in the cat., I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrus period without mating. *Biology of reproduction* 1981; 25: 15-28.

CUADRO 1

Control de calidad del ensayo.

Muestra	Intra análisis									
	Curva est				Control Interno			Control externo (suero gata)		
	% CVP	Fc	Grad liv	Ft	X gen	S gen	%CV gen	X gen	S gen	%CV gen
E17 Hembra 1	0.059	0.35	6,4	4.53	7377.3	578.87	8	9264	671	7
E17 Hembra 2	0.072	0.10	6,4	4.53	3452.66	181.75	5.26	9881	295.5	3
E17 Hembra 3-5	0.092	0.84	6,4	4.53	2488.5	220.33	9	5916	125	2.1
P4 Hembra 1	0.069	0.92	7,5	3.97	7145	430.66	6	6863.75	609.40	8.87
P4 Hembra 2	0.040	0.69	7,5	3.97	14237.83	118.8	0.83	*	*	*
P4 Hembra 3-5	0.043	1.15	7,5	3.97	6173	161.07	2.60	9305	1010	10

*Se aceptan CVP menores a 10% (30,50).

**Si Fc<Ft se acepta (con 95% de confianza).

*Sueros con diferentes diluciones (1ª Prueba).

CUADRO 2

Resumen de los valores máximos y mínimos en cada una de las hembras.

	HEMBRA 1	HEMBRA 2	HEMBRA 3	HEMBRA 4	HEMBRA 5	*PROM.	*DES. VEST.
E17 máximos. (ng/gr)	112.79	110.54	125.56	127.5	60.9	119.10	8.67
E17 mínimos (ng/gr)	1.14	1.04	1.38	1.34	2.2	1.22	0.16
P4 máximos (ng/gr)	6690	9679.59	4697.43	8562.9	1570.5	7407.49	2187.59
P4 mínimos (ng/gr)	44.16	63.4	50.76	41.37	33.0	49.92	9.80

* Promedio y desviación estándar de las 4 hembras adultas (Hembra 1-4).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUADRO 3.

Regresión lineal múltiple entre los niveles de estradiol fecal y las variables climatológicas.

	Temp. Máxima			Temp. Mínima			Temp. Promedio			Precip. Pluvial			Horas del día con luz			Radiación global		
	R ²	P	β	R ²	P	β	R ²	P	β	R ²	P	β	R ²	P	β	R ²	P	β
Hembra 1	0.009	0.52	0.098	0.077	0.06	0.28	0.038	0.19	0.197	0.005	0.62	-0.07	0.116	0.021*	0.34	0.02	0.3	0.158
Hembra 2	0.14	0.012*	-0.38	0.006	0.6	-0.08	0.081	0.06	-0.29	0.007	0.93	0.013	0.009	0.53	-0.1	0.14	0.015*	-0.39
Hembra 3	0.23	0.44	0.231	0.083	0.33	0.29	0.113	0.26	0.336	0.31	0.046*	0.56	0.17	0.16	0.41			
Hembra 4	0.14	0.1	-0.38	0.083	0.23	0.29	0.007	0.73	-0.08	0.022	0.53	0.151	0.069	0.27	0.26			
Hembra 5	0.044	0.50	-0.21	0.017	0.68	-0.13	0.034	0.56	-0.19	0.010	0.74	0.103	0.11	0.29	0.33			

*P<0.05

(En las hebras 3, 4, 5 no se obtuvieron datos de radiación global en Tuxtla Gutiérrez Chiapas)

Fig.1 Distribución anual de niveles de progesterona fecal en la hembra 1.

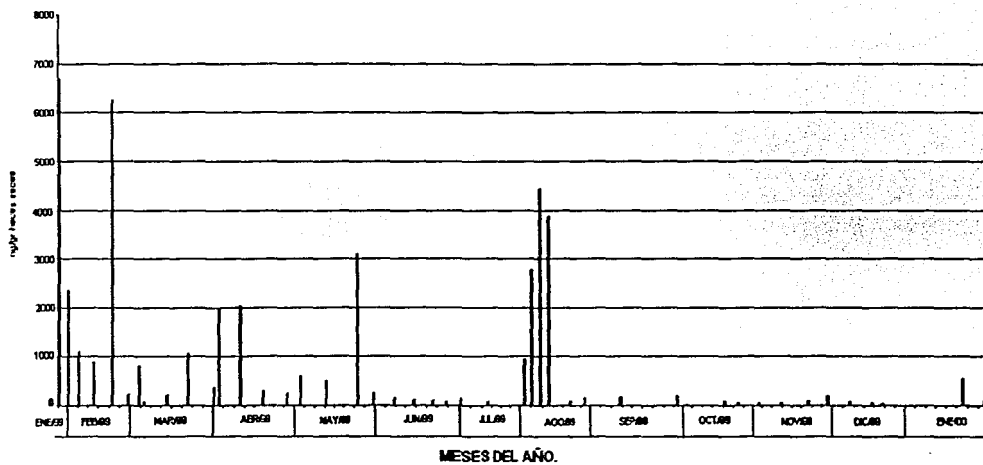


Fig.2 Distribución anual de niveles de estradiol fecal en la hembra 1.

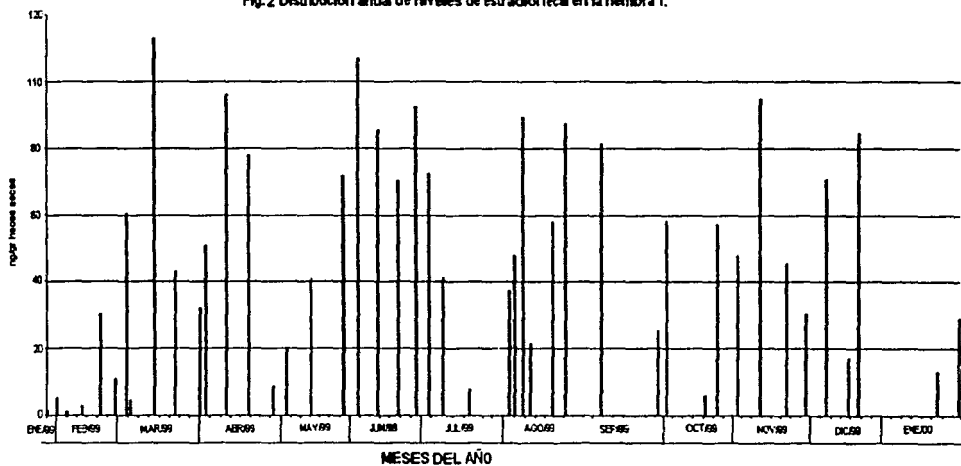


Fig.3 Distribución anual de los niveles de progesterona y estradiol fecal en la hembra 1.

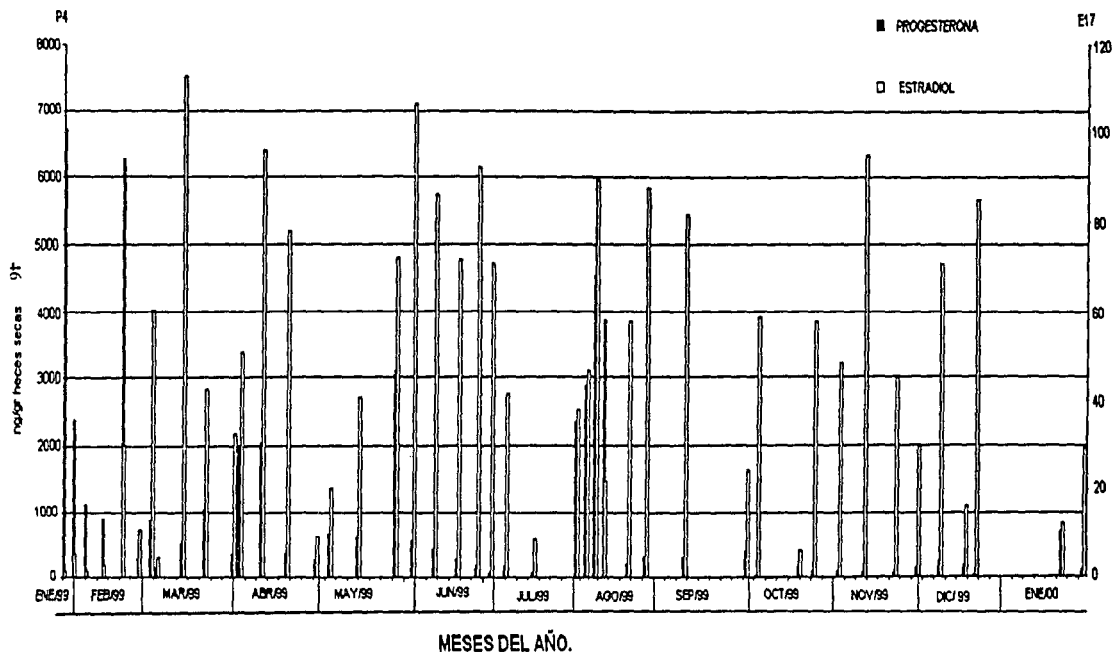
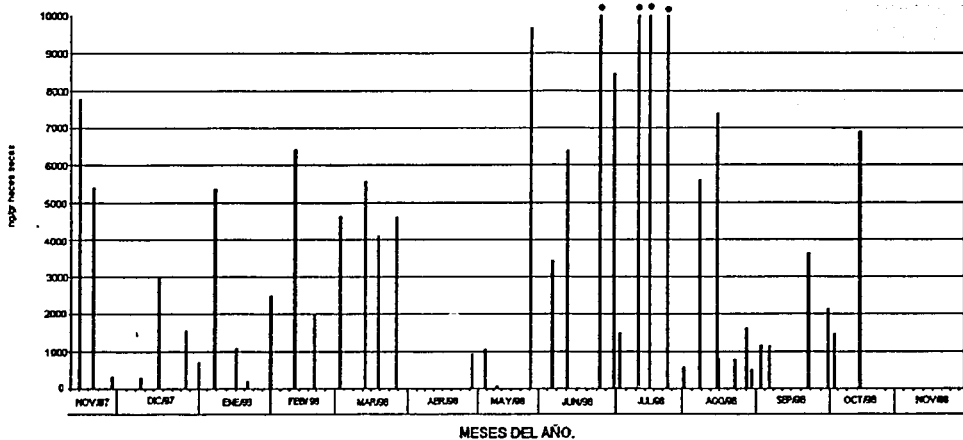


Fig. 4 Distribución anual de niveles de progesterona fecal en la hembra 2.



• Fuera de la curva estandar.

Fig. 5 Distribución anual de niveles de estradiol fecal en la hembra 2.

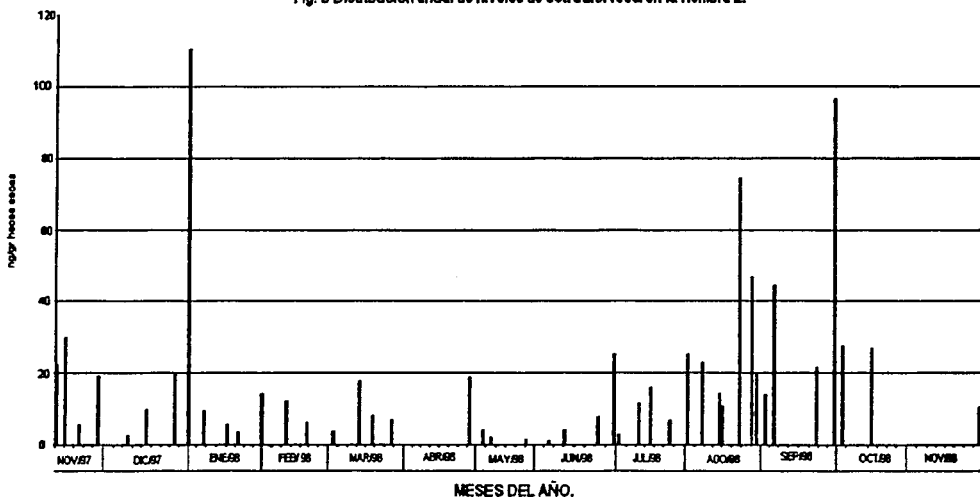
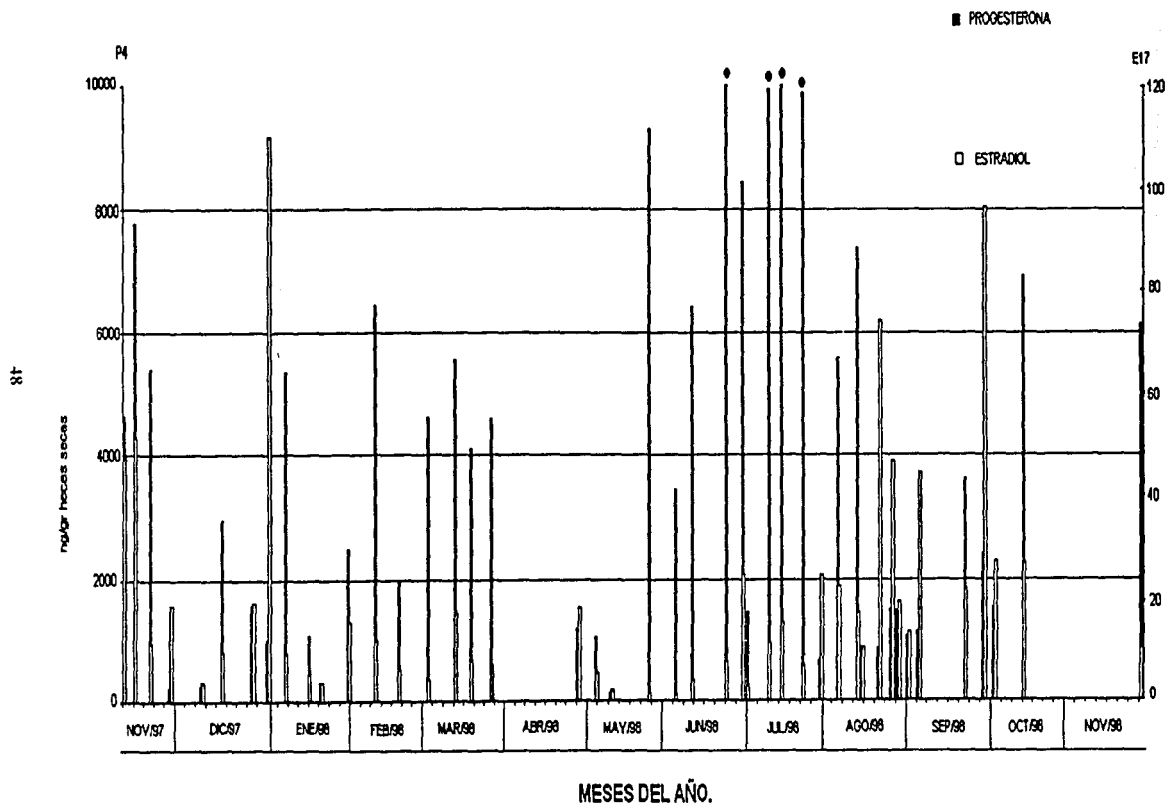


Fig 6. Distribución anual de los niveles de progesterona y estradiol fecal en la hembra 2.



* Fuera de la curva estandar.

Fig. 7 Distribución de los niveles de progesterona fecal en la hembra 3.

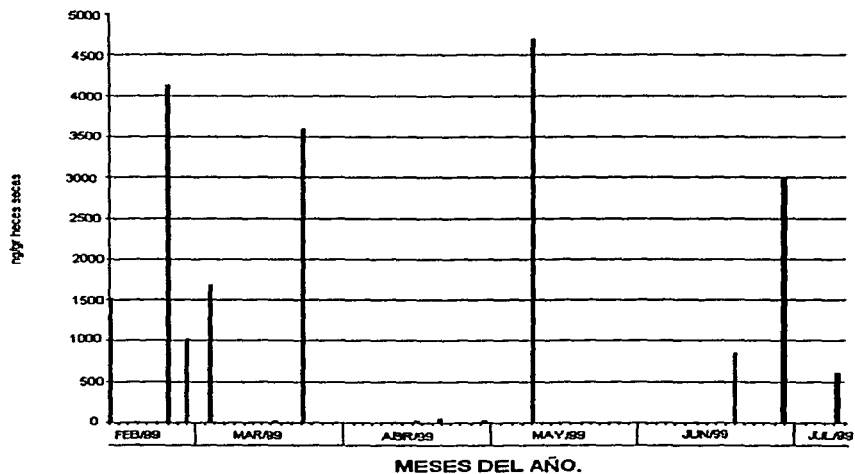


Fig. 8 Distribución de los niveles de estradiol fecal en la hembra 3.

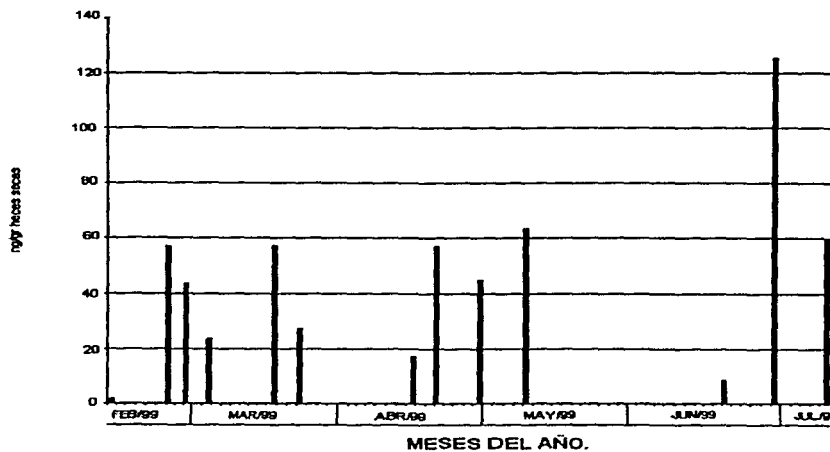
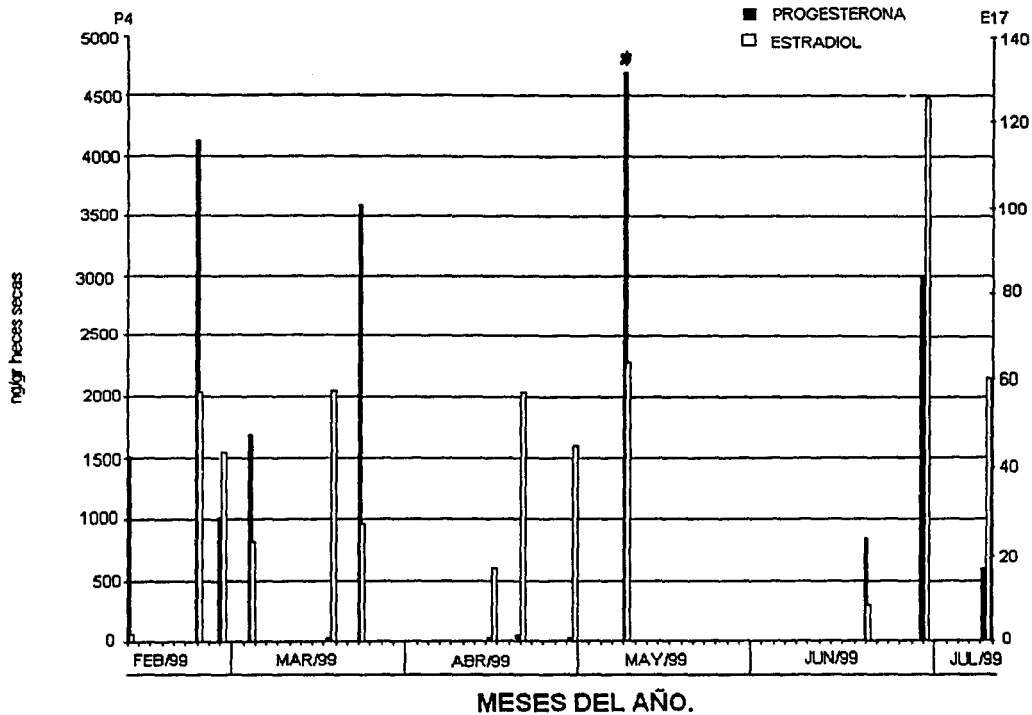
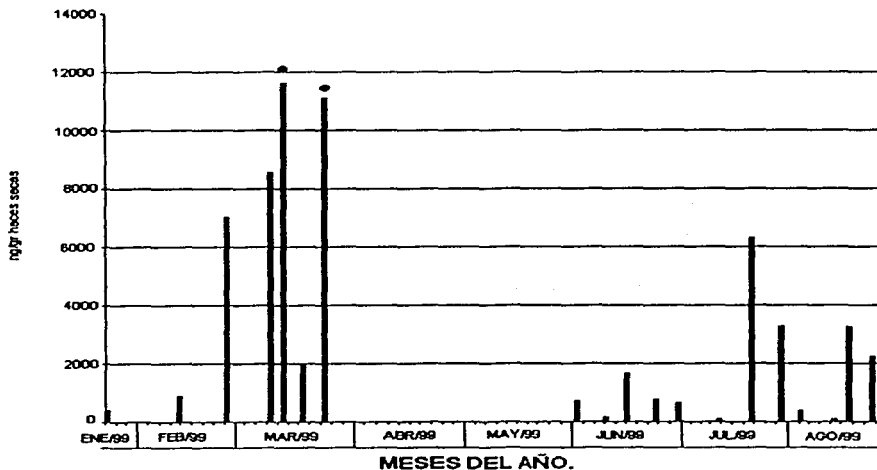


Fig. 9 Distribución de los niveles de progesterona y estradiol fecal en la hembra 3.



* Muerte completa corroborada por observaciones directas.

Fig. 10 Distribución de niveles de progesterona fecal en la hembra 4.



• Fuera de la curva estandar.

Fig. 11 Distribución de niveles de estradiol fecal en la hembra 4.

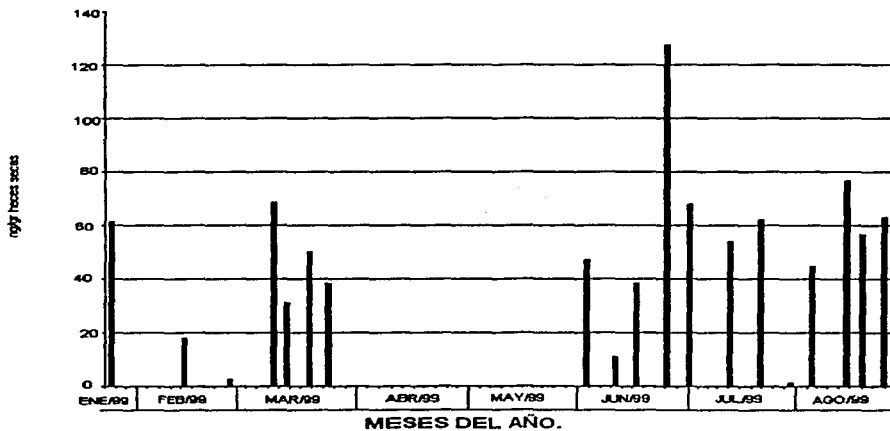
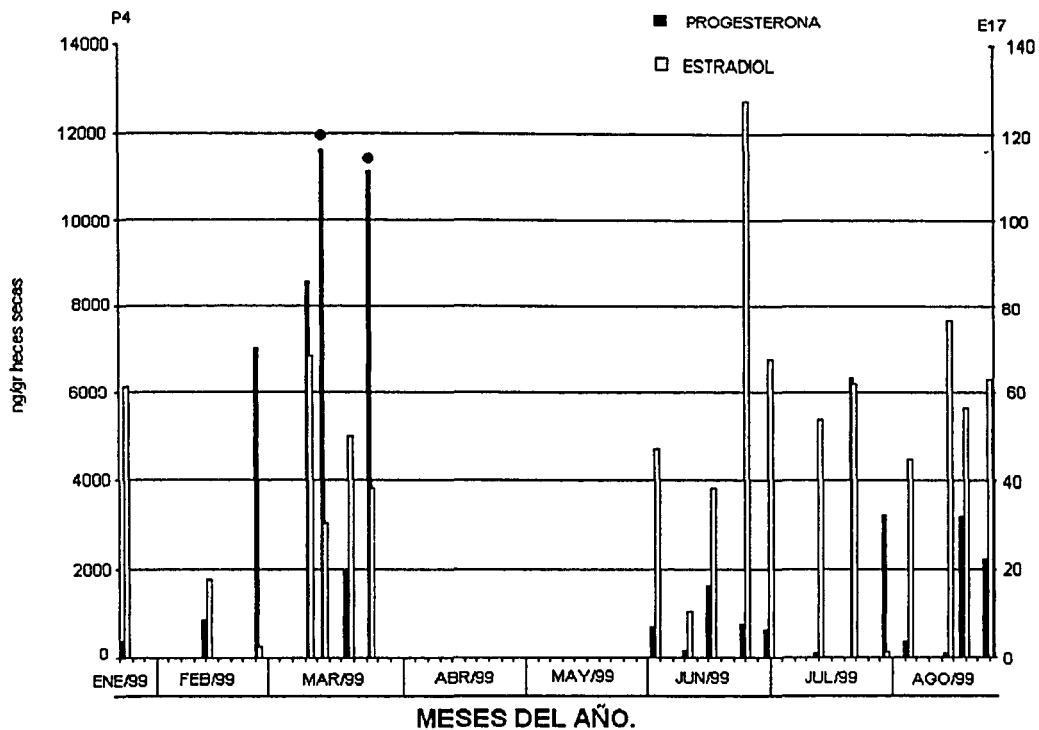


Fig.12 Distribución de los niveles de progesterona y estradiol fecal en la hembra 4.



• Fuera de la curva estandar.

Fig.13 Distribución de los niveles de progesterona y estradiol fecal en la hembra 5

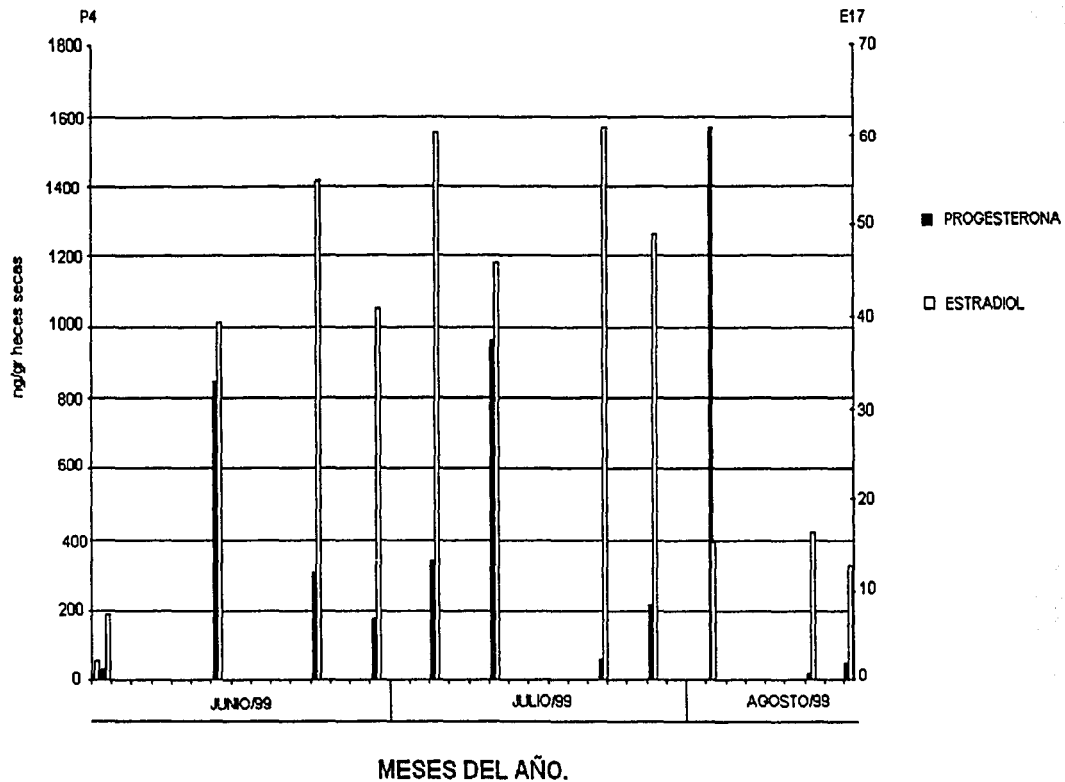


Fig. 14 Distribución de los promedios mensuales de niveles de estradiol en la hembra 1 (líneas verticales muestran error estándar).

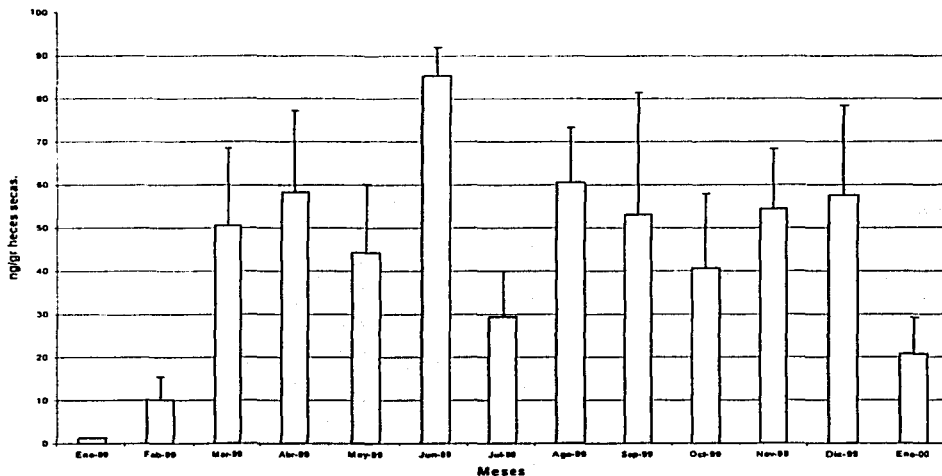


Fig 15. Promedio por estaciones del año de estradiol fecal en la hembra 1 (líneas verticales muestran desviación estándar).

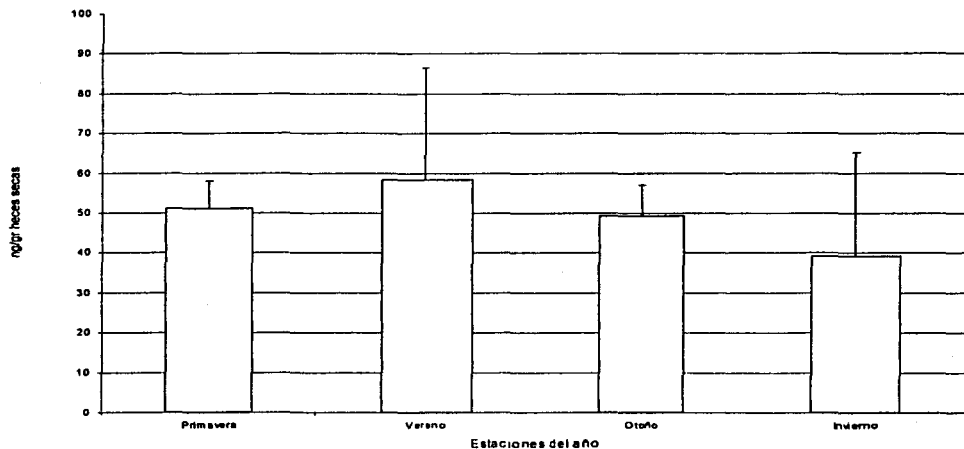


Fig 16. Relación entre los niveles de estradiol fecal y horas con luz solar en la hembra 1.

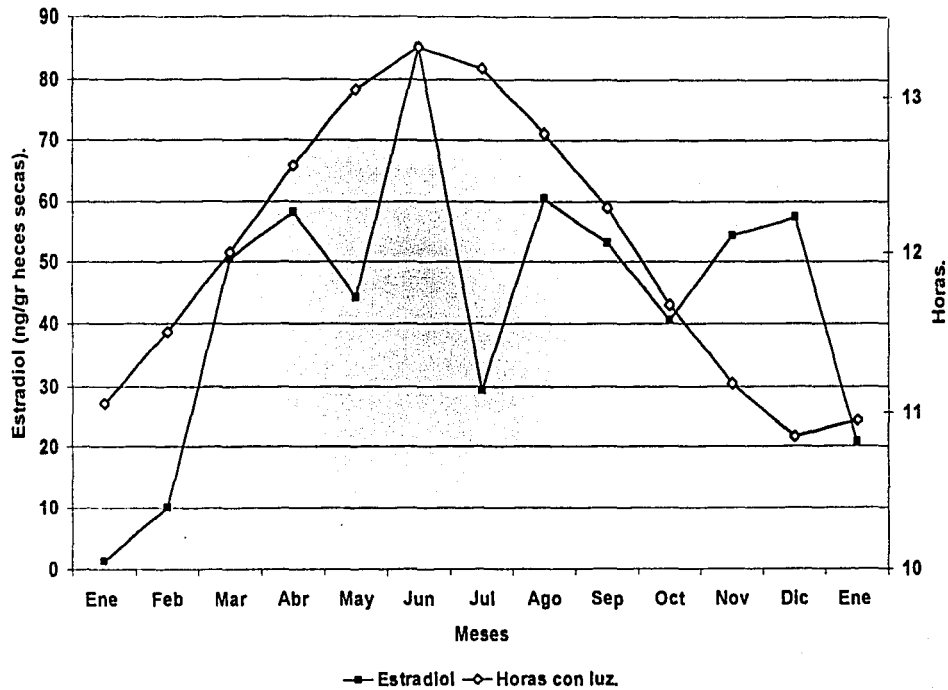


Fig. 17 Distribución de los promedios mensuales de niveles de estradiol en la hembra 2 (líneas verticales muestran error estándar).

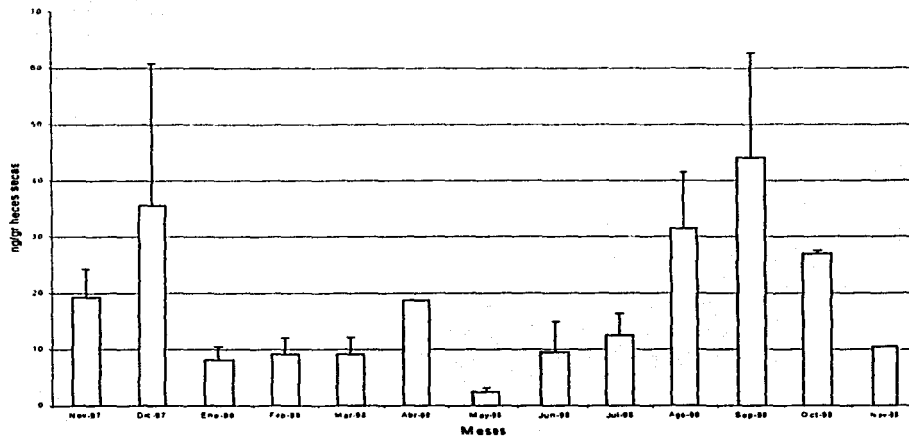


Fig. 18 Promedio por estaciones del año de estradiol fecal en la hembra 2 (líneas verticales muestran desviación estándar).

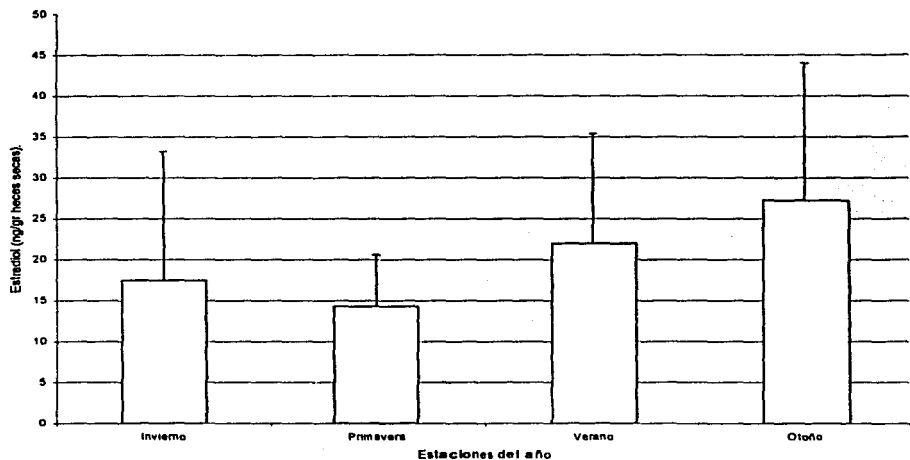


Fig 19. Relación entre los niveles de estradiol fecal y temperaturas máximas en la hembra 2.

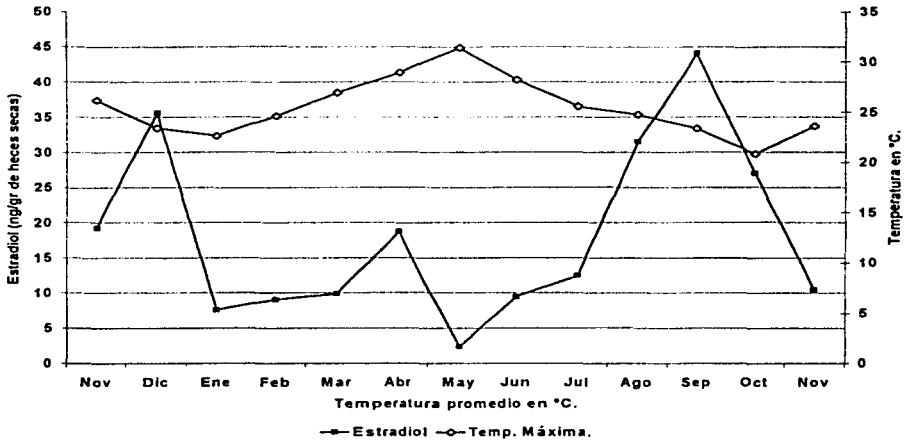


Fig 20. Relación entre los niveles de estradiol fecal y radiación global en la hembra 2.

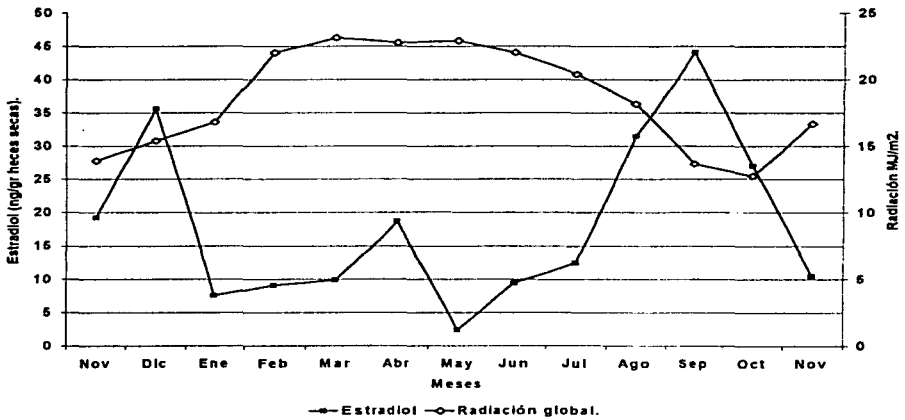


Fig. 21 Distribución de los promedios mensuales de niveles de estradiol en la hembra 3 (líneas verticales muestran error estándar).

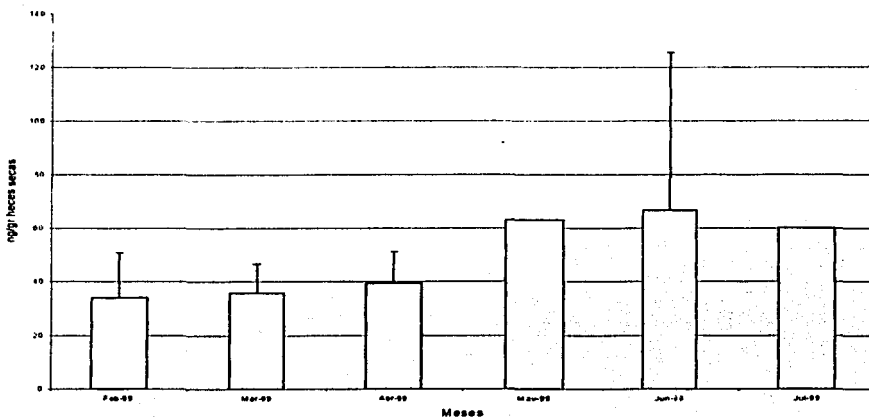


Fig 22. promedio por estaciones del año de estradiol en la hembra 3 (líneas verticales muestran desviación estándar).

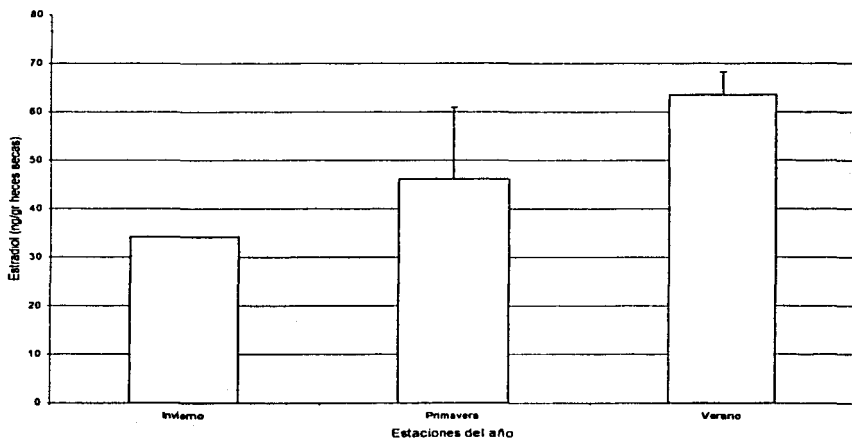


Fig. 23 Relación entre los niveles de estradiol fecal y precipitación pluvial en la hembra 3.

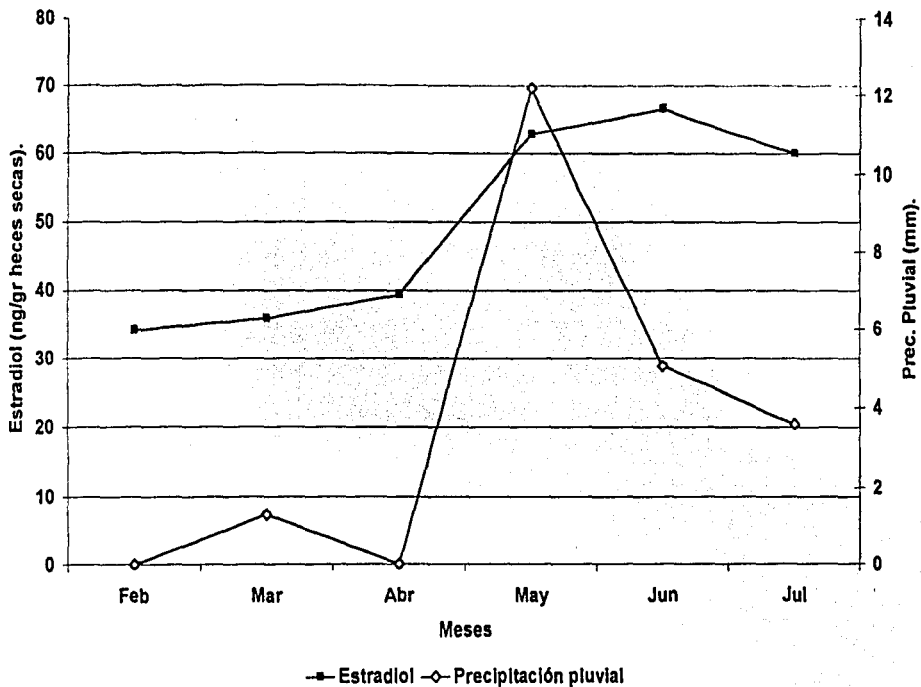


Fig. 24 Distribución de los promedios mensuales de niveles de estradiol en la hembra 4 (líneas verticales muestran error estándar).

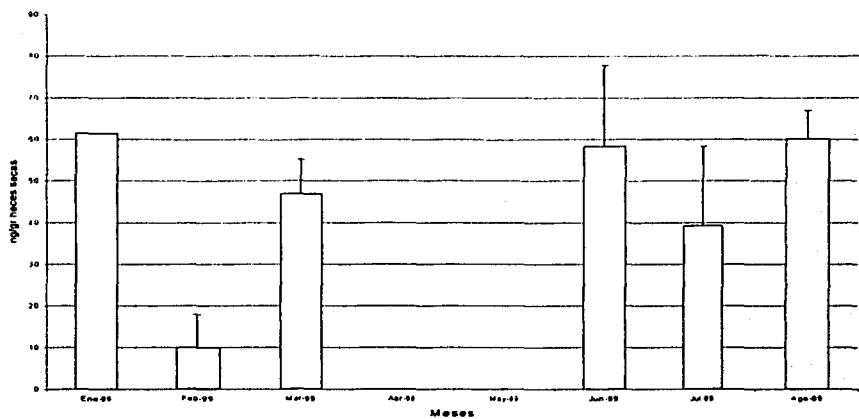


Fig 25. Promedio por estación del año de estradiol fecal en la hembra 4 (líneas verticales muestran desviación estándar).

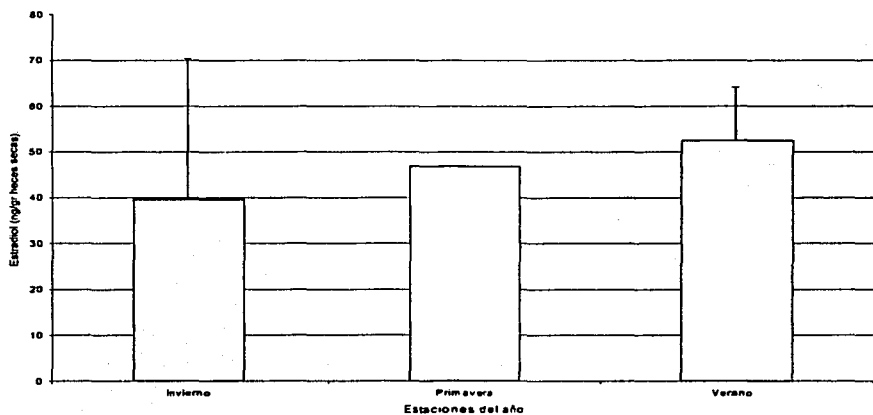
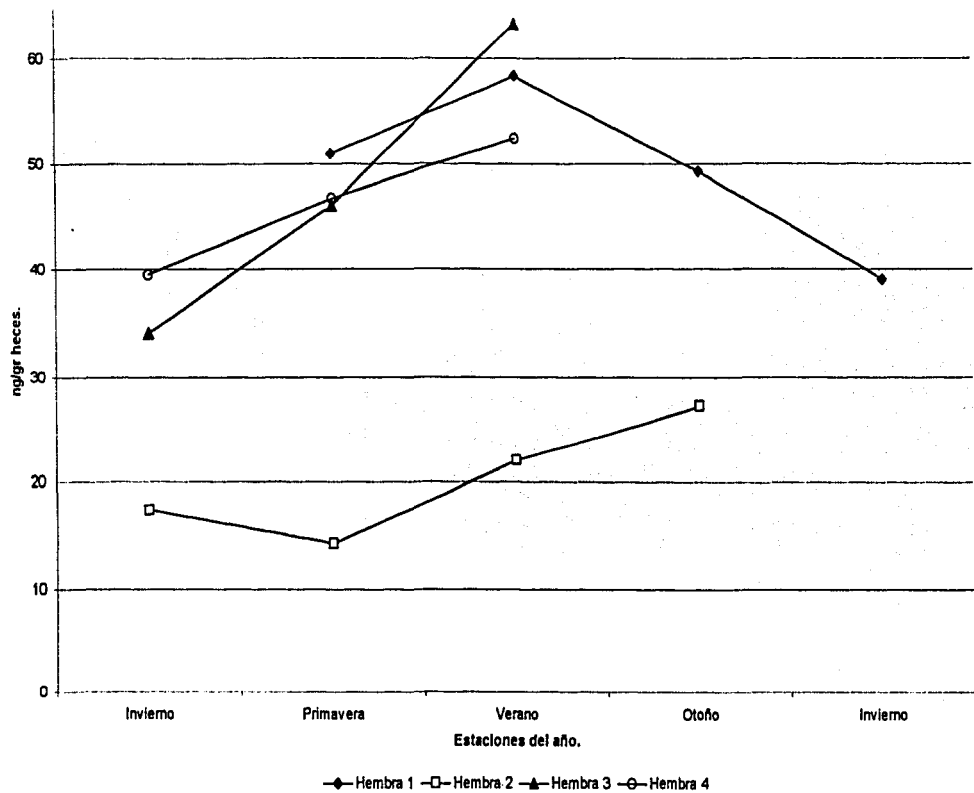


Fig. 26 Distribución por estaciones del año de los niveles de estradiol en las 4 hembras adultas.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN