

DETERMINACIÓN DE ESTEROIDES REPRODUCTIVOS EN HECES DE
RINOCERONTE BLANCO DEL SUR (*Ceratotherium simum simum*)

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
Medico Veterinario Zootecnista

Por

Emilio Rendón Franco

Asesores

Dra. Dulce Ma. Brousset H-J.
Dra. Marta Romano Pardo
MVZ. Alberto Paras García
Biol. Ricardo A. Valdez Pérez

México, D.F.,

2004



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.

DEDICATORIA

A mi madre y hermanos ya que gracias a ellos puede llegar hasta aquí.

A aquellos maestros que con su dedicación me inculcaron un amor al estudio y a esta maravillosa carrera.

A mis amigos quienes simplemente estuvieron ahí.

A mis compañeros y alumnos quienes tuvieron un directo efecto sobre mi formación.

Y finalmente a la madre tierra por crear tan maravillosas criaturas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a mis asesores, D. Brousset, M. Romano, A. Paras y R. Valdez por todo su apoyo confianza y enseñanzas a través de todo este proceso.

A todo personal de laboratorio del CINVESTAV por toda su ayuda así como su paciencia.

Al Zoológico Africam Safari por todas las facilidades prestadas para la realización de este trabajo y en especial Alan quien colecto las muestras de heces y a Gerardo Martínez gracias a quien se pudieron coleccionar las muestras de suero.

CONTENIDO

Página

I	RESUMEN	1
II	INTRODUCCIÓN	2
2.1	Antecedentes y características de la especie.....	2
2.2	Situación actual de los rinocerontes.....	4
2.3	Fisiología de la reproducción de los rinocerontes.....	6
2.4	Metabolismo de esteroides reproductivos.....	7
2.5	Estudios de esteroides reproductivos en rinocerontes...	8
III	HIPÓTESIS	13
IV	OBJETIVOS	14
V	MATERIAL Y METODOS	15
5.1	Animales	15
5.2	Medición de esteroides reproductivos a partir de muestras de heces	16
VI	RESULTADOS	22
6.1	Protocolo de extracción	22
6.2	Hembra 1	22
6.3	Hembra 2	23
6.4	Machos	24
VII	DISCUSIÓN	25
VIII	LITERATURA CITADA	35
IX	FIGURAS	30

I RESUMEN

EMILIO RENDÓN FRANCO. Determinación de esteroides reproductivos en heces de rinoceronte blanco del sur (*Ceratotherium simum simum*) (bajo la dirección de Dra. Dulce Ma. Brousset H-J, Dra. Marta Romano Pardo, MVZ. Alberto Paras García y Biol. Ricardo A. Valdez Pérez).

La finalidad de este estudio fue estudiar el ciclo sexual del rinoceronte blanco del sur (*Ceratotherium simum simum*), a través de los niveles de esteroides reproductivos. Para ello se colectaron heces de 2 hembras y 3 machos mantenidos en cautiverio. Los cuales se analizaron por medio de radioinmunoanálisis (RIA), en donde se determinaron variaciones longitudinales en progesterona y 17- β estradiol. Los valores de progesterona en las muestras de las hembras, variaron de 0.5 a 31.0 ng/gr de heces secas (hs) (n=40) detectándose elevaciones transitorias en ambas hembras. Los valores de 17- β estradiol variaron de 57.2 a 2154.2 pg/gr hs (n=40). Los niveles de testosterona a partir de muestras de heces para tres machos fueron de 0.07 a 17.6 ng/gr hs (n=46). Únicamente para uno de los machos se colectaron muestras de suero y heces simultáneamente, los niveles de testosterona en suero fueron de 167.3 a 597.8 pg/ml (n=6), mientras que los niveles de testosterona obtenidos de las muestras de heces variaron de 5.5 a 10.2 ng/gr hs (n=8). No existen precedentes de los valores de testosterona en ningún tipo de muestra en los machos de esta especie.

II INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes y características de la especie.

Los perosidáctilos, orden a la que pertenecen los rinocerontes (27), fueron muy abundantes en el planeta durante la era terciaria. Estos animales tuvieron su origen dentro del grupo específico de los *Condylathra*, llamados *Phenacodontia*, que incluye a los ungulados originales. De aquí surgió el género *Trigonias* en el Oligoceno, que es el trazo mas temprano que se tiene de los rinocerontes (28).

En la actualidad existen 5 especies de rinocerontes (14,19,27,28) dispuestos en 4 géneros (19,28). De estas especies, 3 son asiáticas: rinoceronte indio (*Rhinoceros unicornio*), rinoceronte de Java (*Rhinoceros sondaicus*) y rinoceronte de Sumatra (*Dicerorhinus sumatrensis*) y 2 son africanas, rinoceronte negro (*Diceros bicornis*) y rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum*). El rinoceronte blanco cuenta con 2 subespecies, rinoceronte blanco del sur (*Ceratotherium simum simum*) y rinoceronte blanco del norte (*Ceratotherium simum cottoni*) (14,19,27,28) (Figura 1).

El rinoceronte blanco es el mas grande de los rinoceronte actuales (27,28). El nombre científico de esta especie proviene del griego "cerato" que significa cuerno, "therium" que significa bestia y "simum" que significa labio grueso (14). Esta última es una característica representativa de la especie ya que por sus hábitos alimenticios son animales

herbívoros que pastan, consumiendo herbáceas y arbustos pequeños que no exceden los 15 cm de altura (27), por lo que cuentan con un labio grueso y recto (19,27,28) (Figura 2).

Las dimensiones del rinoceronte blanco machos adulto van de los 2000 a 3600 kg. de peso y de 1400 a 1800 kg. para las hembras (19,22,28); su altura a la cruz varia de 1.70 a 1.90 m y de 1.60 a 1.77 m, respectivamente (19,28). Su piel es gruesa (27) y con colores que van del café amarillento al gris (22) y no blancos como pudiese indicar su nombre. Tienen orejas medianas muy puntiagudas y móviles, ojos pequeños (27) y una cola que llega a medir hasta 70 cm (22,28). Cada miembro tiene tres dedos, lo que da la forma inconfundible de un trébol a la impresión de su huella (19). Su fórmula dentaria es I 0/0 C 0/0 PM 3/3 M 3/3 (22), de donde se distingue el hecho de que carecen de incisivos y caninos, a diferencia de sus parientes asiáticos (22,28). Finalmente, una marca indiscutible de los rinocerontes en general son sus cuernos, los rinocerontes blancos tiene un par de cuernos que están formados de queratina por lo que se dice que están hechos de pelo comprimido y no están vascularizados como los cuernos de otros herbívoros. Estos cuernos pueden medir de 50 a 201 cm el anterior (14,19,22,27) y de 16 a 60 cm el posterior (19,27) (Figura 3).

En cuanto a su comportamiento en vida silvestre, el rinoceronte blanco es el más sociable de las especies existentes de rinocerontes(19). Debido a esto la estructura social es compleja y se conocen alrededor de 10 vocalizaciones en esta especie (22). En contraste con el rinoceronte negro, el cual es muy temperamental, el rinoceronte blanco tiene un temperamento medio y no es

agresivo con otras especies (22). Los machos adultos generalmente son solitarios (14,19,22) y territoriales, sus territorios varían de acuerdo a la disponibilidad de alimento y pueden ir de los 0.75 a los 13.80 km² (22) y estos no se sobreponen a los de otros machos (23). Por otro lado los que ocupan las hembras son mucho mas grandes que los que ocupan los machos, llegando a medir desde 6 hasta 45 km² y por esta situación se sobreponen a los de uno o varios machos (22). Las hembras y juveniles rara vez están solos (14), formando grupos pequeños compuestos por hembras, sus crías y juveniles (23), sin embargo pueden generarse asociaciones temporales de varias hembras con sus crías o de parejas de juveniles de distinto sexo ya que no hay indicios de territorialidad en ellos (19,22,23). Un macho adulto es tolerante con juveniles y hembras en su territorio, mismo que limitan a través de la orina o por peleas aunque estas son generalmente ritualizadas, es decir no hay contacto directo y rara vez hay peleas serias salvo en la época de estro (22), que es el único momento en el que los machos adultos se ven acompañando a las hembras en celo y procurando mantenerlas dentro de su territorio (23).

La mayor parte de la actividad de estos animales se da en las primeras horas del día, al caer la tarde y durante la noche, ocupando el medio día para descansar y enlodarse, para así protegerse de mosquitos y disipar el calor (22).

2.2 Situación actual de los rinocerontes.

Hace 2000 años el género *Ceratotherium* se extendía arriba del Valle del Nilo al sur de Egipto y ocupaba gran parte del Noroeste de África. En el siglo XIX la población de

rinocerontes blancos se encontraba dividida en dos regiones de África. La subespecie del norte habitaba el sur de Chad, República Central de África, suroeste de Sudan, noreste de Zaire y noroeste de Uganda. La subespecie sureña ocupaba el sureste de Angola, suroeste de Zambia, centro y sur de Mozambique, Zimbabwe, Botswana, este de Namibia, Swazilandia y norte y este de Sudáfrica (22) (Figura 4).

El descenso de la población de rinocerontes se ha agudizado especialmente desde el desarrollo de armas de largo alcance. En el siglo XIX los hombres ocuparon grandes áreas del sur de África por lo que un gran número de rinocerontes fueron muertos. Además, el comportamiento reproductivo del rinoceronte, especialmente la cópula que dura de 30 a 60 minutos, ha desatado terribles leyendas que han atribuido poderes afrodisíacos a su cuerno, razón por la cual han sido cazados intensamente (27). También existen otros productos como pezuñas, sangre y orina a las que se les atribuyen poderes medicinales, además de la utilización del propio cuerno como mango de dagas tradicionales de Yemen, provocando la caza ilegal (19).

Para 1893 los rinocerontes blancos del sur fueron considerados totalmente extintos, pero en los siguientes años se encontró una pequeña población en Umfolozi, al este de Sudáfrica (22), por lo que el gobierno de Sudáfrica comenzó a protegerlos (28). Gracias a programas masivos de reintroducción ahora, además de Sudáfrica, podemos encontrar rinocerontes blancos del sur en Botswana, Namibia, Swazilandia, Zambia, Zimbabwe e incluso en Kenia, territorio fuera de su hábitat natural original (14,22). De 1920 a mediados de 1960 la población había crecido de 200 a casi

2,000 individuos (19). En el 2001 la población de la subespecie del sur era de 11,640 animales en vida libre y 770 en cautiverio(14). Actualmente la población silvestre se incrementa anualmente en un 8 a 9%; no así en cautiverio donde se ha reproducido pobremente (13,31).

2.3 Fisiología de la reproducción de los rinocerontes.

Hasta el momento la información disponible acerca de la fisiología de la reproducción del rinoceronte blanco es limitada y los datos existentes son contradictorios (31). Las hembras tienen sus primeros ciclos sexuales alrededor de los 5 años de edad y sus primeras crías nacen entre los 6-8 años (14,19,22). Los machos alcanzan la capacidad de procrear a los 7 u 8 años (19); sin embargo, generalmente se reproducen a partir de los 10 o 12 años (19,22). Los intervalos entre partos pueden ser de 22 meses, pero se llegan a prolongar entre 2 y 4 años y paren generalmente una sola cría (19,28). En vida libre su vida reproductiva termina por lo general a los 36 años (22), pero puede prolongarse hasta los 45 años (14,19). Se sabe que las hembras silvestres del rinoceronte blanco del sur tienen ciclos estrales durante todo el año, sin embargo se presentan picos de nacimientos en la estación seca, misma que se da en los meses de abril a septiembre (23), a diferencia de la subespecie del norte la cual es estacional y solo entra en celo de febrero a mayo (27).

El ciclo estral se reporta con diferentes duraciones en cautiverio dependiendo de las técnicas utilizadas por el autor para su identificación, reportándose: 32 días (13,33), 35.4 y 65.9 días(24), 27 días (27), 70 días, de 28 a 70 días (31) y 31-35 días (26). También se describen diferentes

tiempos para la gestación, se cuenta con registros muy variados, en vida libre van de: 486-547 días (22), 486 días (14,19) y 490 días(28), mientras que en cautiverio los reportes son de: 509 días (24) y 456 días(33).

2.4 Metabolismo de esteroides reproductivos.

Los esteroides tienen un esqueleto común que proviene de la molécula de colesterol. Los pasos para convertir el colesterol en los diferentes esteroides se llevan a cabo en la mitocondrias y retículo endoplásmico liso de células de diferentes órganos como ovarios, testículos, corteza adrenal y placenta principalmente (16,18,34) (figura 5). Los estrógenos, progestágenos y andrógenos cumplen con funciones reproductivas mientras que los esteroides de la corteza adrenal tienen funciones adaptativas a medios adversos (10). Los principales estrógenos son la estrona y el 17β -estradiol y su función es el desarrollo y mantenimiento de la estructura funcional de los órganos sexuales de la hembra mediante la estimulación de la síntesis proteica y de la mitosis de órganos dependientes de estrógenos, así como la aparición de los caracteres sexuales secundarios (18,20). Por otro lado, la progesterona es el progestágeno de mayor actividad y su función es básicamente el mantenimiento de la gestación. En el caso de los andrógenos, la testosterona y la dihidrotestosterona son las principales formas activas, cuya función es inducir la diferenciación de los caracteres sexuales secundarios del macho, así como la manutención de la espermatogénesis por medio de la estimulación del epitelio germinal (18,20).

Una vez sintetizados los esteroides son secretados al espacio intersticial y llegan al torrente sanguíneo donde se transportan libres o unidos a proteínas, estas proteínas pueden ser específicas como la globulina fijadora de testosterona (TeBG) o no específicas como en el caso de la albúmina. Se considera que la fracción libre es la biológicamente importante ya que difunde con libertad hacia los tejidos, y la fracción unida se considera como un reservorio de hormonas esteroides (36).

Las células blanco cuentan con receptores específicos para los esteroides, mismos que se encuentran en el citoplasma o en el núcleo. El complejo formado por el esteroide y su receptor se traslada al núcleo e interacción con el elemento regulador, alterando el metabolismo de la célula (16,34,36).

Finalmente, los esteroides son inactivados principalmente en el hígado, donde sufren un proceso de oxidación, reducción y conjugación con sulfatos o glucoronatos, lo que aumenta su hidrosolubilidad. Los esteroides pueden ser reabsorbidos en el intestino y entrar al circuito entero hepático (16,34) o son finalmente excretados en orina y bilis. Una pequeña cantidad esteroides pueden ser excretados sin ser modificados(34,36), lo que resulta en la excreción de esteroides conjugados y no conjugados.

2.5 Estudios de esteroides reproductivos en rinocerontes.

Heereden y colaboradores en 1985 realizaron el primer estudio sobre la endocrinología reproductiva de los rinocerontes blancos en vida libre, donde describieron los niveles de progesterona y 17β -estradiol en suero (11).

Posteriormente se estudió el metabolismo de estos esteroides, principalmente su forma y ruta de eliminación. Hindle *et al.*, en 1990, publicaron los primeros resultados acerca de la excreción de 17β -estradiol y progesterona radioactivamente marcadas en una hembra en cautiverio de esta especie. Ellos establecieron que sólo el 61% de la hormona inoculada era recuperada, el 25% excretada por orina y el 36% por heces. Otro resultado importante de este estudio fue que el 92.4% de los esteroides excretados en heces fueron esteroides no conjugados (12).

A partir de estos trabajos se llevaron a cabo otros estudios en rinocerontes utilizando diferentes técnicas para determinar la concentración de esteroides como Enzimoimmunoanálisis (EIA) (2,7,8,29,30,31) y Radioimmunoanálisis (RIA) (2,24,26) para medición de esteroides reproductivos en orina (13,15), saliva (7) y heces (2,8,24,26,29,30,31). En estos casos se obtuvieron muestras en forma no invasiva que reflejaban las variaciones de los esteroides sanguíneos y permitieron conocer el ciclo estral (13,24,26,29,31) y la duración de la gestación (2,7,8). Estos trabajos han permitido identificar y solucionar problemas reproductivos que se puedan ver reflejados en el comportamiento de esteroides reproductivos.

Berkeley *et al.* en 1997 publicaron un estudio en el cual determinaron las concentraciones de estrógenos y progesterona en suero y heces de rinocerontes negro en cautiverio durante la ovulación, gestación y el parto, con el fin de correlacionar los perfiles hormonales entre sí. En él encontraron que las mediciones de 17β estradiol y

progesterona mostraban paralelismo, es decir mostraban una correlación positiva, la correlación entre estradiol en suero era reflejada en heces 2 y 3 días después, mientras que las variaciones de los niveles de progesterona en suero se reflejaban 4 días después en heces (2).

Radcliffe *et al.* en 1997 publicaron resultados de la medición de esteroides en heces y ultrasonografía, en una hembra de rinoceronte blanco del sur mantenida en cautiverio. Por medio de la ultrasonografía se observó la anatomía del tracto reproductivo de la hembra. Se observaron 4 ciclos ováricos de los cuales dos fueron fecundados y dos no. Durante estos ciclos se observaron folículos, cicatrices ovulatorias y cuerpos lúteos. En los ciclos que fueron fecundados se vio además la formación de una vesícula embrionaria. Los eventos observados por medio de la ultrasonografía se compararon con los resultados obtenidos de la medición de esteroides en heces. Se pudo observar que el incremento en metabolitos de progesterona se reflejaba 7-9 días después de la ovulación elevación que se mantuvo por un periodo de 19 a 22 días en los periodos no fecundado. También que el día de la ovulación se registraron los niveles más bajos de progesterona. Por otro lado se confirmó la duración del estro de 24 hr. Así mismo, se detectaron cambios en el color de la mucosa vaginal, de un rosa pálido en el diestro a un rosa intenso en el estro (26).

En 1998 Schwarzenberger *et al.* con la técnica de EIA, realizaron una evaluación de la función reproductiva del rinoceronte blanco por medio de la medición de progesterona en heces. Ellos encontraron que en un grupo de 21 animales mantenidos en cautiverio, se presentaron dos tipos de ciclos,

los primeros muy regulares y que duraban 10 semanas (2 animales), los segundos irregulares durando de 4 a 10 semanas (6 animales) y además se encontraron animales sin un ciclo aparente, pero con actividad lútea (6 animales) y también animales sin una aparente actividad lútea (7 animales). Las concentraciones de progesterona variaron desde menos de 100 hasta más de 800 nanogramos por gramo de heces secas (ng/gr hs) y los valores fueron relacionados con el tipo de actividad lútea. Los animales con concentraciones mayores a los 800 ng/gr hs fueron los que tenían ciclos regulares de 10 semanas, los animales con concentraciones de 250 a 750 ng/gr hs presentaban ciclos irregulares de 4 a 10 semanas, los animales con concentraciones de 100 a 200 ng/gr hs presentaron actividad lútea pero no ciclos aparentes y finalmente los animales con menos de 100 ng/gr hs no parecían tener actividad lútea. Ellos consideraron los ciclos de 10 semanas como los ciclos normales para la especie, sin embargo también concluyeron que los ciclos irregulares son fértiles. Por otra parte, la aparente actividad lútea, pero sin ciclos aparentes, la atribuyeron a la presencia de estructuras quísticas (31).

Para 1999 Patton et al. publicaron un estudio similar en rinocerontes blancos del sur, midiendo la concentración de progesterona en heces con la técnica de RIA, pero sus resultados fueron diferentes. De 13 hembras en cautiverio se detectaron en 5 hembras dos tipos de ciclos con duración de 35.4 ± 2.2 días (5 animales) y de 65.9 ± 2.4 días (2 animales), ambos ciclos se presentaron en dos individuos. Los ciclos cortos fueron presentados por 5 hembras y de estas mismas hembras, 2 presentaron también los ciclos largos. Las concentraciones de progesterona durante la fase lútea para el

ciclo corto fue de 390 ± 14.4 ng/gr hs y para el ciclo largo de 391.7 ± 13.7 ng/gr hs, mientras que durante la fase interlútea los niveles del ciclo corto fueron de 103.9 ± 7.8 ng/gr hs y del ciclo largo de 107.1 ± 7.1 ng/gr hs. Estos autores consideraron los ciclos cortos como los normales para la especie, y atribuyeron la tan larga duración de los otros ciclos a factores como piómetra, metritis e incluso muerte embrionaria temprana (24).

Justificación

Para el desarrollo de programas reproductivos en cautiverio en el rinoceronte blanco, es necesario conocer la fisiología de la reproducción de la especie. Con las técnicas para determinación hormonal de manera no invasiva, que evitan estrés durante la obtención de las muestras, se ha generado información valiosa acerca de la fisiología reproductiva de las hembras de rinoceronte blanco. El presente trabajo adaptó la técnica de Radioinmunoanálisis desarrollada por Brown et al. y Wasser et al. (4,35) en muestras de heces de rinoceronte blanco del sur, para utilizarse como herramienta diagnóstica para detectar el estado reproductivo de 2 hembras mantenidas en una colección zoológica en nuestro país. En la literatura publicada, la determinación hormonal ha estado dirigida únicamente a la endocrinología de las hembras dejando de lado a los machos. Por tal motivo en el presente trabajo se adaptó asimismo la técnica de RIA para la evaluación de andrógenos y generar información acerca de la endocrinología básica del rinoceronte macho.

III HIPOTESIS

- 1) Las variaciones de esteroides reproductivos en hembras y machos de rinocerontes blancos pueden ser evaluadas por medio de la medición por RIA de los metabolitos excretados en heces.
- 2) Los valores de testosterona en suero de rinoceronte macho, se correlacionan con los obtenidos en heces para esa hormona.

IV OBJETIVOS

- Utilizar la técnica de Radioinmunoanálisis para evaluar esteroides reproductivos (progesterona, 17- β estradiol y testosterona) en muestras de heces de rinoceronte blanco del sur, mantenidos en una colección zoológica.
- Medir por RIA las variaciones de metabolitos fecales de 17- β estradiol, progesterona y testosterona, a lo largo de 6 meses, en 3 machos y 2 hembras de la especie rinoceronte blanco del sur, mantenidos en cautiverio.
- Observar el comportamiento de los niveles de testosterona en suero y de los niveles en heces, en un rinoceronte macho.

V MATERIAL Y METODOS

5.1 Animales

El grupo de rinocerontes de este proyecto (3 machos y 2 hembras), pertenecen a la especie de rinoceronte blanco, subespecie sureña, que forman parte de una colección zoológica. El Zoológico se encuentra en Valsequillo, Puebla, en las siguientes coordenadas, latitud N19°00' longitud O 98°00' (figura 6). El promedio de precipitación pluvial anual en la región es de 1010.03 milímetros, las lluvias comienzan en los meses de mayo y junio y se extienden hasta diciembre. La temperatura promedio es de 16.5° C. Los rinocerontes se encuentran en un encierro con una superficie de 28,165 m², el cual esta separado en dos por una zanja a partir de 1984. En este encierro los animales permanecen las 24 horas del día y durante todo el año. Los animales están divididos en dos grupos, el primero formado por el macho 3 y la hembra 2 y el segundo por los machos 1 y 2 y la hembra 1. Los animales son alimentados diariamente y el exhibidor esta abierto al público durante el día. La dieta de estos animales esta compuesta por alfalfa achicalada *ad libitum*, y alimento concentrado para equinos y bovinos, 3.5 kg. de cada uno. Además en los meses de marzo a agosto la dieta se suplementa con rastrojo de maíz o rastrojo de avena.

El macho 1 "Cueros", nació en el zoológico de San Diego y un año después fue adquirido por el zoológico Africam Safari. El macho 2 "Guicho", nació en el zoológico Africam Safari y sus padres son la hembra 2 y el macho 3; de este macho se han registrado intentos de montas hacia la hembra 1. El macho 3 "Richard" y este es el único nacido en libertad en Sudáfrica

y padre de las 4 crías que nacieron en esta colección zoológica, la última hace 19 años. La edad de los machos en el momento del estudio fue de 25, 18 y 26 años respectivamente.

La hembra 1 "China Poblana", nació en libertad en Umfolozi, Sudáfrica. La hembra 2 "Martina", nacida en Sudáfrica, es la madre de las 4 crías nacidas en el zoológico y su último parto fue en el año de 1984. La hembra 2 y el macho 3 son la pareja que anteriormente había conseguido tener crías. Después de haber tenido 4 crías estos animales llevan varios años sin tener crías, pese a que se han registrado intentos de monta por parte de los machos por lo que se espera conocer su estado reproductivo actual a través de la medición de hormonas sexuales. La edad de las hembras en el momento del estudio fue de 39 y 29 años respectivamente.

5.2 Medición de esteroides reproductivos a partir de muestras de heces

a) Muestras de heces

Debido a lo difícil que resultó identificar las muestras por medio de la observación del lugar donde defecan los animales, el muestreo no pudo ser completado como fue programado originalmente. Sin embargo, se tomaron la mayor cantidad de muestras posibles.

Además, gracias al condicionamiento del macho 1 fue posible coleccionar muestras de heces y paralelamente muestras de suero durante 8 días consecutivos. Fue importante que las

muestras fueran colectadas a través de condicionamiento, ya que esto permitió manejar al animal sin utilizar contención física o química y sin causar estrés en el animal.

Las muestras de heces de los individuos que se encuentran dentro del mismo encierro fueron diferenciadas por medio de observación de los animales en el momento de la defecación. Después se colectaron, procurando que el muestreo fuera siempre a la misma hora. Las heces fueron almacenadas en tubos de plástico, previa homogeneización de la muestra, marcadas individualmente con fecha e individuo y mantenidas en congelación a -4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

b) Extracción

Las muestras de heces fueron extraídas de acuerdo al protocolo de Brown *et al.* (1994) (4), modificado en el laboratorio por Brousset (2002) (3), para recuperar la mayor parte de los esteroides sexuales contenidos en la muestra.

El primer paso de extracción fue el secado, este se llevó a cabo a través de un Evaporador Rotatorio (Speedvac), el cual a través de rotación y vacío, seca las muestras. La muestra pasó de 5 a 8 horas hasta eliminar la humedad que contenía. A la muestra seca se le retiraron fragmentos de pastos y semillas y se pesa dentro de un tubo de vidrio (aproximadamente 0.5 g). Una vez pesada la muestra se colocaron 5 ml de etanol al 80% y se hirvieron en baño maría a 93°C por 20 minutos, evitando que el etanol se evaporara por completo (agregando etanol hasta recuperar el volumen evaporado). Al termino, las muestras fueron centrifugadas a

1600 x g por 20 minutos. El sobrenadante se decantó en otro juego de tubos para ser secado en baño maría a 36° C con aire a presión, proceso que duro de 2 a 3 horas. Cada muestra se reconstituyo con 1 ml de etanol absoluto, se mezclaron por 1 minuto con un vortex y se dejaron reposar por 30 minutos. Finalmente, se centrifugaron a 1600 x g por 20 minutos y el sobrenadante fue decantado en tubos para la conservación del extracto, agregándose buffer RIA pH 7.0 (Buffer a base de fostato dibasico de sodio, fosfato monobásico de sodio, azida de sodio, cloruro de sodio y gelatina) diluido al 75%, para finalizar con una dilución de 2:1. El extracto se conservó en refrigeración a -4 °C.

La muestras de suero también fueron sometidas a un proceso de extracción, siguiendo el protocolo utilizado en el laboratorio del CINVESTAV. A un tubo de ensayo se agregó 1ml de suero y 5 ml de éter anhidro, se agitó por 1 minuto en vortex y se dejó reposar de 10 a 15 minutos para permitir que se separaran las fases acuosas y etérea. El tubo se congeló en una solución de hielo seco y acetona, una vez congelada la fase acuosa se recuperó la fase etérea en un juego nuevo de tubos y la fase recuperada se evaporó en baño maría a 37° C. Finalmente, los esteroides así extraídos se resuspendieron en 1 ml de etanol absoluto, el cual fue diluido en buffer RIA.

c) Radioinmunoanálisis

El RIA fue llevado a cabo utilizando ensayos comerciales de fase líquida (I^{125}) de los laboratorios ICN Biomedicals Inc®. (Figura 7) para 17- β estradiol, progesterona y testosterona. La sensibilidad de 17 β -estradiol se detectó un

mínimo de 10 pg/ml, seguida de testosterona cuya sensibilidad fue de 0.1 ng/ml y finalmente progesterona cuya sensibilidad fue de 0.2 ng/ml. En cuanto a su especificidad las principales reacciones cruzadas para el anticuerpo contra 17- β estradiol cruza al 100% contra dicha hormona, 20% contra estrona y 1.51% contra estriol; por otra parte el anticuerpo contra progesterona cruza al 100% contra esta hormona y 5.41% contra 20 α -Dihydroprogesterona. Finalmente el anticuerpo contra testosterona cruza al 100% contra testosterona y 3.4% contra 5 α -Dihydrotestosterona. Para el ensayo de 17- β estradiol los coeficientes de variación intranálisis fueron de 10.6, 4.7 y 6.4%, mientras que los coeficientes de variación interanálisis fueron de 11.9, 9.1 y 5.9%, en ambos casos a concentración baja, media y alta respectivamente. Para el ensayo de testosterona los coeficientes de variación intranálisis fueron de 6, 4.6 y 9.1% a concentración baja, media y alta, mientras que los coeficientes de variación interanálisis fueron de 2.7 y 7.5% a concentración baja y alta respectivamente. Por ultimo para el ensayo de progesterona los coeficientes de variación intranálisis fueron de 11.9, 3.6 y 2.3%, mientras que los coeficientes de variación interanálisis fueron de 12, 6.7 y 4.9%, en ambos casos a concentración baja, media y alta respectivamente.

El protocolo que se utilizó fue el descrito por el propio fabricante.

En cada uno de los RIA's se corrieron paralelamente muestras control para verificar la calidad de las pruebas, usándose los estándares de concentración media del fabricante como controles intraensayo y muestras de sueros con alta

cantidad de hormona como controles interesayo. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Los porcentajes de unión se llevaron al programa Rialogit®, para obtener la concentración de ng o pg/ml de cada una de las muestras problema (9).

Con los valores obtenidos a partir de los extractos de las muestras se realizó un ajuste que consistió en multiplicar el valor por el factor de dilución, y después ajustar por el peso de heces seca que se utilizó para hacer cada extracto. Esto permitió tener un resultado expresado en nanogramos o picogramos por gramo de heces seca (ng o pg/gr hs).

Las muestras de suero, y las muestras de heces correspondientes al mismo tiempo de muestreo, fueron medidas a través de RIA de H³ montados en el laboratorio siguiendo el protocolo habitual (25). Se utilizaron anticuerpos, hormona radioactiva y estándares de los laboratorios ICN Biomedicals Inc®. La sensibilidad fue de 3.125 pg. La especificidad fue de 100% contra testosterona y 18.75% contra 5 α -Dihydrotestosterona.

Las cantidades de radioactividad obtenidas se procesaron a través del programa Inplot®, con el cual se calcularon las concentraciones de las muestras problemas. En caso de ser necesario se realizó un ajuste de acuerdo a la dilución de cada muestra. Los datos finalmente se expresaron en pg/gr heces seca o pg/ml de suero.

d) Análisis de resultados

Para cada uno de los animales se obtuvo la concentración de cada hormona por medio del promedio del duplicado de cada muestra y esto se realizó en todas las muestras colectadas. Con estos resultados se graficaron las variaciones hormonales a lo largo del tiempo de muestreo y también se calculó el promedio y valores mínimos y máximos para cada individuo. Los datos se compararon con los de los demás animales del grupo y lo reportado previamente en la literatura para la especie.

VI RESULTADOS

6.1 Protocolo de extracción

Con el protocolo de extracción de Brown *et al.* (1994) (4) modificado por Brousset (2002) (3) obtuvimos porcentajes de recuperación de hormona marcada radiocativamente de 71.05% para progesterona, 58.57% para 17- β estradiol y 58.09% para testosterona. Los porcentajes son el promedio obtenido a partir de 5 repeticiones para cada hormona.

6.2 Hembra 1

La hembra 1 (China Poblana) tuvo un promedio de 765.3 pg/gr hs de 17- β estradiol y sus rango fue de 57.2 a 2107.0 pg/gr hs (n=17). En esta hembra se pueden observar elevaciones en los niveles de 17- β estradiol.

Para la hembra 1 el promedio de progesterona fue de 4.7 ng/gr hs y su rango fue de 0.5 a 31.0 ng/gr hs (n=17). Al graficar los valores, se pudo observar que durante algunos días de muestreo los niveles de progesterona fueron mucho mas altos, uno de ellos, el día 28 de julio, con un valor de 31.03 ng/gr hs, otro el 17 de agosto, con un valor de 21.07 ng/gr hs y el día 5 de julio, con un valor de 11.83 ng/gr hs. El resto de los días de muestreo los niveles de progesterona fueron menores a 3 ng/gr hs. En la figura 8 se presentan las gráficas obtenidas para esta hembra.

En estas gráficas se puede observar un incremento de 17- β estradiol en los días 6 y 14 de julio que va seguido de un

pico de progesterona el día 28 de julio. Se encontró otro pico de 17- β estradiol (días 20 y 21 de enero del año siguiente). No se obtuvieron muestras mas allá de este tiempo, por lo que no se pudo saber si también habría un aumento posterior de progesterona.

6.3 Hembra 2

La hembra 2 (Martina) tuvo un promedio de 1105.5 pg/gr hs para 17- β estradiol y su rango fue de 59.2 a 2154.2 pg/gr hs (n=23). En la hembra 2 se distinguieron elevaciones de los niveles de 17- β estradiol en ambos periodos de muestreo.

La hembra 2 tuvo un promedio de 1.7 ng/gr hs de progesterona y su rango de 0.5 a 9.1 ng/gr hs (n=23). En el caso de la hembra 2 también se detectaron elevaciones en los niveles de progesterona, dichas elevaciones se presentaron en los días 7 de febrero con un valor de 9.15 ng/gr hs y en el día 26 de julio con un valor de 5 ng/g hs. El resto de los valores se ubicaron por debajo de los 3 ng/gr hs. En la figura 9 se presentan las gráficas obtenidas para esta hembra.

En el caso de la hembra 2 en los 2 periodos observados se vio que valores altos de 17- β estradiol, en los días 17 y 20 de julio y 17 y 19 de enero, eran seguidos por picos de progesterona, en los días 26 de julio y 7 de febrero.

6.4 Machos

6.4.1 Niveles de testosterona en heces.

Los valores de testosterona obtenidos en los machos fueron los siguientes:

El macho 1 (Cueros) tuvo un promedio en testosterona de 5.3 ng/gr hs con un rango de 0.07 a 11.7 ng/gr hs (n=16). El macho 2 (Guicho) tuvo un promedio en testosterona de 7.9 ng/gr hs con un rango de 1.3 a 26.1 ng/gr hs (n=16). El macho 3 (Richard) tuvo un promedio en testosterona de 3.8 ng/gr hs con un rango de 0.3 a 12.3 ng/gr hs (n=14). En las figuras 10,11,12 se presentan las gráficas obtenidas para cada macho. Los rangos, así como los promedios, son diferentes entre los 3 individuos. De la comparación de datos entre los 3 machos, se detecta que el macho 2 alcanzó los valores mas altos (figura 13).

6.4.2 Niveles de testosterona en suero.

Los niveles de testosterona en las muestras de suero del macho 1 fueron de 167.3 a 597.8 pg/ml de suero con un promedio de 348.2 pg/ml de suero (n=6), mientras que los niveles de testosterona obtenidos de las muestras de heces correspondientes a esas mismas fechas variaron de 5.5 a 10.2 ng/gr hs (n=8). El comportamiento de testosterona en suero se refleja en las concentraciones de este esteroide en las muestras de heces, con un desfase de 2 días con respecto a los niveles en suero (Figura 14).

VII DISCUSION

El presente estudio confirma que es factible la utilización de ensayos comerciales de radioinmunoanálisis, con las especificaciones antes mencionadas, para la determinación de esteroides reproductivos en heces de rinoceronte blanco.

En el estudio realizado por Hindle *et al.* en 1990.observaron que un 36 % de esteroides exógenos, progesterona y 17- β estradiol, administrados por vía endovenosa eran excretados a través de heces en rinocerontes blancos. Con este estudio se determinaron las vías de excreción para dichas hormonas en la especie(12). Sin embargo, la mayoría de los estudios posteriores en rinoceronte blanco, se abocaron a la determinación de progestágenos endógenos en heces, dejando de lado la determinación de estrógenos en heces. Por lo tanto, no se encuentran estudios referentes al patrón de excreción de estrógenos endógenos en heces de rinocerontes blancos y tampoco durante el ciclo reproductivo.

Por otra parte, en rinoceronte blanco, la correspondencia fisiológica de la determinación de progestágenos en heces ha sido corroborada con otros métodos para la determinación de la duración del ciclo ovárico, como observaciones de monta y ultrasonido, habiéndose obtenido resultados similares (24,26,31). Además, en estudios realizados en hembras de rinoceronte negro se ha demostrado que los metabolitos de progesterona y 17- β estradiol fecales, reflejan los niveles de progesterona y 17- β estradiol sanguíneos durante el ciclo

ovárico, por lo que la determinación de los metabolitos fecales permite determinar actividad hormonal en ciclos ováricos y gestación (2).

El protocolo de extracción de Brown *et al.* (1994) (4) modificado por Brousset (2002) (3) utilizado para la recuperación de esteroides a partir de heces es funcional para rinocerontes blancos debido a que los metabolitos de esteroides excretados en heces por estos animales son casi en su totalidad (92.4%) formas no conjugadas (12), que son solubles en alcoholes a temperaturas altas (12,18).

17- β estradiol

En la literatura no hay reportes de niveles de 17- β estradiol en heces de rinoceronte blanco, por lo que no es posible comparar los resultados de este trabajo con valores en la misma especie. Sin embargo, Hindle *et al.* (1992), realizaron mediciones de estrógenos en orina de rinocerontes blancos y encontraron que los cambios en la excreción de estrógenos reflejan el desarrollo folicular y que los valores máximos de dicha hormona coinciden con el día de la monta o el día anterior (13). Así mismo, en 1997 Berkeley y colaboradores demostraron que en rinocerontes negros el 17- β estradiol circulante y sus variaciones se reflejan en heces (2), por lo que podemos suponer que dicha situación se presenta también en rinocerontes blancos. Las elevaciones de 17- β estradiol detectadas en el presente trabajo sugieren fuertemente que se lleva a cabo desarrollo folicular cíclico

Progesterona

Los niveles de progesterona en heces en rinocerontes blancos encontrados por Schwarzenberger et al. (1998), fueron desde menos de 100 ng/gr hs hasta mas de 800 ng/gr hs, por otro lado Patton et al. (1999) reportaron niveles que iban desde los 100 ng/gr hs a mas de 250 ng/gr hs. Los niveles de metabolitos de progesterona encontrados en el presente estudio 0.5 a 31 ng/gr hs fueron mas bajos que los hallados en dichos reportes previos en la misma especie. Esto puede deberse básicamente a la especificidad del anticuerpo utilizado en el presente estudio, ya que es altamente específico para progesterona y tiene bajas reacciones cruzadas con otros metabolitos. Schwarzenberger y colaboradores determinaron que los principales metabolitos excretados por los rinocerontes blancos, además de progesterona, eran 5α -pregnane-3,20-dione, 5α -pregnane-3 α -ol-20-one y 5α -preganane-3 β -ol-20-one (31). Estos autores utilizaron un anticuerpo con importantes reacciones cruzadas con los metabolitos arriba mencionados. Esta podría ser la razón por la que obtuvieron valores mayores de progestágenos a los obtenidos en este estudio (24,31).

La fase lútea registrada en rinocerontes blancos por otros autores, tiene una duración muy variada que va de 19.5 a 34 días (Paton et al., 1999) y de 5 a >70 (Swchzenbeger et al., 1998) Durante este periodo los valores de progestágenos se mantienen elevados, con algunos descensos esporádicos, que no duran mas allá de 4 a 5 días y recuperan los valores elevados al cabo de este tiempo (24,31). Este hecho puede deberse a diferentes factores como pueden ser diferencias en

el tránsito intestinal que va de 2 a 4 días, lo que haría que la acumulación del esteroide varíe entre muestras. Sin embargo, si se observan periodos de más de 30 días se pueden apreciar picos de producción del esteroide. Durante el periodo de muestreo de este trabajo, se observó que ambas hembras presentaron elevaciones de progesterona que pueden ser compatibles con fases lúteas.

Además, el zoológico lleva un registro de aquellas conductas de los animales que salen de lo cotidiano, es decir, aquellas conductas que no realizan diariamente. Dentro de estos registros se encontraron algunas de carácter reproductivo. La época en la que se registraron es la misma solo que en diferente año: cópulas entre la hembra 2 y el macho 3 (25 de junio de 1998), olfateo y persecución de los machos 1 y 2 hacia la hembra 1 y a su vez los machos se agredieron mutuamente entre los días 20 a 27 de febrero del 2002. Durante los periodos de muestreo de este trabajo no se llevó a cabo el registro de conductas (sin embargo pudieron existir) por lo que no se pueden relacionar con los perfiles hormonales como se ha hecho en otros estudios(24,31). Sin embargo, estas conductas pueden indicar que la actividad reproductiva de las hembras no habían cesado, por lo que es posible que las elevaciones de $17\text{-}\beta$ estradiol seguidas de picos de progesterona, hallados en este estudio representen para ambos animales un desarrollo folicular seguido de la formación de un cuerpo lúteo. Estos datos indican, que aparentemente las hembras se encontraban aun ciclando. Otra posibilidad para explicar las elevaciones de progesterona en las hembras de este estudio proviene del trabajo publicado por Schwarzenberger et al. (1998), en donde proponen 4 diferentes categorías de hembras: una de ellas son hembras

que presentan picos de progesterona pero que no tienen ciclos regulares; esta actividad fue atribuida por estos autores a estructuras quísticas observadas en estudios realizado por Adams et al. (1991) por medio de ultrasonido (1,31). Sin embargo, el hecho de que en el presente estudio los picos de progesterona hayan sido precedidos de picos de estradiol, sugieren que efectivamente se encontraban ciclando.

Testosterona

No se encontraron reportes sobre los niveles de testosterona o sus metabolitos en el suero, heces o alguna otra muestra en los machos de ninguna de las 5 especies de rinocerontes.

Conocer los valores de testosterona en los machos es útil para reconocer a un macho sexualmente maduro, para detectar deficiencia en gonadotropina pituitaria y disfunción en la actividad de las células de Leydig (6), todo esto reflejado en problemas reproductivos. Estudios en otras especies de animales silvestres y domésticos han relacionado íntimamente los niveles de testosterona con la calidad del semen, comportamiento reproductivo, estacionalidad y jerarquía (6). De esta manera el conocer y evaluar los niveles de testosterona, puede ser un útil indicador en la evaluación del macho.

El presente trabajo demuestra que con el extracto de Brown et al (1994) (4). modificado por Brousset (2002) (3), así como el protocolo de extracción a partir de suero del laboratorio (25) y los anticuerpos con las especificaciones antes mencionadas, es posible determinar los niveles de

testosterona en machos, en muestras tanto de suero como de heces.

Los valores encontrados en suero, de 167.3 a 597.8 pg/ml, fueron mas bajos que los encontrados en heces, 5.5 a 10.2 ng/gr hs. Este hecho probablemente se deba a que los valores detectados en heces son el resultado de la acumulación de los esteroides excretados a lo largo del día o de un período determinado de tiempo, que se excretan a través de bilis y finalmente se encuentran en las heces (5,17). Esta situación es similar a la que ocurre con los progestágenos y los estrógenos de otras especies(2,21).

El comportamiento de testosterona en suero se vió reflejado en heces con dos días de desfase. Esto es equiparable con lo reportado para otros esteroides como 17- β estradiol y progesterona en rinocerontes africanos. En el caso de los valores en suero de 17- β estradiol y progesterona en hembras de rinoceronte negro (*Diceros bicornis*) se encontró que correlacionan altamente con los valores de metabolitos de 17- β estradiol y progesterona en heces en los días 2 y 3, y en el día 4, respectivamente posteriores a la toma de la muestra de suero(2). Para el rinoceronte blanco progesterona y 17- β estradiol administrados de manera exógena y marcados radioactivamente fueron recuperados en su mayor parte en los días 2 y 3 posteriores a la inoculación (12).

Los niveles de testosterona variaron en los rangos y promedio de cada uno de los machos. Diferencias individuales en los niveles de testosterona han sido reportados en diferentes especies y estas variaciones han sido atribuidas a

diferencias como: edad, factores sociales, comportamiento (6). En el caso de estos rinocerontes un factor importante parece ser la edad, de esta manera el macho 2, que es el mas joven, tuvo los valores mas altos de testosterona y el macho 3, que es el mas viejo, fue el que contó con el promedio mas bajo de testosterona en heces. En algunas especies los machos de mayor edad tienen valores de testosterona mas bajos (6).

No fue posible correlacionar los niveles de testosterona con la capacidad reproductiva de estos animales debido a que en la actualidad ninguno de estos individuos se reproduce de manera constante, puesto que la última cría del macho 3, único macho que ha tenido crías, nació hace casi 20 años. Para saber si los valores encontrados son los óptimos para la reproducción, es decir que mantengan una espermatogenesis saludable así como un comportamiento reproductivo propio de la especie, sería necesario hacer evaluaciones de los niveles de testosterona en machos que actualmente se reproduzcan, o realizar evaluación de semen en los mismos.

Estudios a futuro:

Finalmente, aún cuando la técnica empleada cumplió con su cometido, existen ciertas modificaciones que mejorarían su desempeño. En el caso de los niveles de metabolitos de esteroides reproductivos el anticuerpo es una de los principales puntos a considerar. Para la determinación de metabolitos de progesterona, en el caso específico de rinocerontes blancos, la utilización de un anticuerpo con altas reacciones cruzadas contra 4-pregnene-3,20-dione (progesterona), como el que utilizamos, pero que además tenga reacción cruzada con otros metabolitos como 5 α -pregnane-3,20-

dione, 5α -pregnane- 3α -ol-20-one y 5α -preganane- 3β -ol-20-one sería una mejor opción, debido a que de esta manera se evaluarán progestágenos en general. Estos son los metabolitos que excretan principalmente los rinocerontes blancos (31).

Algunas de las modificaciones que podrían hacerse al protocolo de extracción para su utilización en heces de rinoceronte, tiene que ver con la presentación de la muestra. Las muestras de rinocerontes contienen grandes cantidades de pasto, que en ocasiones pueden interferir con el procesamiento de la muestra, por lo que pulverizar y quitar este tipo de material ayudaría a su manejo y procesamiento en general. El secado de las muestras podría también modificarse, utilizando métodos más rápidos y sencillos como podría ser el secado en horno, ya sea previo a la extracción como se realizó en este trabajo o posterior a la extracción como lo marcan otros protocolos de literatura en los cuales se realiza la extracción con la muestra húmeda y posteriormente se seca para conocer el peso de la materia seca(32). Incluso en otras especies se ha realizado la evaluación de esteroides en muestras de heces húmedas, para evitar el paso del secado, sin embargo el realizarlo de esta manera aunque facilita el trabajo de la extracción dificulta la comparación entre animales ya que la humedad en las heces varía dependiendo el tipo de dieta que tengan.

Con la finalidad de ampliar los resultados y hacerlos concluyentes se deben realizar algunas modificaciones en cuanto a la logística de la colección de las muestras. Se debe aumentar el número de muestras colectadas por individuo, así como, la frecuencia de las tomas (3 a 4 por semana), y coleccionar las muestras por períodos superiores a los 12 meses.

Además, se debe de aumentar el número de individuos dentro del estudio, así como, coleccionar muestras de individuos de diferentes edades, etapas reproductivas, localización geográfica, situación social.

Por último, la determinación de esteroides reproductivos mediante muestras de heces es un excelente medio diagnóstico. Sin embargo, siempre es conveniente combinarlo con otros medios diagnósticos como citología vaginales, colección de semen y ultrasonidos, que nos permiten conocer de manera mas precisa la fisiología reproductiva. Por otra parte, dada la invasividad de estas técnicas, no son recomendables o factibles para la situación de muchos zoológicos, por lo que, el monitoreo de esteroides de manera no invasiva en combinación con observaciones del comportamiento, siguen siendo una mejor alternativa.

Conclusiones:

El comportamiento de los patrones hormonales de los rinocerontes de este estudio, así como, observaciones de conducta, sugieren que estos animales aún son reproductivamente aptos. Este estudio, sin embargo, no permite explicar porqué estos animales cesaron de tener crías. Patton et al. (1999) atribuyen estos problemas a la incompatibilidad de las parejas de rinocerontes, ya que en su mayoría, los rinocerontes que se encuentran en cautiverio solo cuentan, en el mejor de los casos, con una pareja (24). El comportamiento de los rinocerontes en vida libre revela que las hembras de la especie rondan por los territorios de

varios machos (23), por lo que se cree que las hembras seleccionan a su pareja.

En el zoológico Africam Safari hubo un punto crucial con respecto a la reproducción de los rinocerontes. La pareja formada por el macho 3 y la hembra 2, que había tenido crías, dejó de tenerlas en el momento en el que dividieron el grupo de los 5 rinocerontes en dos, aun cuando mantuvieron a la pareja aparentemente apta para la reproducción en un grupo y al resto de los animales en otro. Este suceso se contrapone a la suposición de que el problema es la incompatibilidad de los animales, ya que en este caso la pareja que se había venido reproduciendo dejó de hacerlo pese a que se mantuvieron juntos. Una posible explicación puede ser que para las hembras de rinoceronte blanco sea vital la estimulación brindada por los machos, ya sea por uno en específico o por varios, situación que puede ser factible en vida libre y en algunos zoológicos.

El presente estudio reporta por primera vez la concentración de testosterona en el suero y en las heces del rinoceronte. Por otra parte demuestra que la concentración en heces de este esteroide es un reflejo de los niveles sanguíneos. Así mismo, el presente estudio reporta por primera vez la concentración de $17\text{-}\beta$ estradiol en heces de rinoceronte blanco.

VIII LITERATURA CITADA

- 1 Adams GP, Plotka ED, Asa CS, Ginther OJ. Feasibility of characterizing reproductive events in large nondomestic species by transrectal ultrasonic imaging. *Zoo Biol* 1991; 10:247-259.
- 2 Berkeley EV, Kirkpatrick JF, Schaffer NE, Bryant WM. Serum and fecal steroid analysis of ovulation, pregnancy, and parturition in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*). *Zoo Biol* 1997;16:121-132.
- 3 Brousset DM. Efecto del enriquecimiento ambiental sobre el bienestar de especies de felinos mexicanos en peligro de extinción (ocelote, margay y jaguarundi) mantenidos en cautiverio. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias veterinarias. FMVZ. UNAM. 2003.
- 4 Brown JL, Wasser SK, Wildt DE, Graham LH. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids measured noninvasively in feces. *Biol Reprod* 1994;51:776-786.
- 5 Brown JL, Wildt DE. Assessing reproductive status in wild felids by non invasive faecal steroid monitoring. *Int Zoo Yb* 1997;35:173-191.
- 6 Cheryl SA. Reproductive physiology. In: Kleimann DG, Allen ME, Thompson KV, Lumpkin S, editors. *Wild mammals in captivity: Principles and techniques*. Chicago: The university of Chicago press, 1996:390-417.
- 7 Czekala NM, Callison L. Pregnancy Diagnosis in the black rhinoceros (*Diceros bicornis*) by salivary hormone analysis. *Zoo Biol* 1996;15:37-44.
- 8 Garnier JN, Green, DI, Pickard AR, Shaw HJ, Holt WV. Non-invasive diagnosis of pregnancy in wild black rhinoceros

- (*Diceros bicornis minor*) by faecal steroid analysis. *Reprod Fert* Den 1998;10:451-458.
- 9 Garza FJ, Diaz SV, Vazquez AS, Brandels A, Romero C. El radioinmunoanálisis y su control de calidad. 1era edición. México: Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares y Organismo Internacional de Energía Atómica, 1996: 17-26.
 - 10 Greco D, Stabenfeldt GH. Endocrinología. In: Cunningham JG, editor. *Fisiología veterinaria*. 2nd ed. México (DF): Interamericana Mc Graw-Hill, 1999:435-498.
 - 11 Heerden JV, Keffen RH, Dauth J, Dreyer MJ. Blood chemical parameters in free-living white rhinoceros *Ceratotherium simum*. *J of the South Afric Vet Assoc* 1985;56 (Suppl 4):187-189.
 - 12 Hindle JE, Hodges JK. Metabolism of oestradiol-17 β and progesterone in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). *J Reprod Fert* 1990;90:571-580.
 - 13 Hindle JE, Mostl E, Hodges JK. Measurement of urinary oestrogens and 20 α -dihydroprogesterone during ovarioan cycles of black (*Diceros bicornis*) and white (*Ceratotherium simum*) rhinoceroses. *J Reprod Fert* 1992;94:237-249.
 - 14 International Rhino Foundation. White Rhinocero. [seriado en línea] 2002 [citado 2003 sep 5]:[9 pantallas]. Disponible en: URL:<http://www.rhinos-irf.org>
 - 15 Kassam AAH, BA, Lasley BJ. Estrogen excretory patterns in the indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*), determined by simplified urinary analysis. *A J Vet Res* 1981;42:251-255.

- 16 Knobil E, Neil J D. The physiology of reproduction. Second edition. Edit. Raven press, 1994:1:571-628, 1363-1411.
- 17 Kvetnansky K, Pacak K, Fukuhara E, Viskupic B, Hiremagalur B, Nankova B, Goldstein DS, Sabban EL, Kopin IJ: Sympathoadrenal system. In: stress; basic mechanism and clinical implication; Annals of the New York Academy of science, Vol 771, 1995:131.
- 18 Lehninger AL. Bioquímica, las bases moleculares de la función celular. 2nd ed. Barcelona: Ediciones Omega, S.A., 1985:833-834.
- 19 Macdonald D. Enciclopedia del mundo animal. Oxford: Orbis, S.A., Vol 4, 1991:490-497.
- 20 Mc Donald LE. Endocrinología veterinaria y reproducción. 4ta ed. México (DF): Interamericana Mc Graw-Hill, 1991:331-339.
- 21 Morrow CJ, Monfort SL. Ovarian activity in the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*) determined by faecal steroid analysis. Anim Reprod Sci 1998;53:191-207.
- 22 Nowak RM. Walker's mammals of the world. 6th ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1999:1028-1040.
- 23 Owen-Smith RN. Megaherbivores. The influence of very large body size on ecology. Great Britain: Cambridge university press. 1988:181-199.
- 24 Patton ML, Swaisgood RR, Czekala NM, White AM, Fotter GA, Montagne JP, Rieches RG, Lance VA. Reproductive cycle length and pregnancy in the southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*) as determined by fecal pregnane analysis and observations of mating behavior. Zoo Biol 1999;18:111-127.

- 25 Perez MM, Mendoza ME, Romano MC. Exfoliative vaginal cytology and plasma levels of estrone and estradiol-17 β in young old adult goats. Small ruminant research 1999;33:153-158.
- 26 Radcliffe RW, Czekala NM, Osofsky SA. Combined serial ultrasonography and fecal progestin analysis for reproductive evaluation of the female white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*): Preliminary results. Zoo Biol 1997;16:445-456.
- 27 Sandoval L M. El rinoceronte blanco (*Ceratotherium simum*). Tesis para obtener el titulo de Medico Veterinario Zootecnista. FMVZ. UNAM.1991.
- 28 Schenkel R, Grzimek B. Rhinoceroses. In: Grzimek B, editor. Grzimek's Encyclopedia of mammals. Volumen 4. New Jersey: Mc Graw-Hill, 1988: 610-642.
- 29 Schwarzenberger F, Francke R, Goltenboth R. Concentrations of faecal immunoreactive progestagen metabolites during the oestrous cycle and pregnancy in the black rhinoceros (*Diceros bicornis michaeli*). J Reprod Fert 1993;98:285-291.
- 30 Schwarzenberger F, Tomasova K, Holeckova D, Mtern B, Mostl E. Measurement of fecal steroides in the Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*) using group-specific enzyme immunoassays for 20-oxo-pregnanes. Zoo Biol 1996;15:159-171.
- 31 Schwarzenberger F, Walzer C, Tomasova K, Vahala J, Meister J, Goodrowe KL, Zima J, StraußG, Lynch M. Faecal progesterone metabolite analysis for non-invasive monitoring of reproductive function in the white rhinoceros (*Ceratotherium simum*). Anim Reprod Sci 1998;53:173-190.

- 32 Spanner A, Stone GM, Schultz D. Excretion profiles of some reproductive steroids in the faeces of captive Nepalese red panda (*Ailurus fulgens fulgens*). *Reprod Fertil Dev* 1997;9:565-570.
- 33 Strike T, Pickard A. Non-invasive hormone analysis for reproductive monitoring in female southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). *Proceeding of the Am Assoc Of Zoo Vet. USA.* 2002:216-218.
- 34 Tresguerres SAF, Benitez LEA, Cachofeiro MV, Cardinali D, Gil LP, Lahera JV, Martinez VJA, Mora TF, Rodríguez RR, Romano PM, Tamargo MJ, Zarco GP. *Fisiología humana. Segunda edición. Edit. McGraw-hill-interamericana, 1999:1020-1032.*
- 35 Wasser SK, Hunt KE, Brown JL, Cooper K, Crockett CM, Bechert U, Millspaugh J, Larson S, Monfort SL. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *Gen Com Endo* 2000;120:260-275.
- 36 Yen S S C, Jaffe R B. *Endocrinología de la reproducción. Tercera edición. Edit. Medica panamericana, 1993:174-203.*

IX FIGURAS

a)

b)



c)



d)

e)



Figura 1. Especies de rinocerontes existentes en la actualidad, rinoceronte indio (a), rinoceronte de Java (b), rinoceronte de Sumatra (c), rinoceronte negro (d) y rinoceronte blanco (e). Fotos tomadas de International Rhino Foudation (13).





Figura 2. Rostro de rinoceronte blanco, se denota su labio superior largo y recto.
Foto tomada en el zoológico Africam Safari.



Figura 3. Rinoceronte blanco del sur. Foto tomada en el zoológico Africam Safari.



Figura 4. Distribución actual  y distribución histórica  del rinoceronte blanco. Tomado de International Rhino Foudation (13).

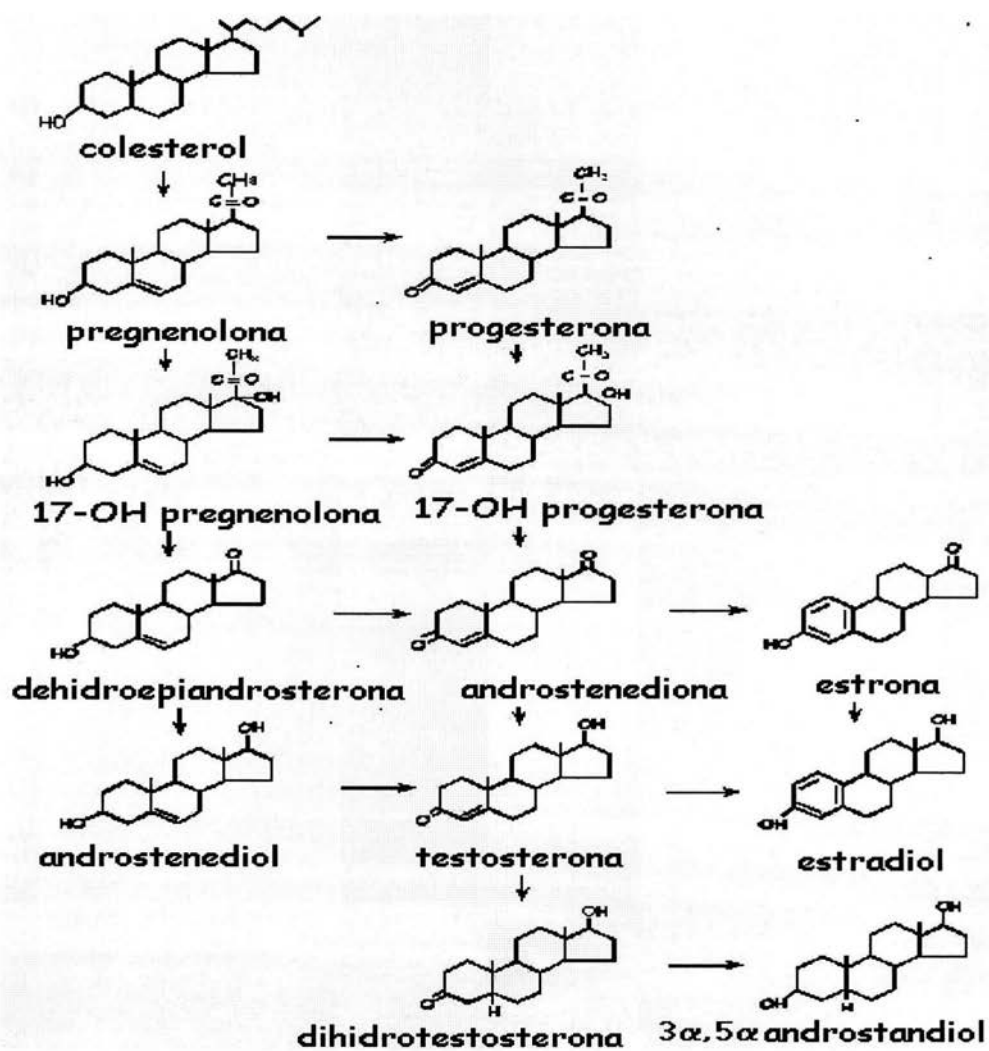


Figura 5. Síntesis de los principales esteroides reproductivos a partir de colesterol.
Modificado de Tresguerres, fisiología humana (29).



Figura 6. Ubicación del zoológico Africam Safari.

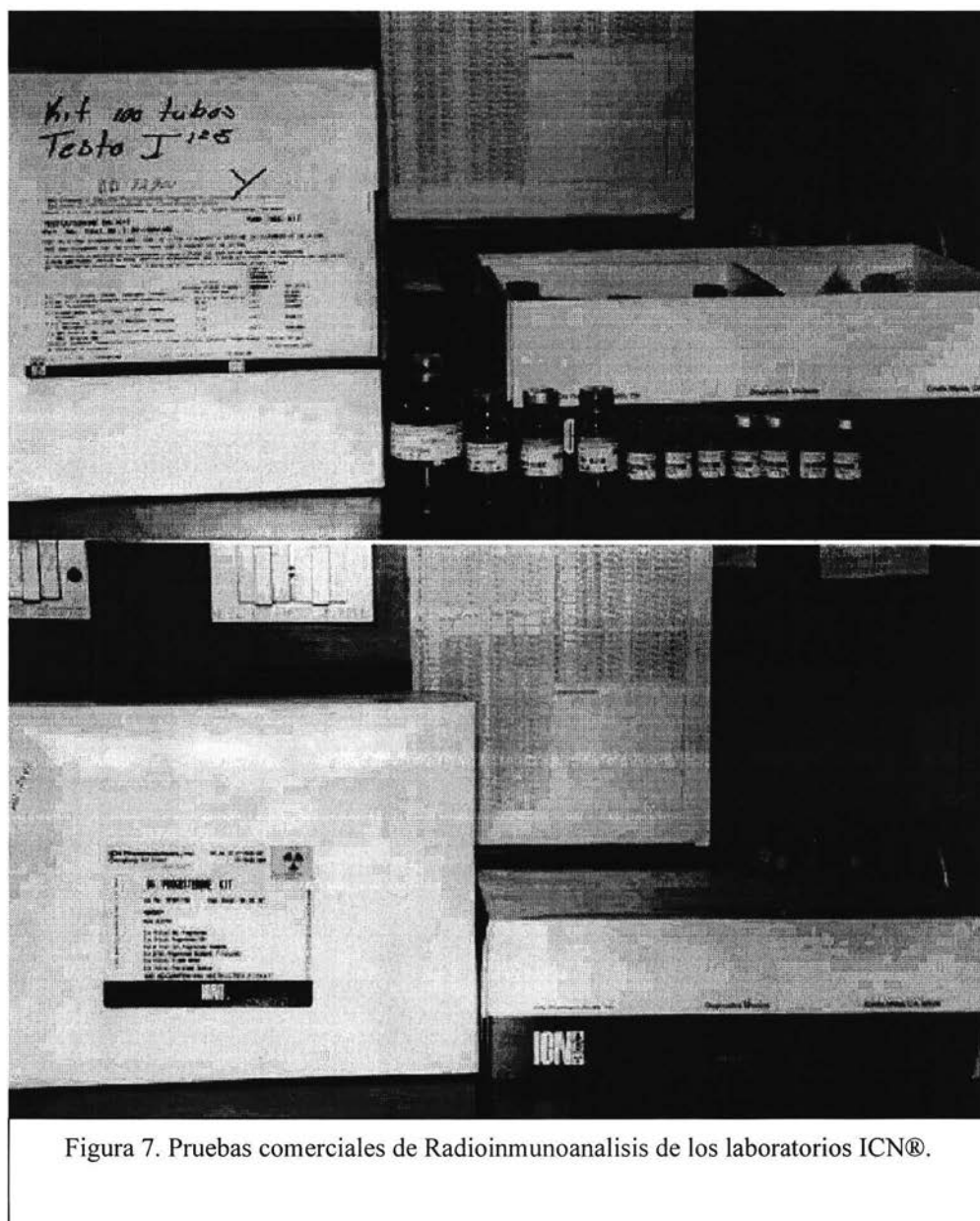


Figura 7. Pruebas comerciales de Radioinmunoanálisis de los laboratorios ICN®.

Hembra 1 (China Poblana)

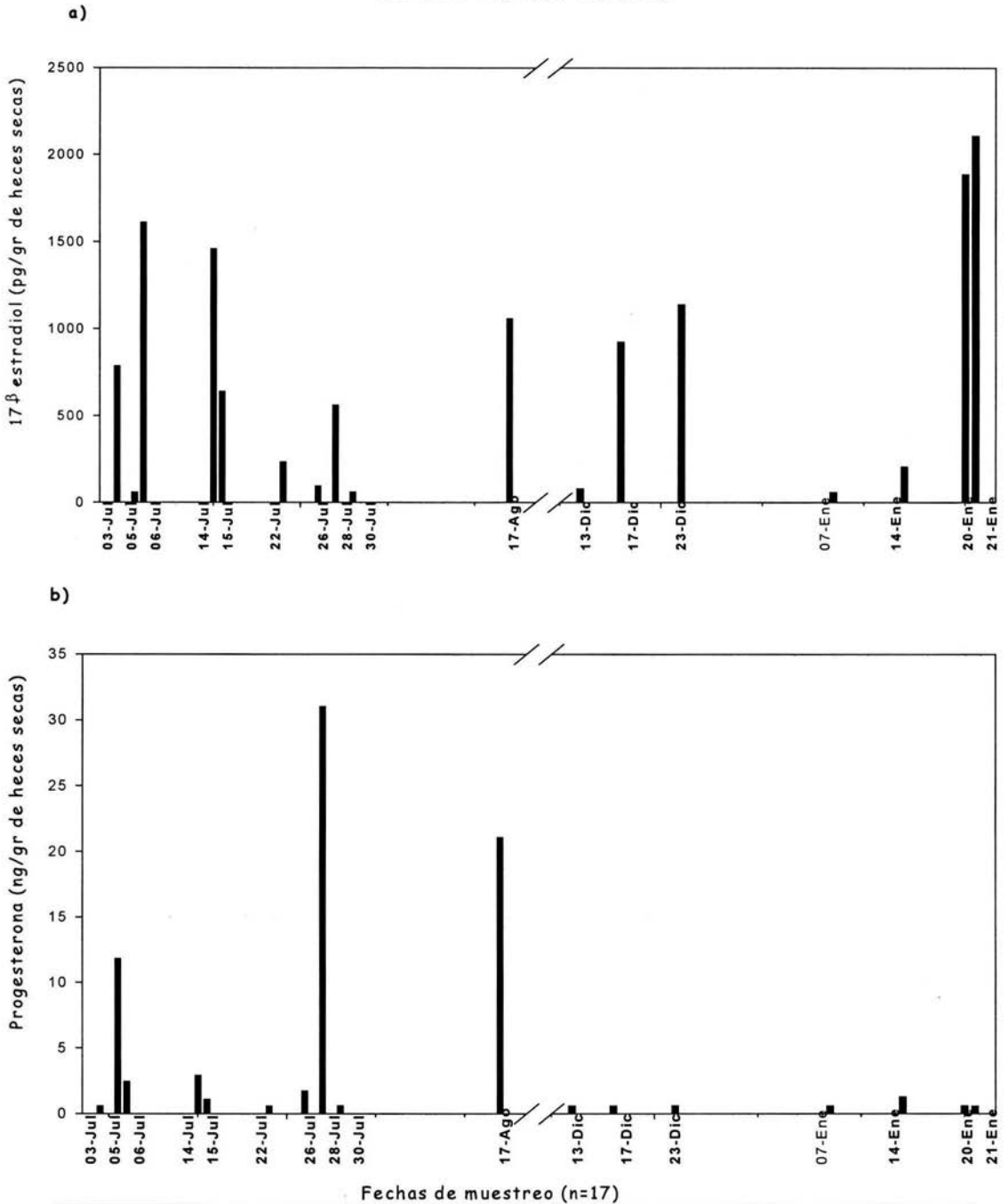


Figura 8: Concentraciones de 17-β estradiol (a) y progesterona (b) en la hembra 1 de rinoceronte blanco del sur obtenidas a través de RIA (n=17), a partir de muestras de heces. Valores que representan el promedio obtenido de los duplicados de cada muestra.

Hembra 2 (Martina)

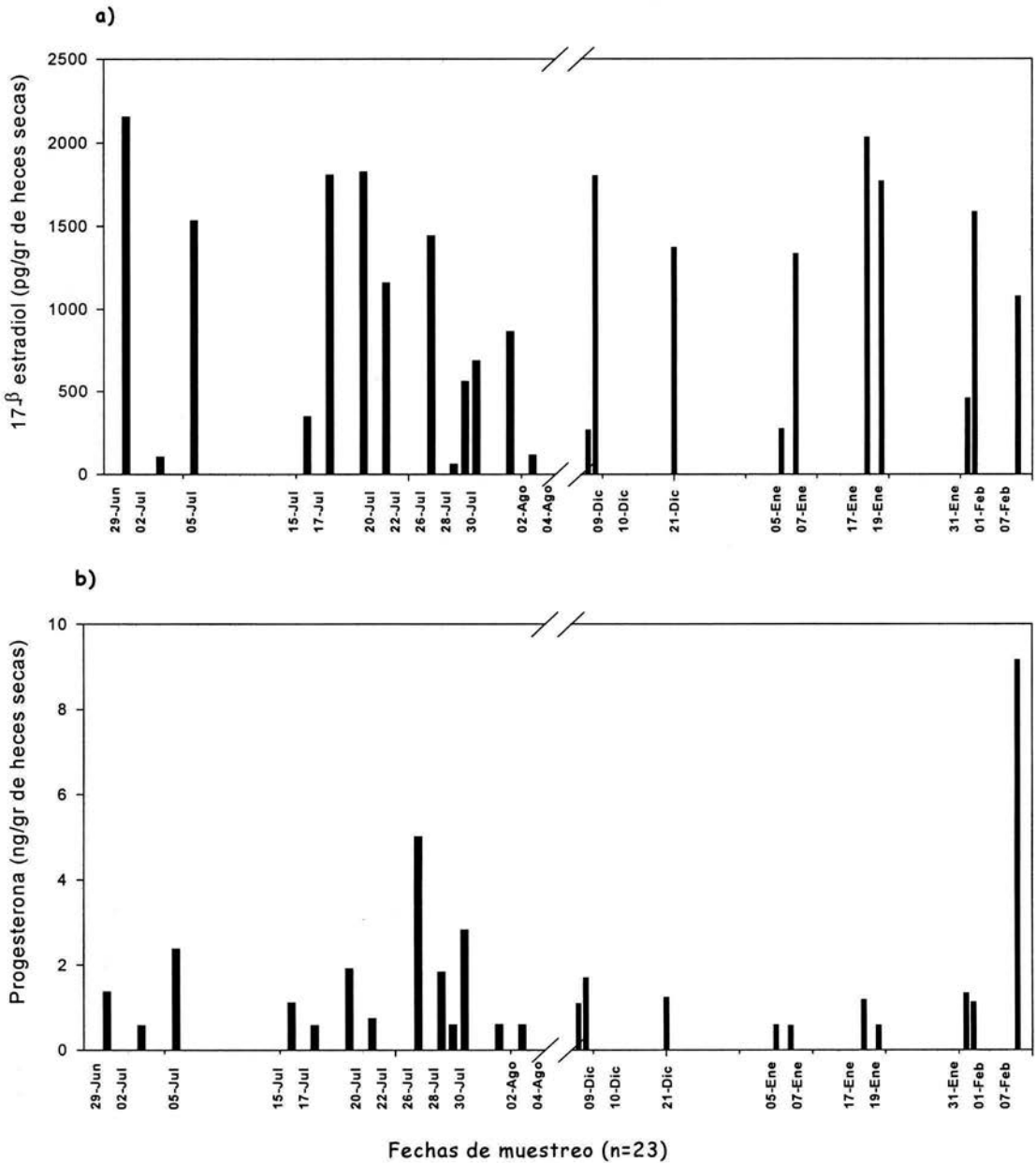


Figura 9: Concentraciones de 17-β estradiol (a) y progesterona (b) en la hembra 2 de rinoceronte blanco del sur obtenidas a través de RIA (n=23), a partir de muestras de heces. Valores que representan el promedio obtenido de los duplicados de cada muestra.

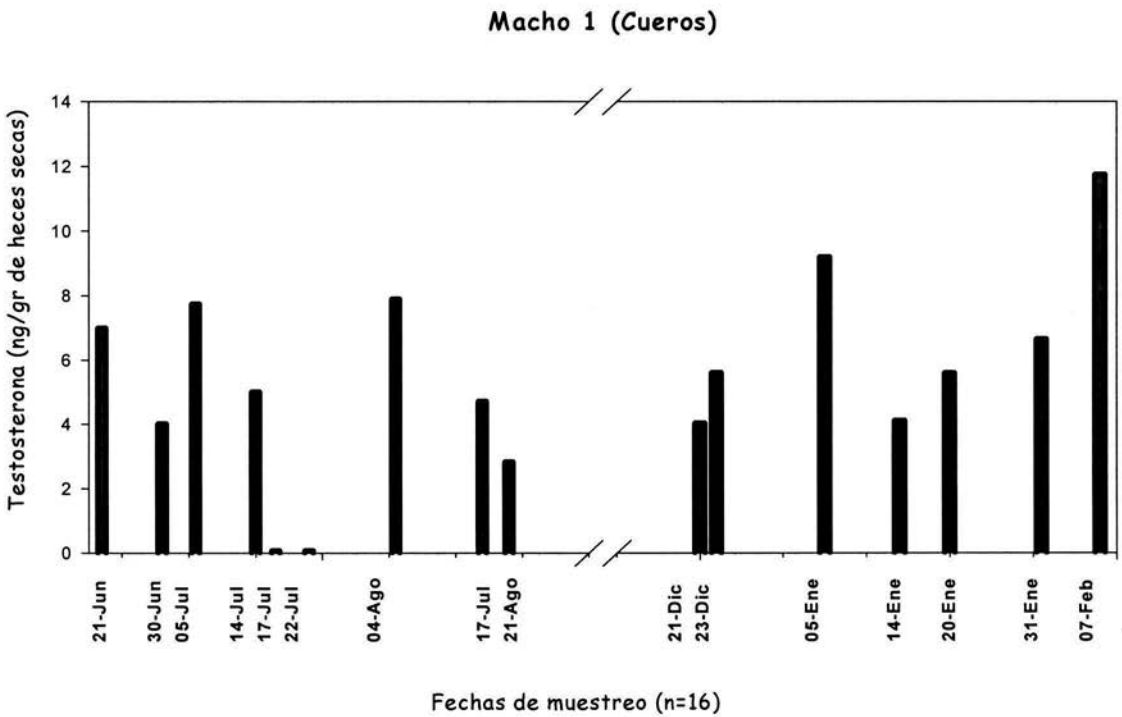


Figura 10: Concentraciones de testosterona en el macho 1 de rinoceronte blanco del sur obtenidas a través de RIA (n=16), a partir de muestras de heces. Valores que representan el promedio obtenido de los duplicados de cada muestra.

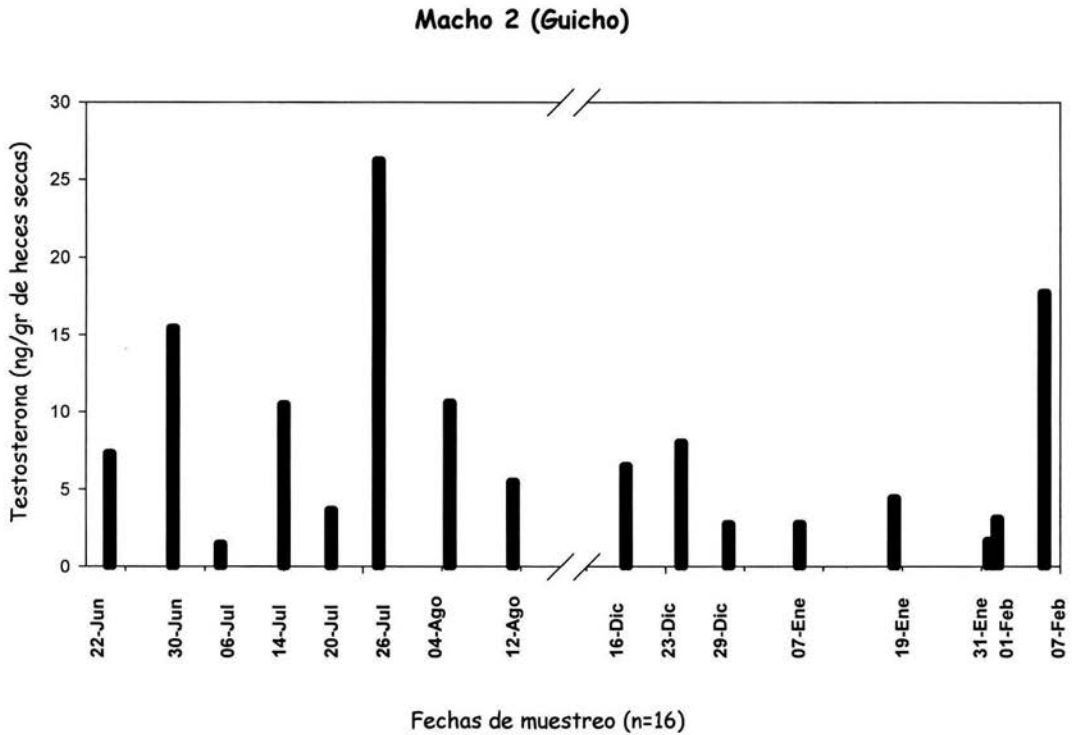


Figura 11: Concentraciones de testosterona del macho 2 de rinoceronte blanco del sur obtenidas a través de RIA (n=16), a partir de muestras de heces. Valores que representan el promedio obtenido de los duplicados de cada muestra.

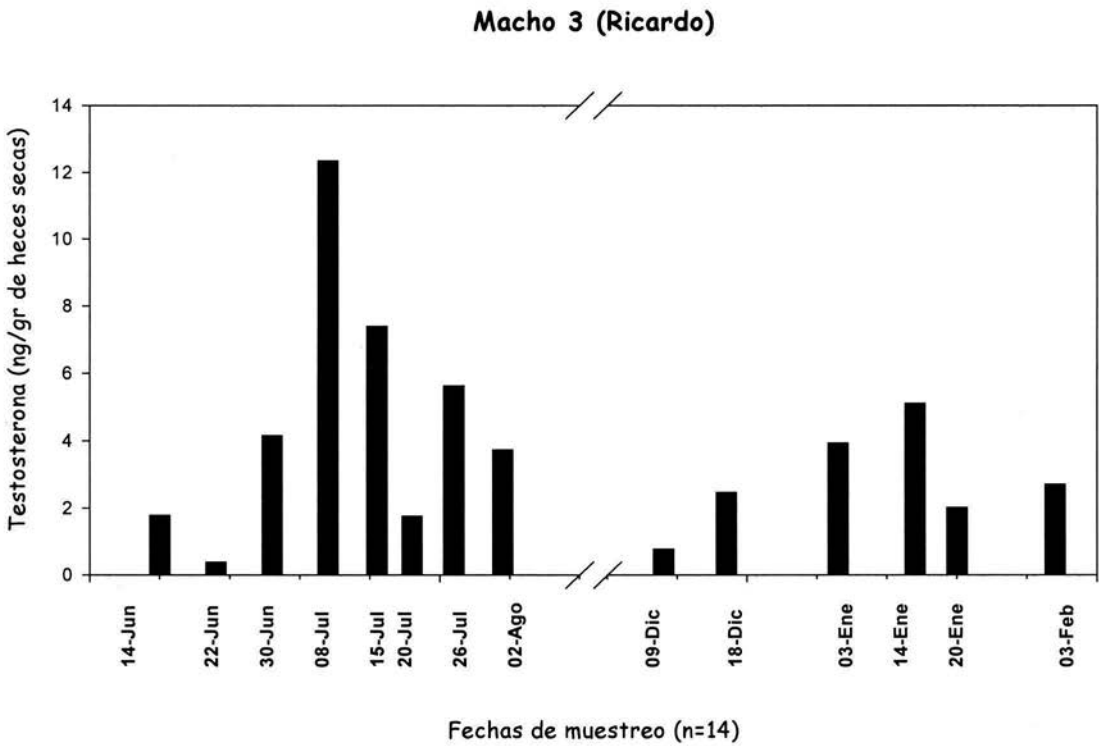


Figura 12: Concentraciones de testosterona del macho 3 de rinoceronte blanco del sur obtenidas a través de RIA (n=14), a partir de muestras de heces. Valores que representan el promedio obtenido de los duplicados de cada muestra.

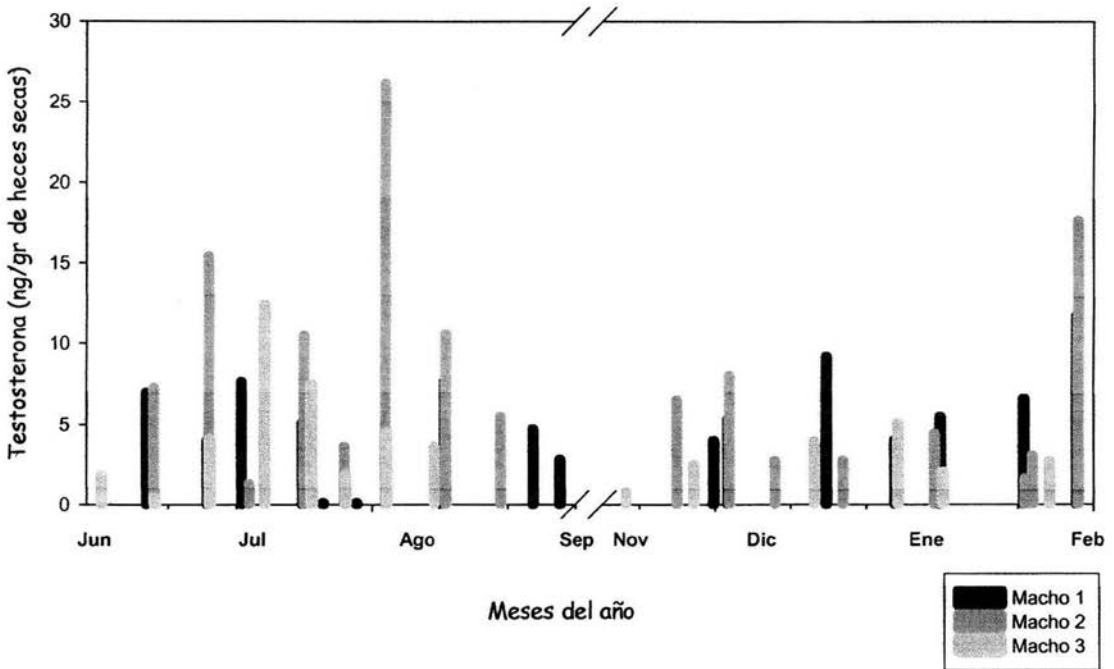


Figura 13: Comparación de los niveles de testosterona de los 3 machos del estudio (n=48), obtenidas a través de RIA, a partir de muestras de heces. Valores que representan el promedio obtenido de los duplicados de cada muestra.

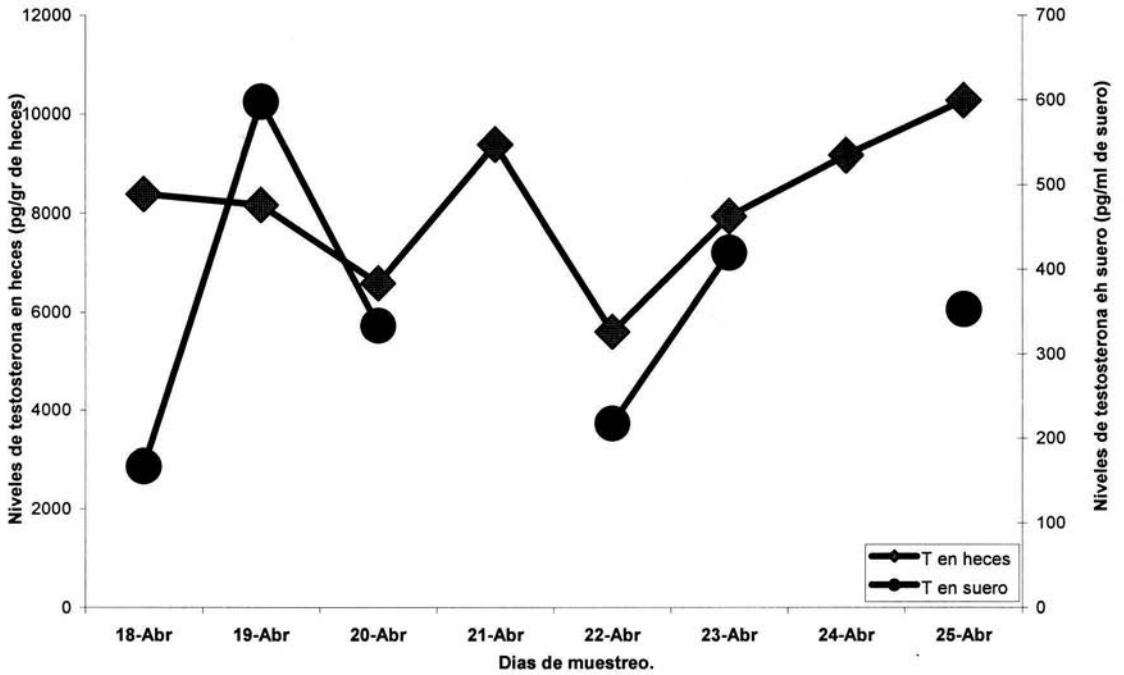


Figura 14: Comparación de los valores de testosterona medidas por RIA en suero (n=5) y heces (n=8) del macho 1 donde se observa un desfase de 2 días entre el valor en suero y en heces. Valores que representan el promedio obtenido de los duplicados de cada muestra.