

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN ALIMENTICIA
SOBRE LA CALIDAD SEMINAL DE LOS OCELOTES
(*Leopardus pardalis*) EN CAUTIVERIO.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

CRISTIAN MARCEL UGAZ RUIZ

TUTOR:

MVZ MPA CARLOS F. ESQUIVEL LACROIX

Comité tutorial

MVZ MSc Fernando Gual S.
MVZ PhD Rosa María Paramo



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

DEDICATORIA

DE TODO CORAZÓN DEDICO ESTA TESIS Y MI ESFUERZO:

- * A mi madre y padre por darme una gran educación, los valores más importantes de la vida y el amor y comprensión que siempre he necesitado.
- * A las personas que ya no están conmigo (abuelos) pero aún siguen en mi corazón.
- * A mi hermano Francisco Javier por apoyar todas mis locas decisiones y estar a mi lado siempre, aunque la distancia nos separe.
- * A mis tíos, Alberto y Checho por darme el apoyo desde que inicio esta extraña travesía.
- * A mis lindas sobrinas (Paola, Caty, Naty) por darme su cariño y amor.
- * A mi prima y mi tía por ser felices cuando yo lo soy.
- * A la familia Rojas Guzmán por darme más de lo que cualquiera podría darle a un desconocido.
- * A todas las personas que desde muy lejos (Chile) estuvieron y estarán apoyándome.
- * A todas las extrañas personas que han aparecido y desaparecido de mi vida desde que llegue a este país, por hacerla interesante y entretenida.
- * A Carlos Esquivel por ayudarme a hacer realidad este sueño y apoyarme en todo lo que significa estar en un país extraño y darme su incondicional amistad.
- * Y especialmente a la persona que me ha apoyado y entendido en momentos difíciles y felices, que ha estado a mi lado dándome su amor y comprensión, GRACIAS ROCIO, eres y serás parte fundamental de mi vida.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Cristian Ugalde Ruiz

FECHA: 15-06-04

FIRMA:



A Joselote, Xcaret,
Guillo, Viejo
y Chester (Q.E.P.D.)
sin ellos esta tesis
no hubiera sido posible.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Martha Romano por permitirme utilizar las instalaciones del laboratorio que ella dirige, en el momento de los análisis hormonales.
- Al Biólogo Ricardo Valdez por enseñarme las técnicas de Radioinmunoanálisis en el laboratorio.
- A todos los funcionarios del laboratorio de Fisiología II del CINVESTAV, por el apoyo logístico para la realización de todos los análisis.
- A Gabriel Campos por ayudarme sin condiciones en el análisis estadístico de mis resultados.
- A la Dra. Brousset por su amistad y conocimientos que me han ayudado en muchas más cosas que este estudio.
- Al Zoológico de León.
- Al Zoológico de San Juan de Aragón.
- Al Zoológico de Chapultepec.
- A todos los funcionarios de los zoológicos en los cuales se realizó esta investigación.
- A la Dirección General de Zoológicos de la Ciudad de México, por el apoyo y disponibilidad de las instalaciones de los zoológicos que están bajo su dirección.
- A la UNAM por la beca que me otorgó para la realización de este proyecto.
- Al Dr. William Swanson por tener la confianza en las personas que hicieron posible esta investigación y por el apoyo económico que permitió lograr los objetivos de esta tesis.

RESUMEN

Durante 18 meses de estudio, el objetivo del presente trabajo, fue analizar las características espermáticas de 5 ocelotes machos (*Leopardos pardalis*) en cautiverio por medio de la evaluación seminal y endocrina, adicionando a las dietas habituales un suplemento alimenticio comercial (CENTRUM® Mutilivitamínico), para determinar el efecto de este, sobre la calidad espermática (motilidad, concentración y morfología dentro de los estándares de referencia) de esta especie. El estudio, se dividió en dos etapas, una sin suplementación y otra con suplementación; la colección de las muestras de sangre y semen se realizó cada dos meses y la colección de excrementos semanalmente. La colección de semen se realizó por medio de electroeyaculaciones, las muestras sanguíneas se utilizaron para cuantificar las concentraciones de testosterona (evaluación endocrina), cortisol (evaluación de estrés), ácidos grasos, vitaminas y minerales (evaluación nutricional). La población presentó una diferencia significativa en la concentración espermática después de la suplementación ($P = 0.0132$), así mismo en la producción espermática por unidad testicular ($P = 0.0442$). En la evaluación de la morfología espermática, se observó una disminución de anomalías lo que indicó que la suplementación tuvo un efecto positivo, sin embargo, éste no llegó a ser estadísticamente significativo ($P > 0.05$). Las concentraciones de testosterona fecal posteriores a la suplementación, aumentaron significativamente ($P = 0.034$). En el análisis nutricional, se detectó que la suplementación tuvo un efecto positivo al aumentar significativamente la concentración de vitamina E en sangre ($P = 0.001$) y no se observó una diferencia significativa en las concentraciones sanguíneas de ácidos grasos omega-3 y omega-6. con base en lo anterior se concluye que las dietas de los zoológicos estudiados son deficientes y por lo tanto, la suplementación alimenticia mejora la producción espermática y la reproducción de la especie.

SUMMARY

During 18 months of study, the objective of the present work, was to analyze 5 males sperm characteristics of ocelots (*Leopards pardalis*) in captivity by means of the seminal and endocrine evaluation, adding to the common diet of a commercial nutritional supplement (CENTRUM® Mutilivitamínico), to determine its effect, on the sperm quality (motility, concentration and morphology within the reference standards) of this species. The study was divided in two stages, one without supplement diet and another one with supplement; the collection of the blood samples and semen was every two months. The collection of excrements was done weekly. The collection of semen was made by means of electroejaculations, the sanguineous samples were used to quantify the testosterone concentrations (endocrine evaluation), cortisol (stress evaluation), fatty acids, vitamins and minerals (nutricion evaluation). The population presented a significant difference in the sperm concentration after the suplement ($P = 0,0132$), also in the sperm production by the testical units ($P = 0,0442$). In the evaluation of the sperm morphology, it was observed a diminution of abnormalitys which indicated that the suplement had a positive effect, however it was not statistically significant ($P > 0.05$). After applying supplement, concentrations of fecal testosterone, increased significantly ($P = 0,034$). In the nutritional analysis, it was detected that the suplement has a positive effect when increasing significantly the concentration of vitamin-E in blood ($P = 0,001$) and there was no significant difference observed in the sanguineous fatty acid concentrations Omega-3 and Omega-6. Based upon above, it is concluded that the zoological diet is deficient and the nutritional supplement improves the sperm production and the reproduction succes of the species.

INDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ABSTRAC	IV
ÍNDICE	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA	5
Ocelotes (<i>Leopardus pardalis</i> ; Linneo 1758)	5
Reproducción de Felinos en Cautiverio	8
Colección y Análisis de Semen	12
Influencia de la Nutrición Sobre la Calidad Reproductiva	21
Efecto del Estrés Sobre la Reproducción	35
Estudios reproductivos no invasivos por medio de monitoreo hormonal fecal	43
3. OBJETIVOS	51
4. HIPÓTESIS	51
5. FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN	52
EXPERIMENTOS Y RESULTADOS	54
6 EXPERIMENTO I: Efecto de la suplementación alimenticia Medido por electroeyaculación.	54
6.1 Materiales y metodología	54
6.1.1 Animales	54
6.1.2 Manejo de los individuos	54

6.1.3 Recolección y evaluación del semen	55
6.1.3.1 Electroeyaculación y recolección de semen.	56
6.1.3.2 Procesamiento y evaluación del semen	56
6.1.3.3 Fijación	58
6.1.3.4 Concentración espermática	58
6.1.3.5 Determinación del estado del acrosoma	59
6.1.3.6 Longevidad o viabilidad espermáticas	59
6.1.3.7 Criopreservación de los espermatozoides	60
6.1.4 Análisis de los datos	62
6.1.4.1 Prueba de hipótesis	62
6.1.4.2 Análisis estadístico	62
6.2 Resultados	62
6.3 Discusión	68
6.4 Conclusiones	72
7. EXPERIMENTO II: Metabolitos hormonales en las heces antes y después de una suplementación vitamínica y mineral en ocelotes en cautiverio	74
7.1 Material y métodos	74
7.1.1 Colección de las muestras	74
7.1.2 Extracción de esteroides de las muestras	75
7.1.3 Radioinmunoanálisis	
7.1.3.1 Radioinmunoanálisis para testosterona.	76
7.1.3.2 Radioinmunoanálisis para cortisol	77
7.1.3.3 Validación del RIA	77
7.1.4 Análisis de datos	78
7.1.4.1 Prueba de hipótesis	78
7.1.4.2 Análisis estadístico	79
7.2 Resultados	79
7.2.1 Validación	79
7.2.2 Descripción de los datos obtenidos	80
7.3 Discusión	83
7.4 Conclusiones	87

8. EXPERIMENTO III: Evaluación de metabolitos hormonales séricos en ocelotes antes y después de una suplementación vitamínica y mineral	88
8.1 Material y métodos	88
8.1.1 Obtención de las muestras	88
8.1.2 Extracción de testosterona.	89
8.1.3 Extracción de cortisol	90
8.1.4 Radioinmunoanálisis para testosterona	90
8.1.5 Radioinmunoanálisis para cortisol	90
8.1.6 Validación de la prueba y análisis de los datos	90
8.2 Resultados	91
8.3 Discusión	91
9. EXPERIMENTO IV: Evaluación de algunos nutrientes en ocelotes antes y después de una suplementación vitamínica y mineral	94
9.1 Material y métodos	94
9.1.1 Obtención de muestras	94
9.1.2 Análisis de ácidos grasos	94
9.1.3 Análisis de vitaminas A y E en suero	95
9.1.4 Análisis de calcio y fósforo	96
9.1.5 Análisis de los datos	97
9.1.5.1 Prueba de hipótesis	97
9.1.5.2 Análisis estadístico	97
9.2 Resultados	98
9.3 Discusión	98
9.4 Conclusiones	100
10. Correlaciones de los resultados	101
11. Discusión general	102
13. Conclusiones	108
14. Investigaciones futuras	110

15. Literatura citada

111

ANEXOS

Anexo 1	136
Anexo 2	137
Anexo 3	139
Anexo 4	139
Anexo 5	140
Anexo 6	140
Anexo 7	141

CUADROS

Cuadro 2.1	31
Cuadro 2.2	35
Cuadro 6.1	54
Cuadro 6.2	55
Cuadro 6.3	63
Cuadro 6.4	65
Cuadro 6.6	66
Cuadro 6.7	68
Cuadro 7.1	80
Cuadro 7.2	81
Cuadro 9.1	98
Cuadro 9.2	99
Cuadro 10.1	101

FIGURAS

Figura 1	32
Figura 2	32
Figura 3	64
Figura 4	67
Figura 5	82
Figura 6	82
Figura 7	83

1. INTRODUCCIÓN

De las 7 familias y 238 especies del orden Carnívora, más de 100 están en la lista de amenazados o en peligro de extinción de la U.S. Fish y Wildlife Service (U.S.F.W.S.) (Nowell y Jackson, 1996; Wildt *et al*, 1988); además, las 10 especies endémicas de felinos latinoamericanos están en peligro de extinción (Swanson *et al*, 1994b). Adicionalmente, factores como la caza furtiva de los animales y la fragmentación del hábitat natural, que han conducido a un aumento en los índices de la consanguinidad, lo cual produce un estancamiento genético, que se traduce en alteraciones seminales en los machos; como altos niveles de anormalidades espermáticas y bajos niveles de reproducción (Wildt *et al*, 1988).

En términos de conservación, los zoológicos son el lugar donde se maximizan los esfuerzos para mantener viables las poblaciones de especies amenazadas, ya que pueden servir potencialmente como una forma de almacenaje para las futuras reintroducciones, en caso de extinción de los animales silvestres o para revitalizar las poblaciones cautivas o silvestres debilitadas (Nowell y Jackson, 1996). Pero estas actividades, por diferentes motivos técnicos y administrativos, no se han llevado a cabo de la manera adecuada, especialmente en el área de la reproducción de los felinos, ya que por las malas condiciones en que se mantienen en cautiverio, se producen alteraciones reproductivas en los felinos. Los procedimientos deficientes o estresantes, las dietas mal balanceadas, el ambientes o instalaciones inadecuadas y las enfermedades mal atendidas también alteran el sistema reproductivo y la actividad hormonal (Swanson *et al*, 1994b).

La reproducción en los animales es una actividad que está jerarquizada hasta uno de los últimos lugares, después del mantenimiento de la vida (homeostasis, alimentación, etc.). Una alimentación deficiente impide que las actividades de la vida se cumplan completamente, dejando al individuo sin reproducción, y alimentándose solamente para sobrevivir. Swanson *et al* (1994b), observaron que la mayoría de las dietas de felinos en los

zoológicos latinoamericanos están basadas en cuellos, cabezas o carne de pollo y de caballo, o ambas, las cuales son deficientes en vitamina A, D y E, lo que conduce a un mal desempeño reproductivo de los animales (Mazzaro y Helmich, 1995; Pereni, 1992), porque no se les proporcionan las necesidades biológicas a nivel hormonal y celular para la reproducción. En estudios con ratas alimentadas con dietas deficientes en vitamina A, se observó que el túbulo seminífero sólo presentaba células de Sertoli, espermatogonios tipo A y unos pocos espermatoцитos en pre-leptoteno, leptoteno y cigoteno sin ningún otro tipo de actividad celular, además de causar una degeneración de las células germinales (Van Pelt, 1991). En otro estudio se demostró que la vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) y carotenoides pueden restaurar el balance propio pro-oxidante y antioxidante para mantener la integridad genética de las células espermáticas, previniendo el daño oxidativo del ADN en los espermatozoides (Kodentsova *et al.*, 1994). Así mismo, se ha reportado que la suplementación con selenio y vitamina E puede mejorar la motilidad y morfología de dichas células (Scott *et al.*, 1998; Verzina *et al.*, 1996). En conjunto, la vitamina C y D tienen importancia en la calidad seminal y función reproductiva en roedores (Ciereszko *et al.* 1995; Kwiecinski *et al.* 1989).

Afortunadamente, la mayoría de las deficiencias nutricionales que producen alteraciones reproductivas en machos se pueden manejar con suplementación alimenticia, como lo demostraron Swanson *et al.* (1995) al encontrar diferencias en las concentraciones espermáticas entre animales mal alimentados, suplementados y alimentados con dietas comerciales. Por ejemplo, jaguares (*Panthera onca*) y pumas (*Felis concolor*) con dietas típicas de zoológicos (carne de caballo y de pollo) presentaban una concentración espermática promedio de 11.0×10^6 y 24.8×10^6 espermatozoides/eyaculado (esper./eyac.) respectivamente, a diferencia de los animales que recibían dietas suplementadas y que presentaban 34.3×10^6 y 87.6×10^6 esper./eyac., o los alimentados sólo con dietas comerciales (Nebraska Felid Diet) 32.4×10^6 y 56.6×10^6 esper./eyac. respectivamente. Sin embargo este incremento en la concentración no implica que la calidad seminal lo haga también (Howard *et al.*, 1993; Swanson *et al.*, 1995). La baja concentración espermática

ha llevado a que sólo un 20% de los zoológicos estudiados (44 zoológicos en 11 países latinoamericanos) sean considerados aptos para presentar alguna actividad reproductiva en especies endémicas de felinos (comportamiento, descendencia, cópulas entre otros) (Swanson *et al.*, 1994b).

Pero además existen otros factores importantes que influyen en la baja reproducción de los felinos, como lo es la baja variabilidad genética que sufren en cautiverio, debido a que las poblaciones son muy pequeñas, y la falta de intercambios de animales entre zoológicos o colecciones privadas, que impiden aumentar la variabilidad de las poblaciones. Esta limitación ha quedado demostrada en diferentes investigaciones con felinos en cautiverio o vida libre por ejemplo, león africano (*Panthera leo leo*), gato leopardo (*Felis bengalensis*), tigre (*Panthera tigris*), puma (*Felis concolor*) y guepardo (*Acinonyx jubatus*) (Wildt *et al.* 1986a, b, 1987a, 1988; Dierenfeld 1993; Brown *et al.*, 1989, 1991; Byers *et al.* 1990; Carlstead *et al.* 1993), entre otros, donde han observado que las causas más frecuentes de la baja concepción en cautiverio son atribuibles a los efectos negativos de la endogamia sobre las características seminales y otros malos manejos reproductivos (poco o nulo intercambio de animales para aumentar la variabilidad genética, orden en los registros reproductivos, etc.), lo que causa un aumento en la consanguinidad por endocruzas, como consecuencia de esto ,se ha observado un aumento en los niveles de teratospermia (Lindburg *et al.*, 1993).

La viabilidad futura de esas poblaciones cautivas es tenue sin la adición de nuevos animales a las colecciones y sería una acción infructuosa para la conservación si se capturaran animales de vida libre antes de investigar los estados de conservación y ecología de cada especie. Pero las nuevas iniciativas de las instituciones académicas de investigación incluyen la asistencia técnica para instituciones que mantienen estos animales en cautiverio, lo que perfeccionaran las herramientas necesarias para la conservación, las cuales incluyen programas de reproducción asistida y natural, cuidados veterinarios y análisis genético, entre otros (Nowell y Jackson, 1996).

Un grupo específico de la familia Felidae son los pequeños felinos (animales que pesan menos de 20 Kg) cuya reproducción en cautiverio ha sido también inconsistente (Mellen 1989 citado por Mellen 1991, 1992, 1993). Muchas de las poblaciones de estos felinos son altamente consanguíneas (Mellen 1989 citado por Mellen 1991, 1993; Nowell y Jackson, 1996), por las mismas razones mencionadas.

Por ser una de las especies de pequeños felinos en peligro de extinción (NOM-059-ECOL-2001; U.S.F.W.S.) y estar en el apéndice I de la Comisión Internacional para el Transporte de Especies en Peligro de Extinción (**CITES**), se decidió trabajar con uno de los pequeños felinos con mayor distribución en América (desde Texas, E.U.A., hasta la Pampa norte de Argentina (Seager y Demorest, 1986)), el OCELOTE (*Leopardus pardalis*). Esta especie ha sufrido un fuerte impacto por la destrucción de su hábitat natural (Swanson *et al.*, 1996b). Además, no existen estudios profundos de su fisiología reproductiva como muchas otras las especies pertenecientes al grupo de los pequeños felinos.

Mucha de la información referente a los ocelotes es confusa y difiere entre los diferentes autores, llegando a ser en algunos casos, una información deficiente, por lo que es necesario establecer estándares para los animales en cautiverio, porque es ahí donde se puede manejar la reproducción; además, los estudios deben ser específicos para las zonas donde se encuentren los zoológicos, ya que muchas de las especies de felinos son estacionales y de acuerdo a la ubicación geográfica presentarán sus ciclos reproductivos en diferentes épocas del año. Además, los individuos de esta especie en los zoológicos de la zona central de México no se han reproducido o si lo han logrado, ha sido en forma esporádica y deficiente con respecto a datos publicados en otras instituciones a nivel mundial (de 1 a 3 crías por año) (Mellen 1989 citado por Mellen 1991; Cisin, 1967, citado por Nowell y Jackson 1996)

Por todas estas razones es necesario realizar estudios específicos sobre las causas reales de la deficiente reproducción y su posible relación con el estrés y la calidad de la dieta. Para realizar esto se deben aplicar diferentes métodos y tecnologías de punta, que ayuden en la tarea de mejorar el nivel de supervivencia de las especies en cautiverio y vida libre, por medio de la reproducción. Pero el efectivo uso de las técnicas de reproducción asistida requiere como pre-requisito del entendimiento de la fisiología básica de la reproducción de la especie. Para esto es necesario realizar estudios de medición y dinámica hormonal por medios invasivos (extracción de sangre) y no-invasivos (análisis de excremento) (Wildt *et al*, 1995).

2. Revisión bibliográfica

Ocelotes (*Leopardus pardalis* Linneo 1758)

El ocelote es uno de los pequeños felinos americanos que forma parte del grupo de los **felinos mexicanos neotropicales** junto con el puma (*Felis concolor*), jaguar (*Panthera onca*), jaguarundi (*Herpailurus yaguarundi*), y margay (*Leopardus wiedii*) (Oliveira, 1994). Pertenece a la familia de los Felidae, del orden de los carnívoros, compuesto por 361 especies.

Este pequeño felino es una de las especies endémicas americanas que se encuentra clasificado como en peligro de extinción por la U.S. Fish and Wildlife Service (U.S.F.W.S.) y desde 1989 se encuentra categorizado en el Apéndice I de CITES. En México está clasificado como amenazado por la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001), debido a que su población ha sufrido un fuerte impacto por la destrucción de su hábitat natural y por la cacería furtiva debido a su valiosa piel (Nowell y Jackson 1996; Swanson *et al.*, 1996b).

La distribución de la especie es amplia. Comienza en el sudeste de Estados Unidos de América (Texas) y abarca todos los países hasta Sudamérica, excepto Chile, ocupando un amplio espectro de hábitat, incluyendo bosques de manglares y pantanos costeros, praderas de sabana y pastoreo, monte bajo y bosques tropicales de todos los tipos (primarios, secundarios, perennes, estacionales y montañosos), aunque sólo hasta los 1200 metros de altura sobre el nivel del mar (Bisbal, 1989; Eisenberg, 1990; Mondolfi, 1986; Seager y Demorest, 1986). Depende mucho de una cobertura vegetal que le permita cazar, esconderse y dispersarse, por sus características terrestres y de descanso diurno entre los árboles y la densa vegetación. También es necesaria esta cobertura vegetal para la formación de madrigueras escondidas, pero se ha reportado que puede adaptarse a zonas con parches vegetales cercanos a los asentamientos humanos (Ludlow y Sunquist, 1987; Oliveira, 1994; Navarro, 1985; Tewes y Everet, 1986.).

Se conocen 11 subespecies de las cuales 4 existen en México: *albescens* y *sonorensis* se encuentran en el nordeste del país, *pardalis* en todo el sur y sudeste y el *nelsoni* en el occidente de México (Nowell y Jackson, 1996).

En promedio, el peso de los machos es de 10 (n = 8 Mondolfi, 1986) a 11.5 Kg. (n = 8 Emmons, 1988; Sunquist *et al*, 1989), y en las hembras varía de 8.8 (n = 5, Mondolfi, 1986) a 9.4 Kg. (n = 11, Husson, 1978 Citado por Nowell y Jackson 1996; Emmons, 1988; Crawshaw y Quigley, 1989; Konecny, 1989; Sunquist *et al*, 1989). Su pelaje es corto con manchas oscuras que varían en su forma y ubicación sobre un fondo amarillo claro que en el vientre llega a ser blanco. Se ha reportado una edad máxima de 10 años vida libre y de 20 años en animales cautivos (Sunquist *et al*, 1989; Oliveira, 1994).

La dieta de los ocelotes varía de acuerdo a la estación y a la disponibilidad de presas, tomando ventaja de los cambios climáticos, como por ejemplo, de los bancos de crías de peces (Emmons, 1988) y cangrejos de tierra (Ludlow y Sunquist, 1987) en la estación húmeda. Basados en análisis fecales, Sunquist *et al* (1989) encontraron que la

dieta de los ocelotes consistía en 65 % de pequeños roedores, 18 % de reptiles (mayoritariamente iguanas), 7 % de crustáceos y peces, 6 % mamíferos medianos (pequeños venados) y 4 % de aves. Así mismo, Emmons, en 1988, encontró que la dieta del los ocelotes consistía en 66 % de mamíferos pequeños, 5 % de roedores grandes, 5 % de murciélagos y mamíferos arbóreos, 11 % de aves, 12 % de reptiles, y 2 % de peces. Se estima que estos felinos necesitan consumir entre 558 y 837 g/día u 88 g/Kg de peso vivo de alimento al día y como las presas del ocelote son tan pequeñas, éste debe adquirir alimentos varias veces al día (Oliveira, 1994)

La biología reproductiva de la especie es muy variable por causa de su amplia distribución y por los diferentes efectos que ejerce el clima sobre ellos, de acuerdo con el lugar donde se encuentren. La estación reproductiva en vida libre (**VL**) se ha considerado que ocurre a través de todo el año, pero con picos reproductivos en otoño en Texas (Tewes, 1986) y México (Leopold, 1959). En cambio en Sudamérica los picos se reportan entre octubre y enero en Paraguay (Rengger, 1830, citado por Nowell y Jackson, 1996) hasta el noreste de Argentina (Crespo 1982). El estro en cautiverio (**C**) es entre 4.63 +/- 0.63 días (n = 6) hasta 7 a 10 días, pero puede ser más corto (3 días) si queda gestante (Seager *et al.*, 1986). El ciclo estral (**C**) completo es de 25.11 +/- 4.33 días (n = 9; Mellen, 1989, citado por Mellen 1991). La gestación (**C**) va desde 79 a 91 días según los diferentes autores (Mondolfi, 1986; Seager, 1986). Las crías por parto (**C**) se encuentran en el rango de 1.64 +/- 0.21 (n = 28; Mellen 1989) y en un rango de 1 a 3 con una moda de 1 (Cisin, 1967, citado por Nowell y Jackson 1996). La edad de independencia en **VL** aun no esta clara, pero ocurre aproximadamente al año de edad, después de que los sub-adultos son tolerados entre los adultos mayores de un año (Ludlow y Sunquist, 1987; Emmons, 1987; Crawshaw y Quigley, 1989). La edad del inicio de la pubertad en las hembras de la especie (**C**) es de 18 – 22 meses; el periodo inter-estro va desde 6 meses hasta los dos años (Eaton, 1977, citado por Nowell y Jackson 1996) y el comienzo de la espermatogénesis en los machos ocurre aproximadamente a los 2.5 años (Mondolfi, 1986). En **VL** el inicio de la

espermatogénesis probablemente se relaciona con la adquisición de territorio (Emmons, 1993). El intervalo inter-nacimiento en VL es posiblemente dos años (Emmons, 1988).

En los últimos años se han ido perfeccionando diferentes protocolos de colección de semen, por lo que se conocen algunas características seminales de la especie de estudios anteriores, como por ejemplo:

	Howard, 1993	Wallach, 1983
Vol. eyaculado	0.3 +/-0.1 ml	0.2 - 3 ml
Concentración	28 +/- 17 x 10 ⁶ /ml	0.4 - 150 x 10 ⁶ /ml
Motilidad	72 +/- 12.5 %	1 - 55 %
Motilidad Progresiva	4.0 +/- 0.5	2.5 - 5
Porcentaje Normalidad	80.8 +/- 0.9 %	

Reproducción de felinos en cautiverio

La reproducción es fundamental para la existencia continua y sobrevivencia de las especies. Además, la fisiología de la reproducción juega un papel crítico en el surgimiento del campo de la biología de la conservación y la preservación de la diversidad biológica y genética (Wildt *et al*, 1993). La reproducción en cautiverio de algunas especies es quizás el método más útil para la recuperación de especies en peligro de extinción. La conservación y mantenimiento de la biodiversidad existente en nuestro planeta es una obligación de los Médicos Veterinarios y de muchas otras especialidades profesionales dedicadas a cualquier actividad; no obstante, en los últimos 200 años han desaparecido al menos 46 especies de mamíferos (de la Fuente, 2001) y en la mayor cantidad de las ocasiones en las que se ha perdido alguna especie, ha sucedido en forma directa o indirecta producto de la intervención del género humano, fundamentalmente por la destrucción de los hábitat (fragmentación, contaminación y sobre-explotación). En el mejor de los casos, la actividad humana ha conducido a la alteración de los mecanismos naturales de reproducción, lo cual ha llevado a la presentación de altos índices de endogamia en las poblaciones, lo que lleva

a alteraciones seminales (Brown, 1991b; de la Fuente, 2001). Ante esta situación, una de las herramientas más directas y menos costosas de evitar la extinción de un número considerable de especies es mediante su reproducción en cautiverio, como una herramienta de apoyo a la conservación *in situ*.

Los zoológicos como instituciones dedicadas a mantener la fauna silvestre en cautiverio juegan un papel importante en el mantenimiento de las poblaciones genéticamente viables a largo plazo, para lo cual el conocimiento de los aspectos biológicos reproductivos de una especie y la información concerniente al estatus reproductivo de cada individuo de un grupo reproductor será esencial para el éxito de la propagación de la especie. El estudio y aplicación del área de la reproducción en los zoológicos se puede dividir en tres áreas (Paras, 1997):

- 1). Crear el conocimiento básico sobre la información reproductiva, como sería la determinación del sexo, maduración sexual, descripción de los ciclos sexuales, viabilidad de las células espermáticas, desarrollo embrionario, periodos de gestación, entre otros.
- 2). Conocer y tratar los problemas que afectan la reproducción (fisiológicos, ambientales, de comportamiento, etc.)
- 3). Desarrollar técnicas que permitan, en aquellas especies con baja tasa de reproducción, la sobreproducción de animales, para aumentar las poblaciones actuales y realizar intercambios entre las colecciones de dichos animales.

En el caso particular de los felinos, los esfuerzos se han enfocado a los grandes felinos considerados como **mega vertebrados carismáticos**, los cuales se reproducen en buena forma y frecuencia, con las excepciones del guepardo (*Acinonyx jubatus*) y la pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*) (Nowell y Jackson 1996). En cambio los pequeños felinos no han tenido esa atención en las colecciones zoológicas y los programas de conservación (Swanson y Wildt, 1997).

La reproducción de los pequeños felinos latinoamericanos depende de las acciones *in situ* y *ex situ*, lo que incluye la preservación del hábitat, así como la propagación en cautiverio de individuos seleccionados para sostener la diversidad genética (Swanson *et al*, 1996a, b). Los programas de manejo de conservación para estas especies teóricamente se enfocarían en aumentar las poblaciones cautivas y de vida libre por medio de reproducción asistida, incluyendo el crío-almacenaje de espermatozoides combinado con inseminación artificial, y el intercambio de material genético (espermatozoides), entre las diferentes colecciones zoológicas y entre las poblaciones cautivas y de vida libre (Ballou, 1992; Wildt, 1994; Wildt *et al*, 1992a, b, 1993). Sin embargo, los beneficios de la reproducción asistida para mantener la diversidad genética serán obtenidos sólo cuando los protocolos efectivos hayan sido bien desarrollados y manejados (inducción de la ovulación, congelación y descongelación de semen, etc.) (Swanson *et al*, 1996a, b). El problema con las estrategias *ex situ* es por causas dadas por el pequeño tamaño de las poblaciones cautivas y su amplia dispersión geográfica, falta de información básica de la reproducción y comportamiento y las pobres condiciones de alojamiento. Todo esto lleva al bajo éxito reproductivo en cautiverio (Mellen, 1991; Swanson y Wildt, 1997).

Los puntos básicos para un buen programa de reproducción en los zoológicos de Latinoamérica son: 1) contar con un ambiente adecuado, que en cautiverio está dado, en parte, por el diseño de los albergues y, en parte por la localización geográfica de la colección (Paras, 1997); 2) considerar la estacionalidad y fotoperiodicidad de las especies (Swanson, 1996b). Por lo general los zoológicos mexicanos han descuidado mucho el diseño de las instalaciones con vías a fomentar la reproducción (Swanson *et al*, 2003). Swanson *et al*, en 1994, estudiaron los felinos latinoamericanos y reportaron que uno de los principales problemas de la baja reproducción de estas poblaciones es que sus encierros son propicios para desarrollar condiciones de estrés ambiental, debido a las inadecuadas instalaciones que no proveen lugares para escondite, partos etc. Este tipo de alteraciones ambientales se ve también reflejada en la producción espermática, porque aquellos individuos que vivían separados de las hembras (debido a que sus instalaciones así estaban

diseñadas), presentaban una concentración espermática menor a 1×10^6 células/eyaculado, mientras que aquellos machos que estaban en continuo contacto con una o más hembras y/o machos presentaron una concentración mayor a 10 millones de espermatozoides por eyaculado. En este estudio también se detectó, como otro punto clave en la reproducción, el tipo de dieta, ya que una buena nutrición contribuye al desempeño reproductivo de una especie.

Un punto importante para todos los zoológicos modernos debería ser la implementación de programas de reproducción asistida y de conservación de germoplasma para mejorar la variabilidad genética. Las técnicas usadas en este tipo de manejos son las creadas para los animales domésticos, como la sincronización de estros, criopreservación de semen, inseminación artificial y transferencia de embriones. Este tipo de procedimientos tiene un potencial que facilitaría el mantenimiento de la biodiversidad genética. Sin embargo, la implementación de estas técnicas requiere del entendimiento de la fisiología reproductiva de las especies, para lo cual se deben utilizar métodos de monitoreo hormonal y otras técnicas para el conocimiento profundo de la especie a tratar (Morrow y Monfort, 1995).

En un estudio realizado por el Dr. Swanson y sus colaboradores (Swanson *et al.*, 1995) en 186 machos de 8 diferentes especies de felinos latinoamericanos, se observó que el nivel de éxito reproductivo en cautiverio es bajo, con sólo un 20 % de machos clasificados como reproductores probados (por lo menos habían tenido una cría en su vida). 71 % de éstos machos presentó eyaculados con espermatozoides, 47 % tenían menos de 1×10^6 espermatozoides totales/eyaculado y 28 % tuvieron concentraciones mayores a 1×10^6 espermatozoides/eyaculado (esperm/eyac). Los valores de volumen seminal, concentración espermática, índice de motilidad, porcentaje de normalidad celular y volumen testicular fueron pobres al momento de medirlos en cada especie. Como se esperaba, el volumen espermático, la concentración y el volumen testicular generalmente variaron con el tamaño de la especie; así, las grandes especies tenían gran volumen testicular y un gran volumen

del eyaculado conteniendo más células espermáticas. El índice de motilidad espermática fue similar entre las especies (Swanson *et al.*, 1995).

Colección y análisis de semen

La pobre reproducción histórica de muchas especies de carnívoros no domésticos en cautiverio ha demandado el desarrollo de métodos para evaluar y mejorar la propagación de ellas a través de la reproducción artificial (Howard, 1993). Además, la conservación de algunas especies cautivas en los zoológicos podría ser mejorada por la adaptación de varias técnicas de reproducción asistida, comunes y exitosas en los animales domésticos (Howard *et al.*, 1986). La biotecnología, como son llamadas todas estas técnicas, tiene un tremendo potencial como una herramienta para ayudar a la conservación de especies en peligro de extinción (Bainbridge y Jabbour, 1998; Howard, 1999; Wildt y Roth, 1997), particularmente con respecto a las pequeñas poblaciones manejadas en cautiverio en las instituciones zoológicas (Goodrowe *et al.*, 2000). Dentro de las técnicas utilizadas en animales domésticos, la inseminación artificial con semen fresco o descongelado podría incrementar el potencial reproductivo de los animales con características genéticas deseables, expandir las reservas genéticas sin el riesgo y el costo de mantener o transportar a los padres y permitir la utilización de los machos incapaces de formar parejas naturalmente por causas físicas o de comportamiento. La evaluación del potencial reproductivo de los mamíferos no domésticos ha sido históricamente a través de la producción de descendencia por la reproducción natural, pero la evaluación del semen tiene por sí sola un importante valor predictivo en la estimación del potencial de fertilidad de los machos que aún no han tenido descendencia. Actualmente, existen técnicas seguras y disponibles para la colección de espermatozoides de muchas especies, lo que sirve para conocer la potencial calidad reproductiva de los machos y mantener su valor genético almacenado para mejorar la propagación y mantenimiento de la diversidad genética de las poblaciones silvestres cautivas (Howard *et al.*, 1986; Howard, 1993).

El primer punto para el avance y la aplicación de la biotecnología en los animales silvestres es establecer la condición reproductiva de las poblaciones existentes. Esto se realiza por medio de las perspectivas de la espermatología, usando y perfeccionando los protocolos de colección, evaluación, procesamiento y entendimiento de la calidad y función seminal. Pero los conocimientos sobre los procesos de la espermatología solamente serán útiles si se realizan simultáneamente con los monitoreos de la condición reproductiva de las hembras (Wildt *et al*, 1995). Aunque existen algunos reportes de característica de eyaculados en algunas especies (lobos (Seager, 1974), zorros (Fougner, 1989), visón (Aulerich *et al*, 1972), osos (Martin, 1978; Platz *et al*, 1983; Seager, 1974) y felinos (Howard *et al*, 1984; 1992; Seager *et al*, 1975; Wildt *et al*, 1983) entre muchas otras) el conocimiento acerca de la fisiología de los gametos, la habilidad de fertilización de los espermatozoides de las poblaciones silvestres cautivas, sigue siendo limitado (Howard, 1993). Pero el conocimiento generado hasta el momento nos ha demostrado que las características seminales y las respuestas a las diferentes técnicas de colección son específicas de especies, que el semen de los carnívoros es sensible a las manipulaciones y el mantenimiento de la viabilidad espermática depende del método de procesamiento utilizado. Así mismo, se ha visto que las especies de felinos producen altas proporciones de espermatozoides estructuralmente anormales, asociado con la pérdida de variabilidad genética (Howard, 1993).

Con los diferentes métodos de colección de semen (numerosos métodos eyaculatorios y no eyaculatorios) se puede obtener un eyaculado de adecuada concentración y motilidad espermática, con el mínimo de estrés para el animal (Howard *et al*, 1986; Howard, 1993). Espermatozoides maduros viables pueden ser recuperados en carnívoros post mortem, para mantener germoplasma invaluable bajo criopreservación. Este tipo de método involucra un lavado o macerado de los túbulos deferentes o cola del epidídimo en una solución salina fisiológica o diluyente crioprotector (Howard, 1993). El masaje rectal de las glándulas accesorias sexuales también puede ser usado para la colección de semen, usando una mano enguantada se presiona suavemente la zona ventral

de la pared del recto repetidas veces desde la parte craneal a caudal de los órganos accesorios internos, este método es usado en las grandes especies o por medio de una sonda rectal en las pequeñas especies (Howard, 1993). La recuperación de semen post coito es probablemente el método más viejo de colección de semen; la mayor desventaja de esta técnica es que el semen llega a venir contaminado por las secreciones vaginales, lo que puede afectar adversamente la viabilidad del semen (Carvalho *et al*, 1991). La colección de semen por manipulación digital o con el uso de la vagina artificial requiere que los animales puedan ser manejados sin riesgos para ellos o para los manipuladores; esta técnica provee un eyaculado normal, pero es necesario un provocador o una hembra en celo y un periodo de entrenamiento de muchas semanas, lo que usualmente impide el uso de esta técnica para muchas especies no-domésticas (Howard, 1993). Esta técnica se ha utilizado efectivamente en ciertas especies de cánidos y es usada en forma rutinaria en los programas de reproducción comercial de zorros (Howard, 1993).

La electroeyaculación es el método más apropiado para la obtención de semen de la mayoría de las especies no-domésticas, por que puede ser conducida con el animal anestesiado. Ha sido usada desde ratones hasta elefantes (Howard *et al*, 1986). Esta técnica involucra la estimulación de los nervios de los órganos reproductivos con estímulos eléctricos de baja intensidad (Howard, 1993). Estudios en hurones mostraron que el número de espermatozoides colectados por electroeyaculación es similar al encontrado en los túbulos deferentes y en la cola del epidídimo post mortem (Howard y Wildt, 1990). Para la electroeyaculación en carnívoros, la alimentación debe suspenderse 12 a 24 horas previamente y los machos serán anestesiados a un plano quirúrgico con una inyección intramuscular de ketamina o de tiletamina zolacepam o una combinación de ketamina con bajas dosis de xilacina (Howard *et al.*, 1986; Howard, 1993). Algunos anestésicos relajan la musculatura circundante a la vejiga, produciendo una contaminación urinaria del semen colectado, lo que lleva a la pérdida rápida de la motilidad. Dentro de las drogas que producen este efecto se encuentra al diazepam, los derivados de fenotiacínicos, como el maleato de Acepromazina, y los anestésicos inhalados incluyendo el halotano, la xilacina

las vías neuronales que controlan la función vesical y la eyaculación. La contaminación urinaria también ocurre cuando el voltaje utilizado excede el mínimo necesario para la eyaculación o cuando la sonda y los electrodos están desplazados cranealmente (Howard, 1993). Muchos electroestimuladores manufacturados para la colección de semen de animales domésticos pueden ser adaptados para su uso en las especies de zoológicos. Desafortunadamente, evaluaciones comparativas de los requerimientos de los estimuladores son a menudo confusas, porque muchos estudios no tienen estandarizadas las características básicas de corriente eléctrica de estimulación, frecuencia, voltaje y forma de las ondas (Howard *et al.*, 1986). Algunos diseños de eyaculadores liberan corriente alterna (AC) o corriente directa (DC), pero ambos son igualmente efectivos (Martin, 1978). Tradicionalmente, se utiliza una sonda rectal que contiene electrodos de cobre o acero que liberan los estímulos. Las sondas son fabricadas con plástico o teflón y los electrodos están montados en la superficie de la sonda en forma circular o longitudinal (Howard *et al.*, 1986). La mejor respuesta obtenida en carnívoros es con las sondas de electrodos longitudinales (Howard, 1993), porque este tipo de sonda produce sólo una estimulación somática moderada (Howard *et al.*, 1986). El diámetro de la sonda rectal está generalmente relacionado con el tamaño normal de un excremento evacuado, lo que permite un adecuado contacto entre los electrodos a la mucosa adyacente del recto (Howard *et al.*, 1986).

Una vez anestesiado, el animal debe ser colocado en decúbito lateral o en una posición que permita el fácil acceso al ano y al pene; las heces deben ser removidas manualmente y la sonda lubricada correctamente (lo que aumenta la superficie de contacto con la pared del recto) (Howard *et al.*, 1986; Howard, 1993). La profundidad de inserción de la sonda varía según las especies y los electrodos deben ir orientados a la posición normal de los órganos sexuales del macho (parte ventral del recto) (Howard *et al.*, 1986). Un protocolo estándar de electroeyaculación, en el cual un macho de una especie determinada recibe el mismo número de estímulos al mismo incremento de voltaje, es beneficioso para la comparación de machos y de características del eyaculado (Howard *et al.*, 1983). El protocolo de estimulación eléctrica más utilizado consiste en series de diez estimulaciones

(s16901t0b0s12v1P) aplicadas en forma creciente de voltaje y amperaje; la secuencia total se divide en tres series de 30 o 40 estímulos, los cuales son aplicados por 3 segundos y con 3 segundos de descanso, con un aumento continuo en el voltaje desde 0 voltios hasta el máximo deseado, volviendo a los 0 voltios iniciales. El voltaje inicial de selección está basado en la respuesta extrema del animal durante las estimulaciones y una moderada extensión de las extremidades traseras es un indicio de una buena estimulación. Esto también puede ser usado como un indicador de una posición propicia de la sonda en el recto. Por ejemplo una extensión pobre de los miembros posteriores en dirección craneal puede indicar una inadecuada estimulación dorsal. El voltaje inicial utilizado por la mayoría de las especies oscila entre 2 y 5 voltios y al término rara vez alcanza los 10 voltios (Howard *et al.*, 1986; Wildt *et al.*, 1983; 1986; 1987a, b, c).

La colección del semen extraído se realiza en viales de plástico, estériles, precalentados (37° Celsius) para evitar que los espermatozoides sufran un cambio brusco de temperatura (Howard *et al.*, 1986; Howard, 1993).

El semen es analizado para determinar el volumen del eyaculado, pH, porcentaje de motilidad, motilidad progresiva, concentración, morfología e integridad del acrosoma (Howard *et al.*, 1986; Howard, 1993). Microscópicamente, el semen es examinado a 37° Celsius cuando se determina el porcentaje de motilidad (rango de 0 a 100 %) y la motilidad progresiva o status en una escala de 0 a 5, donde 0 es sin movimiento y 5 es un movimiento rápido casi rectilíneo. Esto se analiza en un campo microscópico de 250 a 400X (Howard, 1993; Wildt *et al.*, 1988). El volumen de eyaculado y el pH son medidos con sus respectivas herramientas y la concentración se determina en forma manual en un hemocitómetro (Howard *et al.*, 1986).

El semen colectado por electroeyaculación generalmente contiene mayor volumen, menor concentración espermática y mayor pH que el eyaculado obtenido en vagina artificial, al igual que la respuesta a la criopreservación y la fertilidad son diferentes en

ambos métodos (Howard, 1993; Seager, 1974).

La morfología seminal es evaluada usando una alícuota (5 μ l) del semen sin diluir, fijada con 50 μ l de glutaraldehído al 0.3%, en un microscopio de contraste de fases, examinando 100 células a 1000X (Howard, 1993). Varios métodos de tinción, incluyendo la tinción de nitrato de plata (Curry *et al.*, 1989), el verde rápido y la rosa de bengala (Pope *et al.*, 1991) son usados para el estudio de las estructuras espermáticas en carnívoros no domésticos (Curry *et al.*, 1989). El sistema de evaluación para la morfología espermática clasifica a las células en normales o que presentan anomalías primarias o secundarias. Las anomalías primarias incluyen: contorno de la cabeza anormal, cola fuertemente doblada, bicefálica o biflagelar. Las anomalías secundarias incluyen pieza media curva, cola curva, o gota citoplasmática. Las anomalías primarias son originadas en los testículos durante la espermatogénesis y son consideradas más perjudiciales que las secundarias, que ocurren en el transcurso del viaje a través del sistema de ductos (Howard *et al.*, 1986).

La estructura morfológica de los espermatozoides entre los eyaculados de un macho es notoriamente consistente, es decir, no varía en un largo periodo, sin importar la técnica de colección utilizada (Howard, 1993). Un guepardo (*Acinonyx jubatus*) entrenado para eyacular dentro de una vagina artificial produce un número similar de espermatozoides defectuosos que los obtenidos en la electroeyaculación (Durrant *et al.*, 1985). La incidencia de espermatozoides pleiomórficos en carnívoros parece ser específica de especie (Howard, 1993). El eyaculado de ciertos cánidos contiene baja proporción de espermatozoides defectuosos, mientras que muchos felinos no domésticos producen eyaculados con más de 40% de células espermáticas morfológicamente anormales (Watson, 1978). Los gatos electroeyaculados repetidamente continúan produciendo un número comparable de espermatozoides anormales, indicando que la frecuencia de la eyaculación no tiene efecto en la morfología espermática (Watson, 1978). También se ha observado que el porcentaje de anomalías no decrece producto de continuos manejos de contención para la

colección de semen en felinos, por ejemplo, tres veces durante una semana (Wildt *et al.*, 1983). La causa precisa de las anomalías es desconocida, pero los efectos estructurales en el guepardo (Watson, 1978; Wildt *et al.*, 1983) y en leones geográficamente aislados (Seager *et al.*, 1975; Wildt *et al.*, 1987a) tienen relación con la disminución de la variabilidad genética y el decrecimiento de la circulación de la concentración de testosterona (Howard, 1993).

El estudio de la integridad del acrosoma es necesario junto con la evaluación del semen, porque el acrosoma espermático es de importancia crítica para la fertilización. La morfología acrosomal se estudia usando un microscopio de fase de contraste (a 1000X) y se clasifica de acuerdo a su integridad dada por la tinción utilizada. La facilidad del estudio de la integridad del acrosoma en los carnívoros no domésticos es específica de especie y depende de la ultraestructura del acrosoma (Howard, 1993). En ciertos mustélidos, como los hurones, el acrosoma se extiende anteriormente, bien definido por sobre el núcleo, por lo tanto este tipo de acrosoma es de fácil evaluación. En contraste, en los felinos no domésticos, el acrosoma no sobresale por encima del núcleo, haciendo más difícil su evaluación. Aunque el daño extremo del acrosoma en gatos, puede ser detectado con un microscopio de luz (1000X), pero la categorización de los daños sutiles es más dificultosa, por la pequeña configuración del acrosoma (Howard *et al.*, 1986; Howard, 1993). Las membranas acrosomales son especialmente sensibles al daño durante la congelación y descongelación, por eso el estudio del estado del acrosoma es un importante criterio para determinar las habilidades crioprotectoras de los métodos de congelación y diluyentes (Howard *et al.*, 1991).

Una característica seminal por sí sola no es una buena indicadora de la calidad de fertilización del semen; el porcentaje de motilidad espermática es probablemente el criterio de mayor importancia para establecer un potencial de fertilidad. Sin embargo, en el pasado se puso un insuficiente énfasis en la motilidad progresiva y la morfología espermática. El porcentaje de motilidad es un factor de importancia cuestionable si las células muestran un

movimiento circular o lento o sin progresión. Así mismo, el semen puede mostrar un buen movimiento progresivo, pero una alta incidencia de pleomorfismo, lo que incrementa la disminución de la calidad seminal y consecuentemente el potencial de fertilización (Howard *et al.*, 1986).

Es pequeño el conocimiento acerca de la conservación del semen de las especies no domésticas para optimizar la viabilidad antes de la congelación o inseminación artificial. El mantenimiento de la motilidad espermática *in vitro* está influenciado por numerosos factores, incluidas las condiciones de cultivo, la composición del medio, pH y temperatura. En muchas especies la viabilidad espermática está comprometida por los componentes del plasma seminal. La motilidad del semen sin diluir de los felinos no domésticos mantenido *in vitro* generalmente es de 2 horas o menos (Howard *et al.*, 1986; Howard, 1993). También, la motilidad espermática disminuye rápidamente cuando la muestra de semen está contaminada con orina, aunque la contaminación de este tipo puede ser usualmente detectada macroscópicamente por la coloración amarilla, pero la medición del pH es más efectiva para los volúmenes sutiles de orina (Howard *et al.*, 1986). La motilidad del semen fresco puede ser mejorada marcadamente al diluirlo con medios de cultivo de tejidos estándares, como el medio de cultivo HAM'S F-10 (Laboratorios Sigma-Aldrich). Después de la evaluación, se realiza una centrifugación lenta (600 g), que removerá el plasma seminal y prolongará significativamente la duración de la motilidad espermática (Howard, 1993). Como el eyaculado de los felinos contiene numerosos tipos de bacterias, lavados y remociones del plasma seminal son necesarios para eliminar los microorganismos previamente a la inseminación intrauterina (Howard *et al.*, 1992a, b).

El concepto de los bancos de semen de especies no domésticas es de considerable interés para los zoológicos modernos. El avance de las técnicas de la criopreservación de espermatozoides en las especies silvestres ofrece métodos que pueden ser utilizados en los animales silvestres. Sin embargo, se deben realizar investigaciones básicas para determinar los requisitos óptimos para los espermatozoides de cada especie. Ningún protocolo de

congelación es universal para todas las especies. Los efectos de los diferentes diluyentes sobre la supervivencia de los espermios se deben estudiar. Adicionalmente a este tipo de estudio, se deben comparar las diferentes técnicas de congelación y examinar las alteraciones estructurales y funcionales de las células después de la congelación y descongelación (Howard *et al.*, 1986). Estudios comparativos demostraron variaciones en los espermatozoides congelados y descongelados en su motilidad e integridad estructural en ungulados no domésticos, cuyos espermias fueron procesados con diferentes tipos de diluyentes y crioprotectores (Howard *et al.*, 1981). Por esto, parecería que un pre-requisito para establecer bancos de semen masivos de cualquier especie requiere de un análisis comparativo de los constituyentes del fluido seminal, de las necesidades de los espermatozoides específicas de especies y de los diluyentes crioprotectores que permitan una óptima descongelación (Howard *et al.*, 1986).

Las diferencias de las especies pueden ser expresadas más allá del nivel celular en términos de viabilidad y función. Uno de los recientes ejemplos es el Leopardo de las Nieves (*Panthera uncia*), cuyo semen tiene una intolerancia al medio de cultivo HAM'S F-10, perdiendo rápidamente su porcentaje de motilidad después de la obtención de un semen de alta calidad (Roth *et al.*, 1994), pero responde perfectamente en búfer fosfato salino (phosphate buffered saline, PBS), que mantiene un alto índice de motilidad espermática *in vitro* por casi 6 horas. Éste es el único medio específico de especie entre los felinos (Wildt *et al.*, 1995). El medio de cultivo para fertilización *in vitro* (IVF) es la elección para el gato doméstico, guepardo (*Acinonyx jubatus*) (Donoghue *et al.*, 1992), tigre (*Panthera tigris*) (Donoghue *et al.*, 1990), pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*) (Howard *et al.*, 1994), puma (*Felis concolor*) y león (*Panthera leo leo*) (Johnston *et al.*, 1991).

La tecnología de la reproducción asistida puede apoyar la reproducción natural gracias al manejo de la diversidad genética (Wildt *et al.*, 1992a, b, 1993). La colección de semen, el desarrollo de protocolos para la inseminación artificial, fertilización *in vitro*, transferencia de embriones y criopreservación de germoplasma son puntos esenciales para

la creación de bancos de genoma y la conservación de la diversidad genética (Swanson *et al.*, 1995, 2003), y ciertos aspectos de estas tecnologías están suficientemente avanzados para su aplicación en la actualidad. Por ejemplo, la laparoscopia para la inseminación artificial ha sido utilizada exitosamente en dos especies de felinos latinoamericanos, el puma (Barone *et al.*, 1994) y el ocelote, en el cual se realizó con semen congelado (Swanson *et al.*, 1995).

Influencia de la nutrición sobre la calidad reproductiva

El sistema reproductivo es un lujo para el organismo y las deficiencias nutricionales afectan probablemente a este sistema antes que a cualquier otro. El sistema reproductivo tiene como única función la supervivencia de la especie y, por consiguiente, cuando existe un estrés nutricional, o deficiencia, la reproducción se reduce o se elimina, para que el organismo conserve sus nutrientes (Threlfall y Lepine, 1996). Por lo tanto el factor más limitante para el éxito reproductivo en los mamíferos domésticos y silvestres es la nutrición. El estado nutricional regula la edad a la pubertad, eventos fisiológicos como el control del ciclo estral, eficiencias de fertilización, implantación, mantenimiento de la preñez y la duración del periodo anovulatorio post-parto (Williams, 1999). En la naturaleza, la habilidad del sistema reproductivo de responder a los cambios nutricionales es críticamente importante para la sobrevivencia bajo los cambios de las condiciones ambientales (Williams, 1999). En tiempos de abundancia, cuando los animales están en un balance energético positivo, son capaces de reproducirse, aún manteniendo otros procesos fisiológicos en sus niveles óptimos y teniendo calorías para almacenar los triglicéridos en forma de depósitos de tejido adiposo. Sin embargo, la habilidad de alimentarse y las demandas de energía pueden fluctuar drásticamente y, algunas veces, impredeciblemente. Cuando el gasto energético excede al consumo, durante el invierno o en periodos de carencia, la respuesta obvia del organismo es remover triglicéridos desde los adipocitos, acumulados cuando los alimentos eran abundantes; así, los constituyentes, glicerol y ácidos grasos, pueden ser oxidados para proveer energía. Los animales en balance energético

negativo reparten sus calorías restantes entre varios procesos que consumen energía de acuerdo con las prioridades, para maximizar las oportunidades de sobrevivir y optimizar a largo plazo el éxito reproductivo (Wade, 1999). En los periodos de escasez alimenticia, procesos fisiológicos como el mantenimiento celular básico y la función cardio-respiratoria no pueden ser comprometidos y deben ser mantenidos a cualquier costo. Otros procesos no esenciales para la supervivencia del individuo disminuyen uniformemente durante la carencia de alimentos. Un ejemplo de esto es el crecimiento en los animales jóvenes o la reproducción. Si la reproducción se intenta cuando la energía no es suficientemente abundante, será improbable que las crías sobrevivan, e incluso podría costarle la vida a la madre (Wade, 1999).

El control maestro para la reproducción en machos y hembras reside en el **hipotálamo**, que se caracteriza por poseer un oscilador neuronal que regula el tiempo y la pauta de descarga de la hormona liberadora de gonadotropinas (**GnRH**, por su nombre en inglés), desde un sector neuronal ampliamente disperso. Estas células tienen terminaciones que finalizan en la región del **núcleo arcuato** del hipotálamo medio basal y la descarga de la GnRH es dentro del sistema porta hipofisiario de la pituitaria anterior (Williams, 1999). La GnRH tiene una alta afinidad, por los receptores en la membrana de los gonadotrofos, lo que resulta en la síntesis, almacenaje y liberación de la hormona luteinizante (**LH**) y la hormona foliculo estimulante (**FSH**) hacia la circulación periférica (Williams, 1999).

El consumo de la energía dietaria y el metabolismo ejercen un profundo efecto sobre el sistema de comunicación neurohumoral, antes y después de la maduración sexual. (Williams, 1999). Un patrón de la GnRH es disminuir o aumentar la liberación de las gonadotropinas, dependiendo de la dirección que tomen los cambios de la energía metabólica (positivo o negativo) (Williams, 1999); probablemente existen una gran variedad de señales metabólicas que hacen redundar en la fuente metabólica que afecta el control de la secreción de GnRH y de las gonadotropinas (Williams, 1999).

En las hembras (género más estudiado), agudas y severas desnutriciones, casi inmediatamente (sólo bastan unas pocas horas) hacen decrecer la actividad secretoria de GnRH/LH, en especies monogástricas, mantenidas previamente en planos de nutrición normales (Williams, 1999). Sin embargo, algunas restricciones calóricas suprimen los niveles periféricos de LH en animales previamente bien nutridos. La realimentación resulta ser una buena acción para la rápida restauración de la secreción de LH; no obstante, en desnutriciones crónicas, cuando mucha grasa corporal es metabolizada, la realimentación no tienen el mismo efecto y su acción no será la inmediata restauración del flujo normal de secreción de gonadotropinas o de la actividad reproductiva. Por lo tanto, la condición corporal está en directa relación con el potencial de reproducción (Williams, 1999). Por ejemplo, la glucosa, tiene una gran importancia como señal metabólica para los tejidos neuroendócrinos, porque es el combustible primario para el cerebro, y frente a cambios en su concentración en el suero, las alteraciones que se producen son de la misma naturaleza y magnitud en el patrón de secreción de la LH, particularmente en especies monogástricas (Williams, 1999).

Una de las fallas más conspicuas por las restricciones nutricionales de energía y los balances energéticos en muchos mamíferos, incluyendo al hombre y las especies domésticas, es el dramático incremento de la **hormona de crecimiento (GH)** en la periferia y la caída de los niveles del **factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1)** (Williams, 1999), la GH juega un papel importante de mediación del efecto de la gonadotropina a nivel gonadal; no obstante, el eje de GH/IGF-1 no se completa durante los estados de desnutrición o mal balance energético severo (Williams, 1999).

Las restricciones de la energía dietaria retardan el crecimiento y la liberación pulsátil de la GnRH y LH; un régimen nutricional adecuado hasta la pubertad permite el establecimiento del peso corporal adecuado para el inicio de la pubertad (Williams, 1999).

Las restricciones de energía dietaria severas retrasan la pubertad en machos y hembras a través de mecanismos neuroendócrinos. Estas restricciones actúan al poco

tiempo de iniciadas y la supresión de la liberación pulsátil de LH coincide con el inicio de la pérdida de masa corporal, pero la secreción de LH puede volver a su normalidad con la recuperación de la adecuada nutrición, pero si la restricción de nutrientes se mantiene, causará una divergencia continua en la función testicular, con un efecto mayor sobre la masa testicular y la producción espermática por muchos meses. En toros una sobrealimentación cuando son jóvenes resulta en un impacto negativo en su desarrollo reproductivo futuro, reduciendo el tamaño testicular, retrasando la producción espermática y las reservas espermáticas epididimales. Esto ocurre por una infiltración de grasa en el parénquima testicular, lo que es un efecto similar al que ocurre con el tejido mamario en las hembras (Williams, 1999).

En los monogástricos, diez aminoácidos esenciales son elementos críticos en la nutrición proteica (Williams, 1999). Las deficiencias en este tipo de nutrientes en estas especies producen una reducción de la fertilidad, retrasando el inicio de la pubertad y disminuyendo las tasas de efectividad de preñez en los machos, aunque no está claro si el mecanismo de acción es por la inadecuada cantidad de proteínas en la dieta o que, como resultado de la deficiencia, se detienen el crecimiento y la maduración del animal (Williams, 1999). El exceso de proteínas también provoca algún tipo de fallas en la reproducción (fallas en la concepción, muerte embrionaria temprana), pero sus efectos son más sutiles y de difícil investigación (Williams, 1999).

La suplementación alimenticia es el factor más simple para controlar la reproducción. La disponibilidad de energía es inmediata y los efectos son directos en este sistema sobre las oportunidades de crianza y la conformación de la respuesta a las indicaciones de largo plazo para la reproducción estacional, como lo es el fotoperíodo. Por eso la alimentación sirve como el primer y último factor para la regulación de la fertilidad (Wade, 1999).

La infertilidad nutricional ha sido observada en todas las especies; se han estudiado desde un águila arpía hasta las ballenas incluyendo al humano. Este tipo de infertilidad se

puede manifestar de diferentes maneras, incluyendo el retraso en el inicio de la pubertad, la supresión del ciclo ovulatorio y del comportamiento del estro en animales adultos, la reducción en el desarrollo de la lactancia y una inhibición del comportamiento paternal (Wade, 1999). La causa más obvia de este tipo de infertilidad es la falta de alimentación, que puede ser involuntaria (durante la escasez de alimentos) o voluntaria (en caso de desórdenes alimenticios). Otra causa de este tipo de infertilidad, son los elevados niveles de consumo de energía, cuando no existe un incremento en la ingesta de alimentos correspondiente a las necesidades metabólicas. Esto se puede observar en los pequeños animales, cuyo consumo energético es menor a sus necesidades, debido a la relación del tamaño y volumen corporal, por lo que estos animales deben consumir alimentos muchas veces durante el día. Pero estas restricciones conducen al gasto de grandes cantidades de energía mientras no consumen alimentos, haciendo de ellos individuos particularmente más susceptibles a la infertilidad nutricional (por ejemplo, los animales silvestres en inviernos crudos donde la disponibilidad de alimento es menor) (Wade, 1999). La infertilidad nutricional no está invariablemente relacionada con los niveles absolutos de ingesta o consumo de energía, o al balance energético positivo o negativo o con algún aspecto del tamaño o composición del cuerpo, ya que pueden ser diferentes causas las que llevan a la falta de un equilibrio energético (obesidad, alteraciones metabólicas, fármacos que alteren algunas vías metabólicas, etc.). Más bien, a infertilidad nutricional está consistentemente asociada con una disminución en la habilidad de oxidar los metabolitos combustibles rápidamente, sin importar si las otras causas de infertilidad están o no presentes (Wade, 1999).

Todos los niveles del eje **hipofisario hipotalámico gonadal** (o hipotálamo pituitaria gonadal (HPG)) se ven afectados por la disponibilidad de los metabolitos combustibles, pero primariamente aparecen las disfunciones que enmascaran las deficiencias de GnRH a nivel hipotalámico. En animales privados de la ingesta de alimentos, la gametogénesis y esteroidogénesis gonadales están reducidas; sin embargo, en animales deprimidos tratados con gonadotropinas exógenas, los ovarios y testículos parecen

responder normalmente. Del mismo modo, la secreción de LH se ve suprimida cuando el combustible metabólico está disminuido, pero la pituitaria de animales despojados de sus alimentos responde con la secreción de niveles normales de LH cuando son estimulados con GnRH (Wade, 1999). Por esto, aunque la función pituitaria y gonadal están alteradas en la infertilidad nutricional, existe aún la habilidad de responder normalmente si se les provee de señales hormonales correctas (Wade, 1999).

Las alteraciones del uso de la energía metabólica también reducen el comportamiento reproductivo, como la copula y comportamiento paternal, entre otros; estos cambios se deben en parte a la disrupción de la secreción de las hormonas gonadales que actúan en el cerebro para inducir ese comportamiento. Sin embargo, existe también una disminución de la respuesta neuronal a las hormonas gonadales (Wade, 1999).

Dentro de las alteraciones que se producen por la falta de alimentación, existen unas producto de la falta de uno o más nutrientes específicos en algunos procesos fisiológicos. Las vitaminas son micronutrientes orgánicos esenciales que deben ser suplementados en la dieta. Lo que es considerado como vitaminas esenciales para algunas especies, para otras sólo algunos metabolitos son necesarios para sintetizar esas vitaminas en su organismo (Williams, 1999). La **vitamina A** y los **β -carotenos** son requeridos para la óptima eficiencia reproductiva (Dunn y Moss, 1992); el mecanismo de acción esta más relacionado a la liberación de GnRH, pero dentro de las actividades específicas inducidas por los retinoides se incluyen la mitosis, diferenciación celular, síntesis de ARN y proteínas, síntesis y sulfatación de esteroides (Ganguly *et al.*, 1980). Las uniones proteicas de retinoides están bien identificadas en el testículo, epidídimo distal, túbulo deferente, vesícula seminal y próstata. Una deficiencia de vitamina A o de sus precursores puede causar degeneración testicular (Virrey y Prival, 1966) y de las células germinales, observando que los túbulos seminíferos de ratas con dietas deficientes en vitamina A sólo contenían células de Sertoli, espermatogonias tipo A y unos pocos espermatoцитos en pre-leptoteno (Van Pelt y de Rooji, 1991). También está reportado que los animales con

deficiencias en vitamina A tienen menores niveles de testosterona (T4) y LH, posiblemente como resultado de los cambios lipídicos dentro de los testículos (los triglicéridos se depositan en las células de Leydig, de Sertoli y túbulos seminíferos) o por efecto directo sobre la pituitaria (Gambal, 1966). En ratas, la deficiencia de vitamina A produce reducción del tamaño testicular y fallas en la espermatogénesis y esteroidogénesis testicular (Ganguly *et al.*, 1980); también retrasa la pubertad y disminuye la libido (Erdman *et al.*, 1984). La deficiencia de **vitamina E** lleva a la degeneración del epitelio germinal del testículo (Scott 1978), incluso a una inhibición irreversible de la espermatogénesis (Wu *et al.*, 1973). También se asocia con alteraciones de liberación de la LH, la FSH, la testosterona o la inhibina (Cooper *et al.*, 1987). Otro de los procesos que regula la vitamina E es la producción de prostaglandinas, ya que controla a la fosfolipasa A, que es una pieza clave en el ciclo del ácido araquidónico, precursor de las prostaglandinas (Pappu *et al.*, 1978). Las deficiencias de **vitamina C** inhiben la esteroidogénesis en la glándula adrenal y sus niveles adecuados se asocian con la producción normal de espermatozoides (Threlfall *et al.*, 1996). La vitamina **B6 (piridoxinas)** está involucrada en la liberación de las gonadotropinas pituitarias y con la reducción de los sitios de unión en las gónadas (Wooten *et al.*, 1955), y las deficiencias de **niacina** llegan a producir involución gonadal (McDowel, 1989). Los antioxidantes como la vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico) y carotenoides pueden restaurar el balance prooxidante-antioxidante justo y mantener la integridad genética del espermatozoide previniendo el daño oxidativo del ADN espermático (Kodentsova *et al.*, 1994).

Los minerales son otro componente esencial en las dietas normales de los animales y los requerimientos varían de acuerdo al genotipo, estatus fisiológico y condiciones ambientales. Los macrominerales primarios juegan un papel importante en la reproducción; por ejemplo, el **fósforo** y **calcio**, actúan en la síntesis de esteroides dentro del testículo (Podestra *et al.*, 1980) y la máxima producción de testosterona en las células de Leydig *in vitro* es dependiente de calcio. Muchos microminerales también tienen un papel importante en la reproducción, como el **cobalto**, **cobre** y **yodo**, que frente a una deficiencia producen

una reducción en la liberación de gonadotropinas desde la pituitaria y disminuyen la libido y calidad seminal (Hignett, 1950; Maqsood, 1952). El **manganeso** afecta la síntesis de diferentes elementos que intervienen en la reproducción, como la producción de esteroides y el funcionamiento de órganos endócrinos (Hurley y Doane, 1989). El **selenio** se encuentra concentrado en la pieza media del espermatozoide y una deficiencia lleva a un desarrollo anormal de ésta, una desorganización de la vaina mitocondrial y decrecimiento en la producción espermática y el tamaño testicular (Brown y Burk, 1973; Wallace *et al*, 1983), y en ratas inhibe por completo la espermatogénesis (Wu *et al*, 1973). También se ha visto que con suplementación en el alimento, en conjunto con la **vitamina E**, mejora la motilidad y la morfología espermática (Julien y Murray, 1977; Scott *et al*, 1998; Verzina *et al*, 1996). El **zinc** está involucrado en la activación enzimática de la esteroidogénesis y actúa a través de las hormonas gonadotróficas o combinado con ligandos dentro de las gónadas o próstata; también estimula la producción de testosterona (Millar *et al*, 1958) y su entrada a la próstata (Apgar, 1985). Las deficiencias de zinc llevan a una atrofia del epitelio testicular (Miller *et al*, 1964; Millar *et al*, 1958), degeneración (Hafiez *et al*, 1990) y disminución del tamaño testicular, morfología anormal de los mismos, morfología anormal de las células espermáticas, reducción del número de espermatozoides en el eyaculado y reducción de la motilidad (Apgar, 1992; Williams, 1999); además, causa una reducción de la espermatogénesis y cambios en los ácidos grasos y lípidos testiculares (Bieri y Prival, 1966).

Existen tres ácidos grasos que los animales no pueden sintetizar en adecuadas cantidades y que son necesarios para mantener la normal integridad de las células y funciones fisiológicas. Estos son **linoleico**, **linolénico** y **araquidónico**. Estos ácidos grasos poli-insaturados se encuentran primordialmente en los aceites vegetales, los que sirven como excelente fuente dietaria. Los síntomas de deficiencia de ácidos grasos esenciales incluyen desórdenes en el balance de agua, dermatosis, pobre crecimiento y marcada reducción en la reproducción y desarrollo lactacional (Williams, 1999). El ácido linoleico es esencial para la cascada del ácido araquidónico, que concluye con la síntesis de

prostaglandinas. Las deficiencias en ácidos grasos esenciales en la dieta por dos años llevan a la degeneración testicular (Therfall y Lepine, 1996). Esto es muy importante en los gatos, ya que ellos no pueden convertir el linoleico en araquidónico, por lo que una deficiencia de este en la dieta llevaría a la degeneración testicular (MacDonald *et al.*, 1982). Estas deficiencias también deterioran la reproducción de otras maneras, incluyendo efectos en la libido y espermatogénesis en machos, así como la sobrevivencia embrionaria en las hembras (Williams, 1999). Una prolongada deficiencia dietaria de ácidos grasos esenciales disminuye las concentraciones de ácidos grasos en los testículos, pero los ácidos grasos esenciales normalmente son sintetizados a nivel testicular, excepto en deficiencias crónicas. Por ejemplo, conejos recibiendo una dieta sin grasas durante 14 semanas presentaron degeneración de los túbulos seminíferos y los espermatozoides nunca progresaron en su desarrollo más allá de espermatozocito secundario (Ahluwalia *et al.*, 1967).

Las proteínas son requeridas para la eficiencia óptima de la reproducción. El mecanismo de acción está en los niveles del hipotálamo por la intervención en la liberación de GnRH. La reducción de las proteínas en el alimento también demuestra ser responsable de la baja producción espermática (Therfall y Lepine, 1996). Las deficiencias proteicas del alimento interfieren con la reproducción más que nada por la falta de energía, llevando desde retrasos en el inicio de la pubertad hasta el poco desarrollo de los testículos en diferentes especies (Therfall y Lepine, 1996). Otros elementos importantes en la reproducción son el **glutamato** y el **aspartato**, ambos son aminoácidos ácidos, conocidos como aminoácidos excitadores y que tienen una actividad de neurotransmisor en el cerebro. El glutamato, el N-metil-D-aspartato y otros agonistas relacionados estimulan la secreción de LH cuando se infunden directamente dentro del flujo sanguíneo o en el sistema ventricular del cerebro (Williams, 1999).

Los felinos de zoológicos, por ser carnívoros, son alimentados con piezas de carne (de caballo, vacuno o de pollo), pero el músculo no es una dieta completa (Cuadro 2.1). Existe especialmente una limitación en calcio, pero también en otros nutrientes incluyendo

vitaminas A, D, E, folato, cobre y manganeso (Ullrey y Bernard, 1989). La exclusiva dependencia en la carne (sin complementos) como fuente alimenticia producirá un **hiperparatiroidismo nutricional secundario** (Fiennes y Graham-Jones, 1960; Krook *et al*, 1963; Palmer, 1968; Slusher *et al*, 1965), por eso sí los trozos de músculo son la base de la dieta será necesaria la complementación nutricional que supla los nutrientes deficientes de las dietas (Ullrey y Bernard, 1989). Como el consumo de materia seca dietaria de los gatos y otras especies es más probable que sea regulado por el ingreso de energía al organismo que por las otras necesidades del animal (National Research Council, 1987), una dieta rica en grasas sería consumida en pequeñas cantidades diariamente a diferencia de una dieta baja en grasas. De este modo, cuando los alimentos son ricos en grasa, presentan las mismas deficiencias que los alimentos bajos en grasa, debido al menor consumo de materia seca que se produce, por lo tanto, en ambos casos, sería necesario utilizar altos niveles de suplementación, para cumplir con los requerimientos de vitaminas y minerales del organismo (Ullrey y Bernard, 1989). Las deficiencias de calcio podrían ser suplidos con **carbonato de calcio**, pero con esto los niveles de fósforo serían marginales y la relación calcio-fósforo estaría en desequilibrio. Una óptima suplementación sería hecha usar un tercio de carbonato de calcio (39% calcio) y dos tercios de fosfato dicálcico (22 % calcio; 18% fósforo); esta mezcla tiene una proporción semejante a la del hueso (Ullrey y Bernard, 1989). También se recomienda utilizar una suplementación con algún complejo vitamínico para complementar la dieta con estos elementos y minerales (Ullrey y Bernard, 1989).

Como otros mamíferos, los gatos no pueden sintetizar ácidos grasos esenciales, como ácido linoleíco (18:2n6), sin embargo como otros mamíferos, el gato también tienen limitada capacidad para sintetizar ácido araquidónico (20:n6) desde ácido linoleíco y de la misma manera ácido ecosapentaenoio (20:5n3) y ácido docosahexaenoico (22:6n3) desde

Cuadro 2.1. Concentración de nutrientes en músculo esquelético de caballo y vacuno (en base seca), comparado con requerimientos nutricionales del gato doméstico (National Resarch Council, 1986) y de tablas alométricas del programa computacional ZODOOSE.

Nutriente	Caballo	Vacuno	Requerimientos de ocelotes	Requerimientos de gato doméstico
Materia Seca %	27	28	N/C	-
Proteína Cruda%	76	63	N/C	24
Extracto Etéreo %	18	29	N/C	-
Ceniza %	4	3	N/C	-
Arginina %	6.6	4.05	N/C	1
Histidina %	3.21	2.18	N/C	0.3
Isoleucina %	3.87	3.28	N/C	0.5
Leucina %	5.94	5.16	N/C	1.2
Lisina %	5.79	5.5	N/C	0.8
Metionina %	1.91	1.58	N/C	0.4
Metionina : Cistina %	N/D	2.38	N/C	0.75
Fenilalanina %	2.66	2.35	N/C	0,4
Fenilalanina-Tirosina %	N/D	4.49	N/C	85
Treonina %	3.36	2.78	N/C	0.7
Triptofano %	0.44	0.74	N/C	0.15
Valina %	4.02	3.49	N/C	0.6
Calcio %	0.05	0.03	0.91 – 1.82	0.8
Fósforo %	0.34	0.55	0.45 – 0.91	0.6
Magnesio %	0.05	0.06	0.091	0.04
Sodio %	0.19	0.17	0.32 – 0.45	0.05
Potasio %	1.1	1.01	1.091	0.4
Hierro mg/kg	232	78	18.2	8
Cobre mg/kg	3	2	0.1	5
Zinc mg/kg	128	106	8.55	50
Manganeso mg/kg	0.6	0.3	1.8	5
Selenio mg/kg	0.8	0,3	N/C	0.1
Vitamina A UI/kg	2593	1428	2728	3333
Vitamina D UI/kg	N/D	N/D	455 - 682	500
Vitamina E UI/kg	N/D	3	27	30
Tiamina mg/kg	4	2	1.8 – 7.3	5
Riboflavina mg/kg	6	5	1.8 – 3.6	4
Niacina mg/kg	185	143	7275 - 9093	40
Ácido Pantotenico mg/kg	N/D	18	5456 - 8184	5
Vitamina B 6 mg/kg	20	15	N/C	4
Folato µg/kg	100	128	227 - 455	800
Biotina µg/kg	N/D	N/D	91 - 182	70
Vitamina B 12 µg/kg	120	80	N/C	20

N/D: cantidad insuficiente para su detección

N/C: dato no conocido/ácido

α linoleico (18:3n3) (figura 1) (Bauer, 1997). Pero los felinos poseen una deficiencia en enzimas específicas como la Δ^6 **desaturasa** y la Δ^8 **desaturasa** (figura 2) que sirven para desaturar ácidos grasos, (Bauer, 1997; Davison y Traher, 1987); sin esta enzima, los animales no pueden realizar la conversión de ácido linoleico a ácido γ -linolénico, el cual además, se convierte en ácido araquidónico por elongación y por la enzima Δ^5 -**desaturasa**. Por eso los felinos tienen requerimientos dietarios específicos de ácidos grasos de cadena largas, especialmente de los insaturados que cumplen numerosos roles, como, el mantenimiento de las membranas celulares, producción de prostaglandinas, interacciones de célula-célula entre otras (Ullrey y Bernard, 1989).

La adecuada nutrición es un área creciente importancia en los programas de reproducción para felinos cautivos. En muchos casos, el bajo índice de reproducción es un indicador sensible de las deficiencias nutricionales y un aviso temprano del desarrollo de condiciones patológicas asociadas con la dieta. Los problemas nutricionales también juegan un papel fundamental en los trabajos de conservación, como en la creación de bancos genómicos, los cuales fallarían completamente si los animales en estudio son deficientes en los nutrientes esenciales, en especial los animales de vida libre, donde normalmente es difícil conseguir el alimento (Swanson *et al*, 1994b). Estudios realizados con pumas en Estados Unidos y Latinoamérica apoyan la teoría de la fuerte relación entre la nutrición y la función reproductiva de los machos. Se revisaron seis pumas alimentados solamente con cabezas y cuellos de pollo comparándolos con ellos mismos una vez cambiada su dieta por alimento comercial específico para felinos exóticos (Nebraska Felid Diet). El cambio de dieta mostró un gran efecto en la concentración espermática, ya que aumentó de 3.5×10^6 a 32.9×10^6 sperm/eyac ($P < 0.05$), aunque al comparar estos resultados con otras poblaciones de zoológicos ($n = 22$), estos fueron más bajos. Sin embargo, este estudio mostró que la calidad seminal es una importante herramienta para el diagnóstico temprano de fallas nutricionales (Swanson *et al*, 1994b). Otros datos con los que se cuentan en el mismo estudio son de 101 felinos de diferentes especies, diferentes zoológico y países; por lo

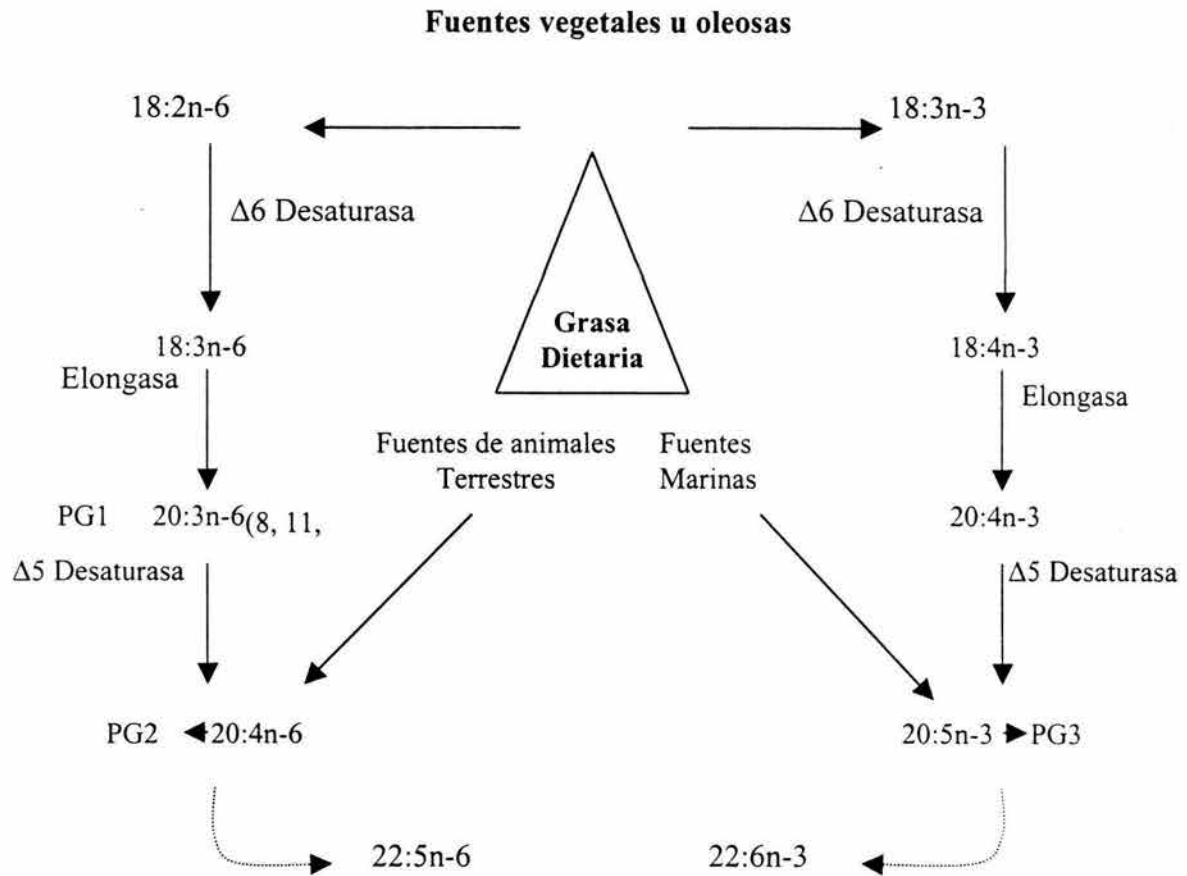


Figura 1: Vías predominantes en el metabolismo de ácidos grasos esenciales en mamíferos

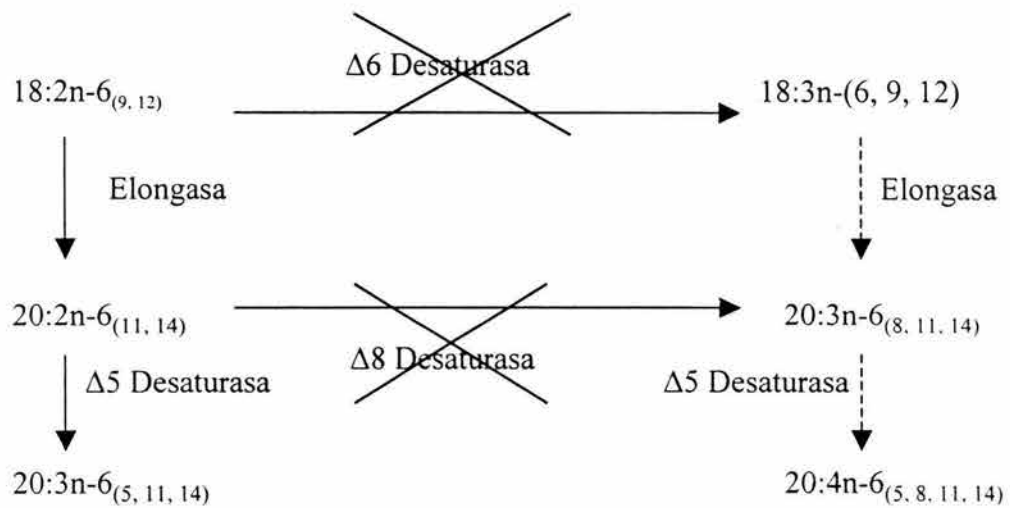


Figura 2: Vía metabólica del ácido linoleico en gatos

mismo tenían distintos manejos, dietas (la mayoría alimentados con carne roja de caballo o vacuno; sólo en 5 zoológicos suplementaban con canales completas, órganos y/o vitaminas y minerales) y encierros. De los 101 individuos sólo 25 fueron clasificados como reproductores comprobados (han producido al menos una cría). Los datos de las electroeyaculaciones fueron comparados con animales que vivían en E.U.A. y que eran suplementados, versus animales no-suplementados y las grandes diferencias se observaron en la concentración espermática. Por ejemplo, los ocelotes ($n = 9$) alimentados sólo con carne roja tuvieron 9.5×10^6 esperm/eyac, comparado con 28.5×10^6 esperm/eyac de los ocelotes suplementados¹ ($n = 7$) y contra los 76.8×10^6 esperm/eyac de los machos de la misma especie de los zoológicos de E.U.A. alimentados con Nebraska Felid Diet ($n = 8$). Aunque hay múltiples factores de manejos (dieta, diseño de exhibidores, interacción con el público, luz, estresores en general) que probablemente afectan la reproducción en los felinos machos, la relación entre la pobreza de las dietas y la baja reproducción apoya la percepción de que la nutrición es vital para el éxito reproductivo de los felinos machos (Swanson *et al*, 1995). Además, si se combina con el estrés, estos dos serían los factores más importantes que afectan la reproducción en los zoológicos de Latinoamérica. Afortunadamente, estos factores se pueden corregir. La suplementación nutricional de todas las dietas de carne con multivitamínicos (Cuadro 2.2) y mezclas de calcio son una gran herramienta para complementar las carencias de este tipo de dieta (Ullrey y Bernard, 1989). Otras recomendaciones son las que deben realizarse en los manejos de los animales, especialmente en los pequeños felinos (Carlstead *et al*, 1993; Mellen, 1991), que son las especies más afectadas por el estrés causado por las condiciones de encierro (Swanson *et al*, 1995).

¹ Suplementación con media tableta de CENTRUM® Multivitamínico, según Studbook de Ocelote (AZAA)

Cuadro 2.2 Contenido nutricional de una tableta de CENTRUM® Multivitamínico.

Vitamina A	5000 UI
Vitamina C	60 mg
Vitamina D	400 UI
Vitamina E	30 UI
Vitamina K	25 µg
Tiamina	1.5 mg
Riboflavina	1.7 mg
Niacina	20 mg
Vitamina B 6	2 mg
Ácido Fólico	400 µg
Vitamina B 12	6 µg
Biotina	30 µg
Ácido Pantoténico	10 mg
Calcio	162 mg
Hierro	18 mg
Fósforo	109 mg

Yodo	150 µg
Magnesio	100 mg
Zinc	15 mg
Selenio	20 µg
Manganeso	2 mg
Cobre	2 mg
Cromo	120 µg
Molibdeno	75 µg
Cloruro	72 mg
Potasio	80 mg
Boro	150 µg
Níquel	5 µg
Silicón	2 mg
Estaño	10 µg
Vanadio	10 µg
Lutenio	250 µg

Efecto del estrés sobre la reproducción

“El estrés es el reconocimiento del organismo frente a un estresor y, por lo tanto, un estado de homeostasis amenazada; los estresores son amenazas continuas a la homeostasis y las respuestas adaptativas son los intentos del cuerpo por contrarrestar el estresor y reestablecer la homeostasis” (Chrousos *et al*, 1998)

Estrés es una respuesta acumulativa resultado de la interacción de los animales con el ambiente a través de los receptores (Selye, 1973). Todas las respuestas son primeramente dirigidas hacia los cambios ambientales y los repertorios de comportamiento serían dependientes de la interacción estresante del animal con su ambiente (Fowler, 1986). Los procedimientos de contención constituyen uno de los eventos más estresantes en la vida de un animal y la intensidad o duración del estímulo puede inducir una respuesta perjudicial (Fowler, 1986).

Un estresor puede ser clasificado como somático, psicológico, de comportamiento y misceláneo (Fowler, 1986). Un animal es estimulado por estos cambios ambientales a través de sus receptores (Selye, 1973) y el sistema nervioso analiza y procesa los impulsos desde los receptores, suministrando respuestas que regresan a través de diferentes componentes del sistema nervioso hasta el órgano efector, que producirá una reacción específica o no-específica o ambas (Fowler, 1986).

Los estresores somáticos incluyen sonidos, visiones y olores extraños; contacto físico inesperado; cambios en posición, calor, frío y presión; estiramientos anormales de músculos y tendones y efectos de químicos o drogas (Fowler, 1986).

Los estresores psicológicos juegan un papel importante en la adaptación de las especies silvestres a los ambientes cautivos y a las prácticas de contención. La aprehensión es un suave estresor psicológico que se intensificará para después comenzar con ansiedad, miedo o, en formas más severas, terror incluso. Algunos animales llegan a enfurecerse. La frustración también es un estresor psicológico para los animales bajo cautiverio (Fowler, 1986).

Estrechamente relacionados con los estresores psicológicos impuestos por la contención, están muchos estresores de comportamiento, como un entorno no familiar, sobrepoblación, desorden territorial o jerárquico, cambios en los ritmos biológicos, falta de contacto social (o al revés, falta de aislamiento) y falla en la obtención de los alimentos habituales (Fowler, 1986).

Los estresores misceláneos incluyen mala nutrición, toxinas, parásitos, agentes infecciosos, quemaduras, cirugías, inmovilizaciones químicas o físicas y confinamientos. Estos factores son los que actúan sobre un largo periodo de tiempo y contribuyen a un estado de agotamiento del síndrome general de adaptación (Selye, 1973). Un choque adrenal fatal sería provocado si un animal que está en una inminente fase de agotamiento es

sujeto a un procedimiento de contención, lo que esforzaría demasiado al individuo acabando con las reservas corporales de energía (Fowler, 1986).

Cada reacción ante un estresor tiene un impacto en la adaptación del organismo. Las reacciones llevan a un extremo, pudiendo llegar a ser una respuesta perjudicial y provocaría una respuesta potencialmente fatal en el animal (Fowler, 1986).

Cuando un estresor interrumpe la homeostasis fisiológica, en un individuo típico se desencadena una respuesta al estrés. La **respuesta al estrés** es una mezcla de respuestas fisiológicas y comportamientos que ayudan a reestablecer la homeostasis. La respuesta al estrés es relativamente no-específica; diferentes estresores provocan una respuesta al estrés similar (Selye, 1950). Dos sistemas endócrinos constituyen los mayores componentes de la respuesta al estrés, uno involucra a la epinefrina (adrenalina) de la médula adrenal y el otro involucra a los glucocorticoides de la corteza adrenal (Stratakis y Chrousos, 1995). Segundos después de percibir el estresor, el sistema nervioso simpático comienza a secretar nor-epinefrina y ambas médulas adrenales comienzan a liberar epinefrina (Nelson, 2000). Las catecolaminas (nor-epinefrina y epinefrina) trabajan a través de diferentes mecanismos, incrementando los niveles de glucosa sanguínea, preparando al organismo para incrementar la energía necesaria para huir o pelear como una respuesta. Otra forma de respuesta al estrés es a través de el eje **hipotalámico-pituitario-gonadal** (eje **HPG**), que una vez activado frente al estrés libera **factor liberador de corticotropina (CRF)** y **hormona adrenocorticotropica (ACTH)** y **glucocorticoides** (Nelson, 2000). En los primeros minutos de ataque del estresor, la corteza adrenal comienza a secretar glucocorticoides (por ejemplo, en muchos roedores, aves y reptiles se libera corticosterona; en primates y carnívoros, cortisol). Virtualmente, ante cualquier estresor la respuesta es de glucocorticoides y epinefrina (Stratakis y Chrousos, 1995). A los minutos de acción la corteza adrenal comienza a secretar glucocorticoides y muchas otras hormonas incluyendo, **prolactina, glucagón, hormona tiroidea y vasopresina**, desde varios órganos endócrinos.

La respuesta al estrés tiene muchos efectos adaptativos, que finalizan una vez terminada la emergencia, como (Nelson, 2000):

- Incremento inmediato de la disponibilidad de energía
- Incremento del consumo de oxígeno
- Disminución del flujo sanguíneo hacia áreas no necesarias para los movimientos
- Inhibición de la digestión, crecimiento, función inmune, reproducción y percepción dolorosa (actividades energéticamente demandantes).
- Incremento de la memoria y función sensorial.

Los glucocorticoides que son secretados en los primeros minutos afectan las vías metabólicas que aseguran que la energía adecuada esté disponible para que el individuo haga frente al incremento necesario del combustible metabólico (Nelson, 2000).

El **CRF** es liberado desde el hipotálamo, minutos después de la percepción del estresor; viaja por la glándula pituitaria anterior, donde estimula células específicas secretoras de **ACTH**, que entra a la circulación sanguínea general y provoca que la corteza adrenal produzca y secrete glucocorticoides (Balm, 1991). La glándula pituitaria anterior también secreta prolactina, que actúa en la respuesta al estrés suprimiendo la reproducción temporalmente por la acción sobre múltiples sitios en el eje HPG (Van De Kar *et al*, 1991). Las endorfinas y las encefalinas son liberadas para proveer alivio al dolor; estas hormonas también suprimen a la **GnRH**, con lo cual se inhibe la función reproductiva. Con esto todos los procesos que están involucrados en la sobrevivencia futura o éxito de la reproducción (por ejemplo, almacenaje de energía como grasa, producción de gametos, crecimiento) son detenidos hasta cuando mejoren las condiciones (Sapolsky, 1994).

El efecto patológico del estrés crónico involucra los sistemas cardiovascular, metabólico, reproductivo, digestivo, inmune y procesos anabólicos (Sapolsky, 1992, 1994; Brown, 1994). Con prolongadas secreciones de glucocorticoides se producen miopatías

inevitables (pérdida de la masa muscular) y en casos severos de estrés se puede inducir a pérdidas irreversibles de células musculares del corazón. En la función reproductiva también se inhiben procesos por los altos niveles de glucocorticoides; esto tiene obvias consecuencias negativas en el éxito reproductivo de los animales silvestres que viven en cautiverio sin las condiciones ambientales adecuadas (Nelson, 2000).

Consecuentemente, existe una desviación de la energía requerida para el crecimiento o función inmune para mantener la reproducción aun cuando la energía esté un poco restringida (Ots y Horak, 1996). Alternativamente, la reproducción o la función inmune estaría comprometida cuando la disponibilidad de energía esté significativamente reducida (Nelson, 2000). La supresión de la reproducción en la respuesta al estrés ocurre en muchos niveles fisiológicos y de comportamiento y puede tener severos efectos en animales y humanos (Welch *et al*, 1999).

En los machos el estrés inhibe la producción de testosterona y la baja concentración de testosterona reduce la motivación y el desarrollo sexual. La liberación de CRF y los opioides endógenos pueden suprimir directamente la liberación de GnRH (Hulse y Coleman, 1983; Jacobs y Lightman, 1980; Rasmussen *et al*, 1983; Rivier *et al*, 1986). Las neuronas que contienen CRF en el núcleo paraventricular del hipotálamo están clasificadas en dos tipos: 1) positivas a vasopresina y 2) negativas a vasopresina. El estrés causa que ciertos neurotransmisores provoquen la liberación de CRF desde ambos tipos de neuronas y las neuronas positivas a vasopresina liberan vasopresina. El CRF viaja a la pituitaria anterior, donde se une a una proteína G específica en las células liberadoras de ACTH. La activación de los receptores de CRF estimula la vía de la **protein-cinasa A**, y como este factor y sus receptores han sido identificados en los testículos y los ovarios, esta liberación de hormonas estaría directamente inhibiendo la producción de esteroides gonadales (Welsh *et al*, 1999). En el cerebro la vasopresina se une a los receptores específicos (V_{1A}), los cuales también activan la vía de **protein-cinasa C** (Nelson 2000).

La CRF y la vasopresina pueden estimular la expresión de los genes para los **pro-opiomelanocorticoideos (POMC)** en la pituitaria anterior; los péptidos derivados de POMC retroalimentarían la inhibición de la secreción de GnRH (Welsh *et al*, 1999); por ejemplo, los opioides endógenos y exógenos pueden inhibir la secreción de GnRH (Cameron, 1997).

La ACTH estimula la producción y secreción de glucocorticoides desde la zona fascicular y la zona reticular de la corteza adrenal. Los glucocorticoides pueden inhibir la reproducción en varias formas. Primero, los glucocorticoides suprimen la secreción de GnRH, LH y FSH por medio de la retroalimentación negativa (Welsh *et al*, 1999). Los glucocorticoides también han sido reportados como inhibidores de la formación de las proteínas necesarias para la formación de receptores hormonales, enzimas esteroideogénicas y muchas señales moleculares intracelulares (Rivier y Rivest, 1991). El cortisol inhibe la secreción de testosterona en el hombre (Cumming *et al*, 1983) por acción en los receptores de LH en el testículo (Bambino y Hseuh, 1981). Los glucocorticoides también suprimen un poco la espermatogénesis directamente; las células de Leydig (encargada de la síntesis de testosterona) tienen receptores de glucocorticoides, que al parecer están involucrados en el proceso normal de crecimiento celular, metabolismo y uso de la energía. Sin embargo, cuando las concentraciones de glucocorticoides se incrementan por un largo periodo de tiempo, la enzima que los neutraliza hasta los niveles basales es abrumada y la producción de testosterona se detiene (Gao *et al.*, 1997). El resultado de esta baja concentración de testosterona hace fallar la espermatogénesis y por lo tanto, disminuye la concentración espermática en los individuos estresados llevándolos hasta la esterilidad (Gao *et al.*, 1997), especialmente si los individuos son subordinados. En contraste, cuando son dominantes, los individuos viven en una condición de estrés constante, pero con niveles de testosterona elevados. Esto puede deberse a que los individuos dominantes tienen altos niveles de enzimas que contrarrestan las elevadas concentraciones de glucocorticoides para asegurar la fertilidad (Monder *et al*, 1994). Es decir, que el estatus social parece afectar las enzimas testiculares que median la producción de andrógenos y la fertilidad (Nelson, 2000). Otro producto que es liberado gracias al estrés es la prolactina, cuyas elevadas concentraciones

en el flujo sanguíneo pueden inhibir la función reproductiva en los machos de diferentes maneras, incluyendo el aumento de la sensibilidad a la retroalimentación negativa de la testosterona (Bartke *et al*, 1977 a, b; McNeilly *et al*, 1983).

Aunque algunos tipos de estresores pueden causar una reducción en la secreción de gonadotropinas hipofisarias, lo cual contribuye a la disminución de los andrógenos circulantes producto del estrés (Armario y Castellanos, 1984), los corticoides también actúan directamente en los testículos reduciendo la producción de andrógenos por la inhibición de la esteroidogénesis o por la reducción de la cantidad de receptores de LH en los testículos (Bambino y Hsueh, 1981; Fenske, 1997; Hales y Payne, 1989). El mecanismo por el cual la producción testicular de andrógenos es modificada durante el estrés depende de la naturaleza del estresor. En ratas sujetas a inmovilizaciones agudas estresantes, se presenta una disminución significativa en los niveles circulantes de testosterona y dihidrotestosterona (DHT), sin una disminución concomitante de los niveles plasmáticos de andrógenos y LH (Maric *et al*, 1996). En este caso, la actividad testicular de 3 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa fue disminuida y la habilidad de la gonadotropina coriónica humana (HCG) para estimular la producción de esteroides en la célula de Leydig se redujo. En contraste, otros estudios han reportado que la exposición a estresores agudos causa elevaciones de los niveles sanguíneos de andrógenos, mientras que los estímulos del estrés crónico deprimen los niveles circulantes. El cortisol aparentemente estimula y no deprime la producción de testosterona en las células de Leydig en los cerdos (Li, 1991).

La abundancia relativa de varias enzimas metabolizantes de esteroides entre los tejidos gonadales tendría un papel en la determinación del impacto de la elevación de los niveles de corticoides en la función gonadal. La enzima 11 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa, que en los testículos primeramente oxida los corticosteroides a la forma funcionalmente inactiva (Gao *et al*, 1997), está presente en los testículos de las ratas subordinadas socialmente (producto de un estrés crónico) en concentraciones significativamente menores que en los testículos de los animales dominantes o sin el

estresor crónico (Monder *et al.*, 1994a); lo que lleva a la suposición que la producción de testosterona es más vulnerable a la interferencia de corticosteroides en los animales estresados (Monder *et al.*, 1994b). Esto también ha sido demostrado en animales no estresados, los cuales presentan niveles fisiológicos de corticosteroides, que ejercen un control tónico negativo directo sobre la esteroidogénesis de las células de Leydig e inducen a la actividad intracelular de la 11 β -hidroxiesteroide dihidrogenasa, la cual ofrece una protección contra la inhibición de la producción de testosterona mediada por los corticosteroides bajo condiciones de no estrés (Gao *et al.*, 1996).

El CRF es secretado por las células de Leydig y actúa en oposición a la influencia de la LH; también estimula la secreción de β -endorfinas desde las mismas células y las que actúan en contra del efecto de la FSH en las células de Sertoli. Vale decir que el CRF posee un efecto anti reproductivo (Dufau *et al.*, 1993). Sin embargo, en el ratón, en contraste con la rata, el CRF fue reportado como estimulador directo de la producción de testosterona en las células de Leydig (Huang *et al.*, 1995). Las células de Leydig del ratón expresan un **CRF-R1**, que es mediador de la elevación de la producción de testosterona por agonismo del CRF a través del AMPc (Heinrich *et al.*, 1998).

Otro efecto de los estresores agudos es la reducción de los niveles de andrógenos sanguíneos por la interrupción de los niveles de LH (Orr *et al.*, 1994; Maric *et al.*, 1996). Los opioides péptidos endógenos junto con los corticosteroides son potencialmente moduladores importantes de la esteroidogénesis testicular bajo las condiciones de estrés, ya que los receptores antagonistas de opioides normalizan los niveles de testosterona en las ratas inmovilizadas, que se oponen al efecto inhibitorio del estrés de inmovilización de la 3 β -hidroxiesteroide dihidrogenasa y la P450_{17 α} liasa (Kostic *et al.*, 1997).

En resumen (Balm, 1999) - Los corticoides pueden actuar directamente en los testículos reduciendo la esteroidogénesis y alterando la abundancia de receptores de LH.

- Se han reportado altos niveles de andrógenos en la sangre después de estresores agudos.
- El efecto del estrés sobre la función testicular estará determinada por la duración del estresor.
- La actividad de las enzimas metabolizantes de esteroides en las células de Leydig están moduladas por el estrés.
- El CRF de origen testicular tiene efecto supresor o estimulador en la función testicular, dependiendo de la especie.
- Los péptidos opioides se oponen al efecto inhibitorio del estrés en la función testicular.

Estudios reproductivos no invasivos por medio de monitoreo hormonal fecal.

La limitada información disponible ha permitido entender las funciones básicas de la reproducción de los felinos. Estudios sistemáticos de la fisiología reproductiva de los felinos comenzaron a mediados de 1970, con más énfasis en el gato doméstico mantenido bajo condiciones de laboratorio (Goodrowe *et al.*, 1989; Wildt *et al.*, 1991). Las investigaciones estuvieron enfocadas a las bases del ciclo reproductivo de las hembras y las características espermáticas de los machos, desarrollo de tratamientos con gonadotropinas exógenas para inducir la ovulación y la aplicación de técnicas de reproducción asistida, como inseminación artificial. A principios de los 80's, la posibilidad de conducir investigaciones manipulando especies de felinos silvestres fue explorada. Más estudios fueron enfocados a felinos mantenidos en zoológicos, con el fin de describir las características semen/espermatozoides (Wildt *et al.*, 1983, 1984, 1986a, 1987a, b; 1988) y la descripción de la actividad ovárica, usando laparoscopia después de tratamiento con gonadotropinas exógenas (Bush *et al.*, 1980; Phillips *et al.*, 1982; Wildt *et al.*, 1978, 1979, 1981). Estos primeros esfuerzos demostraron la importancia de los datos fisiológicos y que pueden ser obtenidos desde los felinos silvestres sin comprometer el bienestar del animal, e indirectamente los datos pueden ser usados para la aplicación de técnicas de reproducción

asistida. Rápidamente comenzó a ser evidente que los mecanismos de regulación fisiológica de la reproducción en gatos es tan diversa dentro de los fenotipos como en el taxón (Wildt *et al.*, 1992a, b). Por la complejidad que implica el manejo de los felinos silvestres, los estudios requieren de un esfuerzo extraordinario (Brown y Wildt, 1997). Más importante, es que estas especies no resisten fácilmente las frecuentes contenciones o anestias requeridas para la correcta recolección de sangre, en un número suficiente de muestras para obtener la información fisiológica necesaria (Brown y Wildt, 1997). Las manipulaciones de los animales también alteran los resultados de los análisis de las hormonales de las glándulas adrenales, producto del estrés inducido por la manipulación del animal y esto puede alterar la liberación de hormonas reproductivas y su función (Moberg, 1985).

En la década de los 80, fue demostrado que la actividad reproductiva de los animales podía ser medida en los metabolitos hormonales evacuados en orina y/o heces (Lasley y Kirkpatrick, 1991; Shille *et al.* 1984, 1990). En esa época se determinó que la mayoría de los estrógenos endógenos de los gatos domésticos son excretados en el excremento y no en la orina, lo que explicó las fallas de los estudios anteriores, que trataron de describir los esteroides por medio de orina. Posterior a esto se reportaron evidencias de cuantificación de metabolitos de estrógenos y/o progesteronas en heces de felinos no domésticos como guepardo (*Acinonyx jubatus*), tigre (*Pantera tigris*), león (*Pantera leo leo*), caracal (*Caracal caracal*), serval (*Leptailurus serval*), lince (*Felis linx*) (Czekala *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 1995; Shille *et al.*, 1991).

Péptidos, proteínas y hormonas glicoproteicas son componentes elementales en los diferentes procesos reproductivos y aunque también son excretados como metabolitos reconocibles, la especificidad en la síntesis entre las diferentes especies limita una aplicación con los actuales métodos de análisis (Lasley y Shideler, 1993) No obstante, en algunos ensayos se han determinado restos bioactivos de hormonas proteicas, tales como LH y FSH. Sin embargo, la complejidad del método hace limitado su uso en procedimientos y evaluaciones de rutina. De este modo, la mayoría de los trabajos centran

sus objetivos en la determinación analítica de los metabolitos de las hormonas esteroidales (Lasley y Shideler, 1993). Entre los inconvenientes que supone la detección de metabolitos de esteroides en heces, se encuentran las posibles variaciones dependientes de la dieta (Wasser *et al.*, 1996). Por otro lado, diferentes experiencias que comparan los valores de esteroides fecales y plasmáticos durante el ciclo indican la existencia de un retraso de alrededor de dos horas en las concentraciones fecales respecto a las plasmáticas (Wasser *et al.*, 1996).

La tecnología del radioinmunoanálisis (**RIA**) permite el análisis de muchos aspectos de la función reproductiva. Comercialmente existen kits de RIA de razonable exactitud para la medición de los esteroides circulantes, incluyendo testosterona, estradiol, progesterona y cortisol. En contraste, debido a que algunas hormonas son específicas para la especie, la medición de aquéllas de origen proteico (por ejemplo, gonadotropinas) es más difícil, requiriendo para ello de alta tecnología y a menudo sistemas heterólogos desarrollados a través de validación de procedimientos de laboratorio (Wildt *et al.*, 1996). Algunas investigaciones continuas dentro de los acercamientos evaluativos incluyen el **ensayo de unión enzimática inmunoabsorbente (ELISA)**, el **inmunoensayo enzimático (EIA)** y el **inmunoensayo fluorescente (FIA)**, métodos que son económicos y fáciles de implementar en varios zoológicos, una vez hechas las instalaciones del equipo inicial que es más costoso (Wildt *et al.*, 1996).

Anestias ocasionales para la obtención de muestras sanguíneas no afectan el potencial reproductivo en forma adversa, pero la dinámica secretora hormonal (amplitud y frecuencia de pulsos) puede ser alterada temporalmente por drogas anestésicas específicas (Clarke y Doughton, 1983; Fuller *et al.*, 1984; Johnson y Gay, 1981; Lawson, 1985); además, los anestésicos pueden interferir o bloquear la ovulación en los gatos domésticos (Howard *et al.*, 1992b), por lo que la anestesia de las hembras en las fechas peri-ovulatorias con fines de recolección de sangre para estudios hormonales está contraindicada, porque los datos probablemente salgan alterados (Brown y Wildt, 1997). Por lo tanto, la primera

ventaja del monitoreo de los metabolitos hormonales fecales es que la técnica es completamente no invasiva porque los datos pueden ser recolectados sin sedar o contener a los animales. La secreción natural de las hormonas es dinámica y los niveles circulantes fluctúan marcadamente, algunas veces, incluso en minutos; por lo tanto, en una muestra sanguínea podríamos tener el punto más bajo, un pico extremo o un punto medio de los pulsos de secreción. En contraste, la muestra fecal representa la excreción de metabolitos hormonales sobre un periodo de horas (Brown y Wildt, 1997). Por lo tanto las menores oscilaciones nos dan la habilidad de distinguir entre las dinámicas secretorias normales y una respuesta fisiológica genuina. Otra ventaja de este tipo de estudios radica en el número de muestras que se pueden obtener para la investigación, ya que al utilizar el excremento para el análisis no hay restricciones por la manipulación de los animales y la recolección puede ser realizada por sus cuidadores durante las tareas diarias de limpieza, por lo tanto el número de muestras dependerá de los requerimientos del investigador, lo que permite realizar estudios longitudinales de la actividad reproductiva y caracterizar claramente el estado gonadal para cualquier individuo, población o especie (Brown y Wildt, 1997).

Los monitoreos reproductivos no invasivos en especies no domésticas fueron originalmente desarrollados para determinar estrógenos en orina (Lasley y Kirkpatrick, 1991). Aparte de los reportes de evaluación de esteroides en excremento para la determinación de sexo en aves monomórficas, el primer reporte de análisis de esteroides en heces fue para describir la presencia de estrógenos en mujeres gestantes (Adlerkreutz y Martin, 1976) y en animales de granja (Möstl *et al.*, 1983 citado por Schwarzenberger *et al.*, 1996; Möstl *et al.*, 1984; Bamberg *et al.*, 1984; Bamberg *et al.*, 1986 citado por Schwarzenberger *et al.*, 1996; Choi, 1987 citado por Schwarzenberger *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 1985; Choi *et al.*, 1987). Los metabolitos fecales de testosterona fueron analizados para estudios de estacionalidad y dominancia social (Flood *et al.*, 1992) y análisis de estrógenos y testosterona fueron usados para determinar el sexo de pandas gigantes adultos (Kubokawa *et al.*, 1992). Los patrones de excreción de los andrógenos han sido estudiados durante la

pubertad, antes y después de la castración de los caprinos domésticos (Palme y Möstl, 1993).

La administración de hormonas esteroidales radioactivamente marcadas en especies domésticas y no domésticas ha sido muy usada para determinar las rutas de excreción, tiempo de curso de excreción y tipo de metabolito o producto final de esteroides en orina y heces (Schwarzenberger *et al.*, 1996).

Para el estudio de la fisiología del estrés también han sido aplicadas diferentes medidas no invasivas para el manejo de vida silvestre, biología de la conservación, ecología del comportamiento, biomedicina y manejo de animales (Wasser *et al.*, 2000). Las mediciones de metabolitos de glucocorticoides fecales reflejan las respuestas adrenales ante diferentes estresores (Creel *et al.*, 1997; Foley *et al.*, 2000; Goymann *et al.*, 1999; Millspaugh, 1999 citado por Wasser *et al.*, 2000; Wasser *et al.*, 1997; Wingfield, 1994; Wingfield *et al.*, 1997). Los estudios de glucocorticoides fecales han demostrado tener un valor predictivo y explicativo; también consistentemente han mostrado elevaciones en la actividad adrenal después de presuntos eventos de estrés fisiológico o psicológico (Goymann *et al.*, 1999; Morrow, 1999; Palme *et al.*, 2000; Terio y Brown, 2000), recuperación de anestesia (Morrow, 1999; Whitten *et al.*, 1998), degradación ambiental (Wasser *et al.*, 1997), interacción agresiva (Goymann *et al.*, 1999) y otros estresores sociales (Kotrschal *et al.*, 1998; Monfort *et al.*, 1998).

Debido al aumento del número de especies de felinos no domésticos que han sido incluidos en las listas internacionales como especies amenazadas o en peligro de extinción, la reproducción en cautiverio comenzó a jugar un papel esencial en el manejo y conservación de dichas especies. Desafortunadamente, la propagación de felinos en cautiverio tiene diferentes fallas, que están afectando su reproducción (Mellen 1991; Wildt, 1990; Wildt *et al.*, 1991). El conocimiento de la biología reproductiva de las especies, es sin duda un punto necesario en los felinos machos, esto entregaría información comparable,

que permitirá observar cómo diferentes factores influyen en la función testicular (Brown *et al.*, 1996). Este tipo de conocimientos es vital para la planeación e implementación de bancos de criopreservación genética, que puedan ser usados en las estrategias de reproducción asistida. Estos estudios se pueden llevar a cabo porque los metabolitos de excreción de los esteroides de reproducción y estrés son eliminados principalmente por las heces en los felinos (Brown *et al.*, 1994; Graham y Brown, 1996). Más del 80 % de la testosterona metabolizada en heces ocurre como no-hidrolizada, en forma no soluble, de manera similar a lo observado en otros metabolitos de esteroides del gato doméstico (progesterona (Brown *et al.*, 1994), cortisol (Graham y Brown, 1996)).

Los estudios de testosterona son usados para la identificación de machos sexualmente maduros (pubertad), deficiencias de gonadotropinas pituitarias y disfunciones profundas de la actividad de las células de Leydig; además, elevadas concentraciones de testosterona pueden indicar la presencia de un tumor de células intersticiales (Wildt, 1996). Este tipo de estudios también permiten correlacionar la concentración de testosterona con la calidad de semen, sin embargo, machos con altas concentraciones de testosterona no necesariamente producen alta calidad de eyaculado (Brown *et al.*, 1991a; Lincoln 1979; Malak y Thibier, 1982; Noci *et al.*, 1985; Resko, 1982; Wildt *et al.*, 1984). Cuando múltiples valores son medidos en sangre, a través del tiempo, entre y dentro de especies cercanamente relacionadas, interesantes comparaciones y diferencias evolutivas son reveladas. Por ejemplo, los niveles basales de testosterona entre los felinos, aunque están consistentemente relacionados dentro de las especies dadas, varían significativamente entre las especies y usualmente no están relacionados a más características individuales de la calidad seminal (Wildt *et al.*, 1987b; 1988; Brown *et al.*, 1991a). Una excepción es la posible relación inversa entre la depresión crónica y la producción de pleomorfismo o espermatozoides de estructura anormal (Wildt, 1996); frecuentemente, especies de felinos, subespecies o poblaciones que producen comparativamente bajas cantidades de testosterona circulante también eyaculan comparativamente alto número de espermatozoides con malformaciones (Wildt *et al.*, 1988).

El análisis del cortisol urinario es conocido como una herramienta usada en la evaluación de la respuesta adrenal al estrés psicológico y fisiológico en múltiples especies (Crockett *et al.*, 1993; Friedman *et al.*, 1963; Jones *et al.*, 1990; Madej *et al.*, 1992; Mason *et al.*, 1957; Miller *et al.*, 1991; Saltz *et al.*, 1992), incluyendo felinos (Carlstead *et al.*, 1992; 1993). La excreción del cortisol urinario se incrementa en gatos domésticos expuestos a manejos rutinarios estresantes (Carlstead *et al.*, 1993) y en *Oncifelis geoffroyi* (gato de las pampas), *Felis concolor* (puma) y *Felis bengalensis* (gato leopardo) después de la traslocación (Carlstead *et al.*, 1992; 1993). A la inversa, elevadas concentraciones de cortisol urinario en el gato leopardo (*Panthera uncia*) son reducidas después un programa de enriquecimiento ambiental con ramas y escondites (Carlstead *et al.*, 1993). Sin embargo, por ser la colección de orina un problema en los felinos se ha preferido utilizar material fecal para estudios de este tipo. El primer paso involucró la determinación del metabolismo del cortisol marcado (^3H) en el gato doméstico, con lo que se observó que más del 85 % de los metabolitos son eliminados por las heces (Graham y Brown, 1996). Estos metabolitos consistían primariamente en formas no hidrolizables solubles en agua, pero ninguno era cortisol natural o corticosterona. Los estudios actuales integran los análisis de cortisol fecal con otras evaluaciones basadas en comportamiento, fisiología reproductiva, inmunología y patología para entregar un potencial significativo de mediciones de estrés (Brown y Wildt, 1997). Aunque siempre se debe tener precaución con la aplicación de una sola medición de estrés (por ejemplo, cortisol) para todas las situaciones (Moberg, 1987), el monitoreo del cortisol fecal puede beneficiar el entendimiento de cómo cambios ambientales y prácticas de manejo pueden afectar el estado psicológico de los animales mantenidos en zoológicos. Estudios longitudinales de cortisol fecal ayudarían a la evaluación de cambios en el estilo de manejo, la introducción de nuevos animales, traslocaciones, procedimientos veterinarios o de reproducción asistida (Brown y Wildt, 1997).

En resumen, el monitoreo de metabolitos fecales de esteroides permite (Brown y Wildt, 1997):

- 1- estudiar el estado puberal, porque la iniciación de la actividad esteroideogénica gonadal está asociada con el establecimiento y mantenimiento de la gametogénesis
- 2- generar conocimiento de los estados normales de los animales con datos de estacionalidad específicos para las especies, por ejemplo, duración de los ciclos estrales y estros, longitud de la fase lútea no gestante, presencia de la ovulación inducida o espontánea (importante para la programación de la inseminación artificial), predicción de partos, identificación de preñez y caracterización de periodos post-parto
- 3- conocer las reales causas de la inactividad o hiperactividad reproductiva, producto de diversas patologías (quistes foliculares o cuerpos lúteos retenidos)
- 4- identificar y mejorar (en el caso de que ya existan) los tratamientos hormonales para la reproducción asistida
- 5- realizar estudios sobre los niveles de estrés fisiológicos en forma cotidiana con el fin de evaluar y mejorar el hábitat para acrecentar el bienestar animal, lo que a su vez incrementará el potencial de reproducción y permite la comparación entre especies e individuos.

3. Objetivos:

- General:

- Evaluar el efecto de la suplementación alimenticia, en ocelotes, sobre la calidad espermática, niveles hormonales (testosterona y cortisol) y nutricionales (ácidos grasos omega-3 y 6, vitaminas y minerales).

- Específicos:

- Determinar el efecto de la suplementación vitamínica y mineral sobre los niveles nutricionales de las poblaciones de ocelotes en cautiverio en la zona central de México por medio de la medición sanguínea de ácidos grasos omega-3, omega-6, vitaminas (A y E) y minerales (calcio y fósforo).

- Establecer curvas de hormonas reproductivas anteriores y posteriores a la suplementación alimenticia por un periodo de un año, para observar si existe estacionalidad reproductiva en los ocelotes en cautiverio, por medio de análisis de heces y sangre.

- Evaluar los niveles de cortisol fecal y sanguíneo como efecto del estrés de manejo y relacionarlos con los niveles hormonales reproductivos.

4. Hipótesis

La suplementación alimenticia mejorará la calidad seminal de los ocelotes, aumentando la concentración espermática y disminuyendo los porcentajes de anormalidades de los espermatozoides, debido a la actividad de las vitaminas y minerales sobre los procesos de espermatogénesis.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$$

Donde:

$\mu 1$ son las características (seminales, hormonales (T4) y nutricionales (Vitamina A y E, ácidos grasos omega-3 y omega-6, y los minerales calcio y fósforo)) de los ocelotes alimentados con su dieta normal.

$\mu 2$ son las mismas características de los ocelotes alimentados con su dieta normal más media tableta de CENTRUM® Multivitamínico diaria.

5. Fundamentos de la investigación

Por ser el ocelote una especie clasificada en peligro de extinción por la U.S. Fish y Wildlife Service (U.S.F.W.S.), encontrarse categorizada desde 1989 en el Apéndice I de CITES y estar clasificada por la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-2001) como especie amenazada, se necesitan conocimientos para trabajar en su recuperación por medio de la reproducción en cautiverio. Solo un 20 % de los felinos de los zoológicos de América latina presentan alguna actividad reproductiva en especies endémicas de felinos (Swanson *et al*, 1995) y los conocimientos generados hasta el momento no han estado enfocados a los pequeños felinos de América (Swanson y Wildt, 1997).

Un mejor entendimiento de la fisiología de la reproducción fundamental puede facilitar la crianza, manejos y conservación de especies. Este conocimiento es necesario para entender la causa de la baja tasa reproductiva de la especie y el mecanismo de acción de la teratospermia en la dinámica reproductiva, que es común en todos los felinos.

También es importante identificar otros factores (estacionalidad, nutrición, enriquecimiento ambiental, etc.) que influyen en la fisiología de la reproducción de estos animales, que permita relacionar los diferentes eventos involucrados en estos procesos, lo que puede realizarse por medio de diferentes métodos, como el diagnóstico del estado general de salud de los animales.

En el caso de los machos es necesario tener una visión sobre la calidad espermática y los mecanismos que se involucran en el proceso de la espermatogénesis (esteroidogénesis, metabolismo general, etc.).

Con énfasis en la biotecnología con fines de reproducción asistida en cautiverio para la conservación de las especies, es fundamental conocer la respuesta de los gametos frente a la criopreservación, especialmente en el entendimiento de la estabilidad de membranas y el desarrollo óptimo de protocolos que permitan establecer bancos de recursos genómicos y el depósito de linajes invaluable protegidos y así ayudar a conservar y manejar las poblaciones en peligro (Wildt y Wemmer, 1999).

Todo lo anterior es necesario para promover la reproducción de estos animales en los zoológicos y apoyar los programas de conservación *in situ* por medio del conocimiento generado. Esto evitará las capturas de nuevos individuos para las colecciones zoológicas por medio del mantenimiento de poblaciones viables en cautiverio y si existiera la posibilidad, intentar la liberación de los animales, generados en los programas de reproducción cautiva.

Por lo tanto, es importante encontrar las causas de la baja tasa reproductiva y maximizar los esfuerzos para mejorar la calidad de vida de los animales en cautiverio.

EXPERIMENTOS Y RESULTADOS

6. Experimento I: Efecto de la suplementación vitamínica y mineral sobre la calidad espermática

6.1 Material y métodos

6.1.1 Animales.

Para realizar el estudio se utilizaron ocelotes de tres zoológicos de la República Mexicana, dos machos del Zoológico de San Juan de Aragón, un macho del Zoológico de Chapultepec (ambos zoológicos del Distrito Federal), y dos machos del zoológico de León, en el estado de Guanajuato (Cuadro 6.1).

Cuadro 6.1: Identificación de los ocelotes en estudio

Zoológico	Identificación
Chapultepec	Xcaret
San Juan de Aragón	Joselote y Chester
León	Guillo y Viejo

6.1.2 Manejo de los individuos.

Los animales fueron manipulados cada dos meses, anestesiándolos a nivel quirúrgico vía intramuscular (IM) con tiletamina y zolacepam², en dosis de 7-9 mg/kg. Se utilizaron estos anestésicos porque otros como ketamina o halotano alteran los procesos iniciales de la espermatogénesis; además, el uso de relajantes musculares produce el cierre de la vía neuronal proximal que controla la función vesical y las de eyaculación (Howard, 1993).

² Zoletil® Laboratorio Virbac.

La alimentación normal de los ocelotes en los diferentes zoológicos se presenta en el Cuadro 6.2. Al inicio de la investigación los ocelotes se muestrearon en tres ocasiones (una cada dos meses). Una vez obtenidas estas muestras, los ocelotes recibieron una suplementación vitamínica y mineral con media tableta de un multivitamínico comercial (CENTRUM® Multivitamínico) al día.

Cuadro 6.2: Dietas normales de los ocelotes en los zoológicos estudiados

Zoológico	Dieta antes de la suplementación
Chapultepec	Carne magra de caballo sin hueso
San Juan de Aragón	Carne de pollo y alimento comercial seco para gatos
León	Carne de caballo sin hueso y cuellos y cabezas de pollo

Los animales se dejaban en ayunas 24 hrs antes de cada sesión de electroeyaculación. Las capturas se realizaban con redes en sus propios encierros; en el lugar se les aplicaba la anestesia vía intramuscular, en las dosis ya mencionadas. Para el cálculo de las dosis se utilizaron los pesos de los muestreos anteriores. Una vez anestesiados, los ocelotes se trasladaban al quirófano de las clínicas de los zoológicos, donde se les realizaba un examen físico de los genitales, observando el tamaño de las espículas penianas y la apariencia anatómica del pene. También se valoró la consistencia de los testículos con base en la siguiente escala: 1 = duro, 2 = normal, 3 = flácido. Además se midió el tamaño de los testículos (largo y ancho) con un caliper graduado. Con esas medidas se calculó el volumen testicular $((\text{largo} \times \text{ancho}^2) \times 0.524)$, para determinar posteriormente la producción de espermatozoides (ver Anexo 1).

6.1.3 Recolección y evaluación del semen

El protocolo utilizado en la recolección, evaluación y congelación del semen es el reportado por diferentes autores (Howard, 1986, 1999; Seager 1974; Seager y Demorest

1986a, b; Wildt et al., 1983, 1984b, 1987b) y el que se utiliza rutinariamente en el Zoológico de Cincinnati, EUA (Swanson W., comunicación personal)

6.1.3.1 Electroeyaculación y recolección de semen

El semen fue recolectado por electroeyaculación (electroeyaculador 110 Volt AC, 50/60 Hz, modelo 303 P-T Electronic, Boring, Oregon, U.S.), ya que es el método más recomendado para especies silvestres potencialmente agresivas, porque al estar anestesiado el animal no presenta ningún riesgo para el manipulador y disminuye el estrés que causa la electroeyaculación. El semen se recolectó en una copa estéril de plástico tibia. Se utilizó una sonda de estimulación de 1.6 cm de diámetro con 3 electrodos de cobre verticales, dirigidos ventralmente a la pared del recto, que se lijaban antes de usarlos para permitir una mejor transmisión de la electricidad. La sonda se lubricaba con gel³ para obtener el máximo contacto con la pared del recto y fuera más fácil la introducción de la sonda por el ano. El proceso consistió en tres series, con un máximo de 80 estimulaciones (Howard, 1986, 1993); la primera serie fue de 2, 3 y 4 voltios, partiendo desde cero en cada caso. Se aplicaron diez estímulos por cada voltaje, con una duración de 2 a 3 segundos, y una vez que se terminaba la estimulación con un voltaje se dejaba descansar por 15 a 30 segundos al animal. Terminada la serie, el aparato era apagado y se evaluaba la muestra obtenida, mientras el animal descansaba aproximadamente durante 3 a 5 minutos. La segunda serie comenzaba con 3 voltios hasta llegar a 5 voltios, de la misma forma que la primera, y la tercera serie era de 4 y 5 voltios.

6.1.3.2 Procesamiento y evaluación del semen

Para iniciar esta etapa se preparó una botella de 100 ml del medio de cultivo HAM F10⁴, agregando una mezcla de piruvato de sodio (2.6 mg/100ml), glutamina (28.4

³ Gel lubricante K-Y, Laboratorio Johnson-Johnson #8919.

⁴ Cell culture, nutrient mixture, Laboratorio Sigma-Aldrich, # N-6013.

mg/100ml), penicilina G (5 mg/100ml) y estreptomina (5 mg/100ml). Luego se retiraban 5 ml de la botella del medio de cultivo HAM F10 con una pipeta estéril para reemplazarlos con 5 ml de suero fetal bovino. Con esta preparación se realizaron algunas pruebas con las células sexuales: concentración, estado acrosomal, longevidad y congelación. Usando un filtro estéril se separaban 10 ml de la solución preparada, que eran usados en un día de trabajo y se transferían 3 ml a una placa de Petri de 35 mm de diámetro y se dejaba en una termoplatina a 37° C. Esto se hacía para mantener la solución de trabajo a una temperatura adecuada, que evitara el choque térmico en los espermatozoides recolectados, prolongando así su vida fuera de los testículos. El resto de la botella se podía guardar refrigerada de 3 a 4 días.

Se midió el total del volumen del semen eyaculado con una micropipeta y después se transfirió a un tubo Eppendorf estéril, tibio. Una gota del semen (3 μ l) se observaba al microscopio en un porta objeto tibio, evaluando el porcentaje de motilidad (de 0 a 100%) y la motilidad progresiva, con una escala de 0 a 5, donde 0 era inmóvil pero vivo; 1 era leve movimiento de lado a lado sin progreso; 2 era más moderado de lado a lado con progreso ocasional; 3 era pequeña progresión; 4 era constante progresión, y 5, movimiento muy rápido y progresivo (Wildt *et al*, 1988). También se evaluó la acidez de los líquidos, colocando una pequeña gota del eyaculado sin diluir en una tira de pH para identificar los eyaculados contaminados con orina.

El resto del líquido eyaculado fue diluido en el medio de cultivo HAM F10 tibio, de la placa Petri, en una proporción de 1:1. Para mantenerlo en las condiciones más óptimas posibles, hasta que se terminaban las sesiones de electroeyaculación, el eyaculado se guardó en una caja de cartón oscura, a temperatura ambiente, para evitar así el contacto con la luz, que produce alteraciones en la motilidad y puede acelerar la mortalidad. Este proceso se realizó en todas las series, pero antes de diluir el eyaculado de las siguientes series se fijaba una porción para el estudio de morfología.

6.1.3.3 Fijación

La muestra se fijó usando 5 μ l del semen sin diluir, mezclado con 50 μ l de glutaraldehído al 0.3% en un pequeño tubo Eppendorf o críovial. El tubo fue identificado apropiadamente y guardado en refrigeración hasta su evaluación, que se realizó utilizando un microscopio de contraste de fases, con un aumento de 1000x y aceite de inmersión, evaluándose 100 espermatozoides. Las alteraciones morfológicas descritas en diferentes especies de felinos son macrocefalia, microcefalia, bicefalia, tricefalia, acrosoma anormal, aplasia mitocondrial, flagelo enrollado, flagelo curvo con o sin gota citoplasmática, gota citoplasmática proximal o caudal y pieza media curva (Howard, 1993), por lo que la atención se concentró en estas anomalías.

6.1.3.4 Concentración espermática

La concentración espermática se determinó combinando el semen diluido de las tres series, pero sólo en aquellas muestras que tenían células espermáticas. En un tubo Eppendorf se colocaron 995 μ l de agua y 5 μ l de semen, para obtener una dilución de 1:200. Se esperó 5 a 10 minutos para que se murieran las células y se llenaron ambas cámaras de un hemocitómetro con esta solución. El conteo se realizó en las cuatro cámaras grandes de las esquinas (son 16 cuadros pequeños por cada cámara grande) y la cantidad de células contadas se dividió entre 4 para conocer el número de espermatozoides por cada cuadro grande. Luego se multiplicó el número obtenido por 10 (por ser la cantidad de líquido que cabe en la cámara, 10 μ l) y, por último, nuevamente se multiplicó por 200, para corregir por la dilución de 1:200 y obtener la cantidad de espermatozoides por μ l. Para la conversión a millones de espermatozoides por ml, se multiplicó el número de células por μ l por 1000. También se debía corregir la dilución inicial para saber la concentración de espermatozoides en el eyaculado original sin diluir. Como la dilución inicial era 1:1 se multiplicó por 2. Finalmente se multiplicó la concentración del semen inicial (número

obtenido anteriormente) por el volumen y el resultado se expresó como espermatozoides por eyaculado (esperm/eyac) (Howard *et al.*, 1986; Wildt *et al.*, 1988).

6.1.3.5 Determinación del estado del acrosoma

Se mezclaron 3 μ l del semen diluido 1:1 en el medio de cultivo HAM F10 con 12 μ l de tinción Pope (Pope *et al.*, 1991) en un tubo Eppendorf y se esperó 2 minutos para obtener una tinción lo más perfecta posible. De esta mezcla se tomaron 7 μ l que se esparcieron en dos portaobjetos marcados con la identificación del animal, y se dejó secar al aire. Una vez seco, se fijó con 5 a 10 μ l de Permout (fijador histológico) en el centro del portaobjeto y se cubrió con un cubreobjeto, presionando para que se pegaran. Estas preparaciones se almacenaron en una caja hasta su evaluación, que se realizó en un microscopio óptico, contando 100 espermatozoides, con un aumento de 400 o 1000x. Con esta tinción se pudieron observar las siguientes características de los acrosomas:

- acrosoma intacto : los espermatozoides se tiñeron de azul oscuro en la parte anterior de la cabeza.
- sin acrosoma : los espermatozoides se tiñeron de color rosado en la parte anterior de la cabeza.
- acrosoma parcial : partes teñidas de rosa y otras de azul en la cabeza.

6.1.3.6 Longevidad o viabilidad espermáticas

Para iniciar el análisis de longevidad se dividió el semen diluido que no se utilizó en los análisis anteriores en cuatro partes iguales, en tubos Eppendorf separados, para centrifugar a 600 G por 10 minutos. Esto se hizo para mejorar la calidad de la muestra, ya que la centrifugación elimina el plasma seminal, las bacterias y los microorganismos que contiene la muestra, aumentando la duración de la motilidad espermática (Howard, 1993).

Previamente, se prepararon 5 ml del medio de cultivo HAM F10 con 23.8 mg de Hepes⁵ y 8 µl de NaOH. Esta mezcla se filtró (con un filtro estéril) en un tubo cónico, con tapa, de 15 ml.

El sobrenadante del semen centrifugado se retiró y el pellet de células de un tubo Eppendorf fue resuspendido en 100 µl del medio de cultivo HAM F10 preparado con Hepes, que estaba a temperatura ambiente. Los otros tres tubos fueron resuspendidos en 100 µl de Refrigerator Medium Test⁶, mezclado con 400 µl de glicerol 4 % (para preparar esto antes se debían extraer 400 µl del Refrigerator Medium Test). Estos tubos se utilizaron en la criopreservación del semen extraído.

Con el semen resuspendido en el medio de cultivo HAM F10 preparado con Hepes se determinó la concentración espermática y el porcentaje de motilidad, para luego diluir la muestra restante hasta llegar a una concentración de 10×10^6 espermatozoides móviles por ml. De esta nueva dilución se extrajeron tres gotas de 25 µl, que fueron colocadas en una placa de Petri previamente dividida en tres partes con un marcador por el reverso de su base para identificar los tiempos de incubación (1, 3 y 6 horas). Las gotas fueron cubiertas con aceite mineral hasta sumergirlas completamente. La placa de Petri fue protegida de la luz con papel aluminio para incubarla en la termoplatina a 37 °C por 6 horas. A las 0, 1, 3 y 6 horas de incubación se midió la concentración espermática, y a las 0 y 6 horas fue analizado también el estado del acrosoma (de la misma manera descrita anteriormente).

6.1.3.7 Criopreservación de los espermatozoides

Para congelar semen de ocelote éste debe tener como mínimo una motilidad de 50%, una motilidad progresiva de 3.0 y una concentración total de espermatozoides del eyaculado inicial de 10 millones/ml.

⁵ Buffer, Laboratorio Sigma-Aldrich, # H-4034.

⁶ Refrigerator Medium Test Yolk Buffer, Irvine Scientific # 9972.

El proceso de congelación se inició diluyendo los pellets de células resuspendidas en Refrigerator Medium Test hasta una concentración de 50×10^6 espermatozoides/ml (los tres tubos Eppendorf por separado), utilizando la concentración inicial de la muestra resuspendida en el medio de cultivo HAM F10 preparada con Hepes. Esta concentración es necesaria porque la muestra puede llegar a bajar hasta 20×10^6 espermatozoides/ml después de la congelación.

Para iniciar la congelación se colocó un vaso de precipitado de 500 ml lleno de agua a refrigerar por 3 horas. Este procedimiento se realizó para evitar un golpe térmico brusco provocado por la baja temperatura del nitrógeno líquido, que alteraría gravemente a los espermatozoides.

Las muestras se congelaron por medio de la técnica de congelación en pajillas con vapores de nitrógeno líquido. Las pajillas que se utilizaron fueron de 0.25 ml y se identificaron apropiadamente, para luego ser cargadas con semen por medio de una jeringa de 1 ml, con el extremo de filtro unido a la jeringa. Si el volumen de la carga era menor a 200 μ l, se completaba con una pequeña cantidad de Refrigerator Medium Test, con glicerol al 4%, preparado anteriormente, dejando entre éste y el semen una burbuja de aire. La punta de la pajilla era sellada con calor por medio de una pinza. Una vez hecho esto, las muestras se colocaron en una bolsa sellable para su posterior refrigeración en el vaso precipitado de 500 ml.

Para congelar con este método, primero se colocó una gradilla metálica, de 7 pulgadas, en una hielera que contenía 2 pulgadas de nitrógeno líquido. Las pajillas se retiraban del refrigerador para colocarlas sobre la gradilla una vez que decrecía la fase inicial de vapores del nitrógeno (muy importante era no dejarlas cambiar de temperatura después de sacarlas del agua refrigerada); enseguida se cerraba la tapa de la hielera por tres minutos, luego se dejaban caer las pajillas al nitrógeno líquido. Transcurrido un minuto, las pajillas eran colocadas en un canastillo plástico pre-congelado en nitrógeno líquido y éste

en su bastón metálico, debidamente marcado dentro del tanque contenedor de nitrógeno líquido⁷. Las pajillas siempre estuvieron en contacto con el nitrógeno del tanque.

6.1.4 Análisis de los datos

6.1.4.1 Prueba de hipótesis

Hipótesis: Las características seminales (motilidad, motilidad progresiva, morfología, estado del acrosoma), mejoraran después del inicio de la suplementación vitamínica y mineral en la dieta.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2$$

Donde

μ_1 = calidad del semen de los ocelotes antes de iniciar la suplementación vitamínica y mineral.

μ_2 = calidad seminal de los mismos ocelotes después de la suplementación.

6.1.4.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue una **prueba de t pareada**. Para este efecto los datos espermáticos fueron divididos entre 1.000.000, para así disminuir el efecto negativo de la gran dispersión que se tuvo. Este número fue decidido por ser este un valor importante en la contabilización de espermatozoides, ya que una variación de miles de células no tiene ningún valor en la reproducción de los animales; en cambio una unidad de millones sí afecta el rendimiento reproductivo del individuo.

⁷ Tanque contenedor de Nitrógeno líquido, 35HC, Taylor-Wharton, Division of Harsco Co.

6.2 Resultados

El examen físico anatómico del aparato reproductivo (testículos y pene) que se realizó durante todo el periodo de investigación, antes del inicio de cada sesión de electroeyaculación, permitió ver variación del volumen testicular total a través de año, que en promedio fue de $12.77 \pm 4.05 \text{ cm}^3$ (con un rango de $7.59 - 24.61 \text{ cm}^3$). Los volúmenes del testículo izquierdo de todos los animales fluctuaron durante todo el estudio entre 3.183 a 12.711 cm^3 , con un promedio de $6.33 \pm 2.1908 \text{ cm}^3$, y los del testículo derecho, entre 3.301 a 11.953 cm^3 , con una media de $6.44 \pm 2.182 \text{ cm}^3$. Además, al diferenciar las etapas de la investigación en dos periodos, antes y después de la suplementación, los valores variaron como se observa en el Cuadro 6.3, donde puede apreciarse ver una pequeña diferencia en los valores, aumentando el volumen de los testículos posteriormente a la aplicación de la suplementación, pero sin obtenerse un valor estadísticamente significativo ($p = 0.28$).

Cuadro 6.3 Diferencias de volumen testicular antes y después de la suplementación alimenticia con Multivitaminico CENTRUM® ($p = 0.28$)

	Antes	Después
Volumen testicular izquierdo cm^3	5.97 ± 2.22 (3.18 – 12.71)	6.64 ± 2.15 (4.24 – 12.27)
Volumen testicular derecho cm^3	5.99 ± 1.97 (3.79 – 11.89)	6.82 ± 2.32 (3.3 – 11.95)
Volumen testicular Total cm^3	11.97 ± 4.06 (7.54 – 24.61)	13.46 ± 3.99 (8.19 – 24.22)

El examen físico del aparato reproductor de los machos también permitió ver la presencia de las espículas penianas (que se encuentran en la mayoría de los felinos), cuyo tamaño o forma no varió significativamente o con algún patrón en los individuos a través del periodo de estudio.

Durante la investigación se realizaron 52 sesiones de tranquilización y electroeyaculación de los animales, de las cuales sólo se obtuvo líquido seminal en 46 oportunidades (88.46%) y de éstas, en 17 ocasiones (32.69 %) se obtuvieron células espermáticas, en 29 ocasiones sólo líquido seminal (55.77 %) y en 6 ocasiones no se obtuvo líquido ni secreciones (11.54 %) (Figura 3). El promedio del volumen eyaculado durante todas las sesiones fue de 0.473+/- 0.398 ml (en un rango de 0.008 – 1.784 ml) (sólo tomando en cuenta las colecciones no contaminadas con orina) y el promedio del volumen eyaculado que contuvo células espermáticas fue de 0.364 +/- 0.374 ml (0.004 y 1.111 ml).

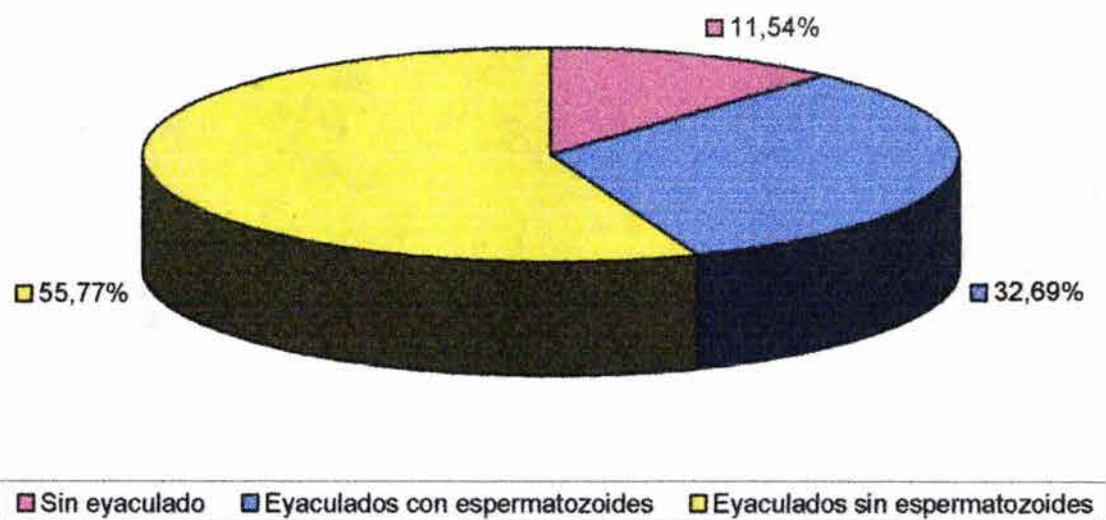


Figura 3. Obtención de eyaculados durante la investigación

La concentración promedio de todos los eyaculados obtenidos durante la investigación fue de $46.217 \pm 48.821 \times 10^6$ esperm/ml, con un rango de dispersión entre 1.8×10^6 esperm/ml (JOSELOTE) hasta 194×10^6 esperm/ml (XCARET) (mínima y máxima, respectivamente, de los individuos a través de todo el estudio). El promedio de células totales por eyaculado fue de $21.4 \pm 45.3 \times 10^6$ esperm/ml, cuyos valores mínimos y máximos fueron 0.0525×10^6 esperm/ml (GUILLO) y 193.612×10^6 esperm/ml (XCARET), respectivamente (Cuadro 6.4; anexo 2).

Cuadro 6.4 Diferencias de las características espermáticas, antes y después de la suplementación Multivitamínica con CENTRUM®.

	<i>Antes</i>	<i>Después</i>	<i>P</i>
Concentración espermática *	9.85 ± 18.21 x 10 ^{6a}	51.49 ± 35.75 x 10 ^{6b}	0.013
Conteo total de células *	1.16 ± 2.44 x 10 ^{6c}	27.50 ± 29.61 x 10 ^{6c}	0.09
Producción de células por unidad testicular	0.086 ± 0.17 x 10 ^{6d}	1.84 ± 1.54 x 10 ^{6e}	0.044
Porcentaje de motilidad %	67.5 ± 13.322 % ^f	66 +/- 27.01 % ^f	> 0.05
Motilidad progresiva	3.16 ± 0.40 ^g	3.77 ± 0.68 ^g	> 0.05

Espermatozoides / ml

Literales iguales indican resultados estadísticamente no significativos.

Literales diferentes indican resultados estadísticamente significativos

En dos individuos del estudio (CHESTER y VIEJO) no se obtuvieron espermatozoides antes de la suplementación; esto no se debió a la mala ejecución de la técnica (comprobado por las contracciones de los miembros posteriores del ocelote cuando se le aplicaban los estímulos eléctricos), sino a causas desconocidas, por lo que esos datos fueron considerados como “no colección” de espermatozoides, vale decir, que no existía producción de células espermáticas (concentración igual a cero). Después de dos y seis meses del inicio de la suplementación en estos ocelotes se obtuvieron espermatozoides. Los valores promedios de cada individuo separados en antes y después del inicio de la suplementación vitamínica permiten observar la diferencia importante y estadísticamente significativa en los datos espermáticos, que se puede atribuir a la suplementación (Cuadro 6.5).

En el Cuadro 6.5 se pueden observar los incrementos en la concentración espermática de cada macho, así como también en la cantidad de células en cada eyaculado y, por lo mismo, en la producción de espermatozoides por unidad de volumen testicular (cm³) (Figura 4). El uso del suplemento Multivitamínico CENTRUM® en la dieta fue la única diferencia aparente que pudo causar ese incremento. Estos datos, al analizarlos como una sola población (n = 5) de individuos, indicaron que la suplementación alimenticia

ejerce un efecto positivo estadísticamente significativo sobre la concentración espermática ($P < 0.01$), así como en la producción de espermatozoides por cm^3 de testículo ($P < 0.05$) (Cuadro 6.4 y 6.5).

Cuadro 6.5. Rango de concentración y producción de espermatozoides en cada individuo del estudio.

<i>ID</i>	<i>Concentración espermática antes*</i>	<i>Concentración espermática después*</i>	<i>Conteo total por eyaculado antes*</i>	<i>Conteo total por eyaculado después*</i>	<i>Prod esperm/vol testicular antes**</i>	<i>Prod esperm/vol testicular después**</i>
Chester	0	64	0	16.70	0	1.115
Guillo	5.25	40.67 ± 22.91	0.053	11.39 ± 8.02	0.0043	1.089
Joselote	1.8	28.3	0.194	23.99	0.0214	2.373
Viejo	0	17.15 ± 11.53	0	6.26 ± 5.28	0	0.392
Xcaret	42.2 ± 36.39	107.37 ± 89.04	5.53 ± 6.99	79.16 ± 99.66	0.4046	4.218
Todos	9.85 ± 18.21	51.49 ± 35.75	1.16 ± 2.44	27.50 ± 29.61	0.086 ± 0.17	1.84 ± 1.54
P		0.01		0.09		0.04

*Millones de espermatozoides por mililitro de eyaculado

** Millones de espermatozoides por cm^3 de volumen testicular.

P: significancia de la diferencia entre los resultados antes y después de la suplementación

ID: identificación

Prod esperm/vol testicular: producción espermática por volumen testicular.

Los porcentajes de motilidad de los eyaculados obtenidos no presentaron diferencia estadísticamente significativa antes y después de la suplementación, con valores promedios de 66.81 ± 19.52 % durante todo el periodo de investigación (Cuadro 6.4), con un máximo de 90% (XCARET) y mínimo de 20% (GUILLO). Al presentar los resultados con base al tratamiento aplicado no se observó una diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$). Además, en siete sesiones posteriores al inicio de la suplementación, por lo menos una vez en cada individuo se obtuvieron espermatozoides muertos por contaminación de orina o por causas desconocidas. Todas las muestras presentaron una buena concentración espermática y un porcentaje de anormalidad dentro de la media de todo el estudio (anexo 2).

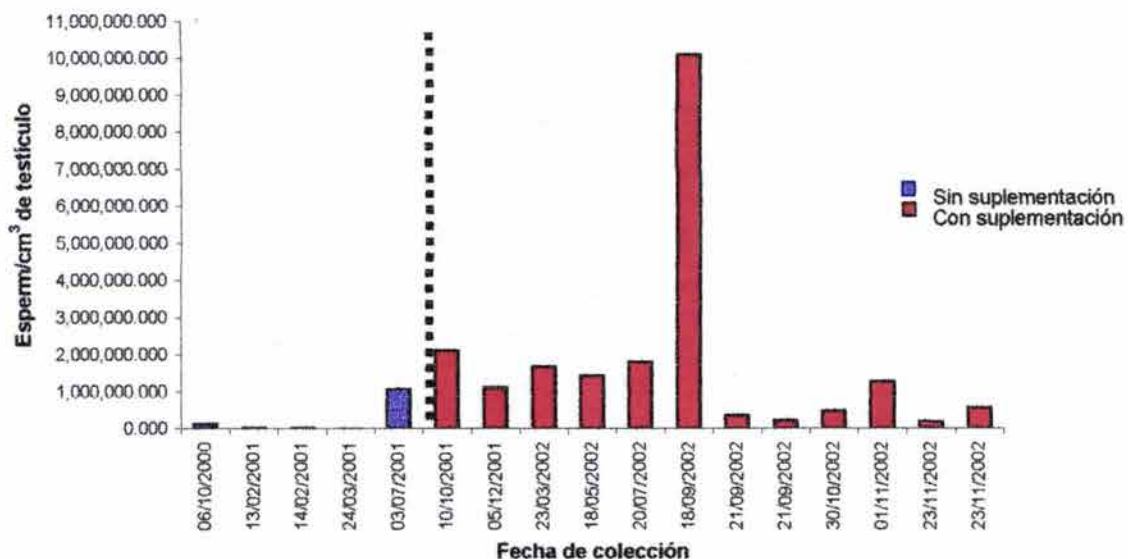


Figura 4. Producción espermática por unidad de volumen testicular de la población completa a través de todo el periodo de investigación. Se observa el aumento de en la producción de los espermatozoides en todos los animales (Anexo 3, 4, 5 y 6)

La motilidad progresiva a través de todo el estudio no presentó variaciones estadísticamente significativas entre antes y después de la suplementación (ver Cuadro 6.4). En promedio a través de todo el periodo de investigación los eyaculados obtenidos presentaron un motilidad progresiva de 3.41 ± 0.58 y su rango de distribución estuvo entre 3 y 4.5.

El porcentaje promedio de anomalías observadas en los eyaculados fue de $43.43 \pm 10.23 \%$, con un porcentaje mínimo de 30 % y un máximo de 63 %. Además, al separar los datos antes y después de la suplementación con CENTRUM[®] se observó una leve disminución, que no llegó a ser significativa (antes = 46.25 %; después = 42.5 %) (Cuadro 6.6)

Cuadro 6.6: Porcentajes de anomalías espermáticas primarias y secundarias y daño acrosomal en los eyaculados obtenidos.

	<i>Promedio</i>	<i>% Máximo</i>	<i>% Mínimo</i>	<i>% Promedio sin suplementación</i>	<i>% Promedio con suplementación</i>
% Anormalidades	43.44 ± 1.02	63	30	46.25 ^a	42.5 ^a
% Anormalidades 1°	27.56 ± 9.09	53	15	28.75 ^b	27.16 ^b
% Anormalidades 2°	16.5 ± 6.25	25	5	17.5 ^c	17 ^c
% Daño acrosomal	10.75 ± 3.21	15	6	10.25 ^d	10.91 ^d
% Sin Acrosoma	5.38 ± 2.55	9	1	6 ^e	5.1 ^e

Literales iguales indican valores estadísticamente no significativos.

En promedio, 10.75 ± 3.21 de los espermatozoides obtenidos presentaron un daño acrosomal, con un porcentaje mínimo de 6 % y un máximo de 15 %, ambos valores obtenidos durante el periodo de suplementación vitamínica y mineral de la dieta normal (Cuadro 6.6). Todos los resultados del análisis de morfología celular no fueron estadísticamente significativos.

Cabe destacar que durante todas las sesiones de electroeyaculación se logró la erección del pene, por lo menos en la segunda serie de electroestímulos, lo que indica una buena ejecución de la técnica, por la ubicación de los electrodos y la profundidad de colocación de la sonda rectal, que estimularon la zona del paquete nervioso del aparato reproductor del macho. En el individuo VIEJO del zoológico de León se presentó en dos ocasiones una resistencia a la penetración con la sonda, lo que se evitó con mayor cantidad de lubricante.

6.3 Discusión

Aunque está bien documentado el efecto de la nutrición sobre la calidad reproductiva en especies domésticas, aún siguen existiendo vacíos en la reproducción de las especies exóticas, especialmente de los felinos, sobre todo en su fisiología reproductiva. En esta ocasión los esfuerzos se enfocaron a ver el efecto nutricional en la calidad del semen producido por los animales en estudio.

Se evaluó el volumen testicular a través de todo el periodo de investigación para poder observar el efecto de la suplementación sobre la producción de espermatozoides, ya que si ésta aumenta, se debería evidenciar de alguna manera en los testículos, por ser éste el lugar donde ocurre el proceso. En este estudio no se logró observar ninguna variación estadísticamente significativa que indicase un aumento o disminución en los testículos, producto de la suplementación vitamínica y mineral. El efecto de la suplementación vitamínica y mineral sobre el tamaño y volumen testicular no ha sido reportado en felinos; en cambio, sí existe evidencia de la variación del volumen testicular de los felinos y otras especies a través de las estaciones del año, ya que al acercarse la época reproductiva de las hembras, los testículos aumentan su producción de esteroides y espermatozoides (Brown *et al.*, 1996; Swanson *et al.*, 1996b). En estos animales mantenidos en cautiverio quizás no existió un efecto estacional en esta característica debido a que todo el año estuvieron junto a una hembra y no debieron buscarla o luchar por ella en el periodo previo a la época reproductiva, a diferencia de los animales en vida libre o con otro tipo de manejo reproductivo.

Otro aspecto anatómico que resaltó en esta especie fueron las espículas penianas, que están presentes en la mayoría de los felinos. Aún cuando se desconoce mucho de ellas, en el gato doméstico son andrógeno-dependientes y presumiblemente estimulan la ovulación durante la cópula (Aronson y Cooper, 1967). En este estudio, el tamaño y forma de las espículas de los animales no presentaron variaciones aparentes, pero sólo fueron analizadas visualmente.

Las características más importantes en la evaluación de un eyaculado, por estar correlacionadas con la fertilidad, son el número total de espermatozoides por eyaculado (concentración), porcentaje de motilidad progresiva y morfología espermática (Feldman y Nelson, 1996; Morrow, 1986). Con respecto al número total de espermatozoides por eyaculado, en este estudio se evaluó, además, la producción de células espermáticas por unidad de volumen testicular, buscando la relación del aumento de la actividad de las

células de Sertoli, producto de la suplementación vitamínica y mineral, y el aumento en la producción de testosterona en las células de Leydig por el mismo efecto, lo que haría aumentar la producción de espermatozoides en cada eyaculado (Sharpe, 1994). Dicho efecto se pudo observar en el aumento significativo de la concentración espermática después del inicio de la suplementación con CENTRUM® (P = 0.0132) al igual que el aumento en la producción por unidad de volumen testicular (cm³). Esto se puede explicar porque la dieta antes del inicio del tratamiento era deficiente en vitaminas A, D y E y tenía un desbalance en calcio y fósforo (dietas típicas de los zoológicos de Latinoamérica (Ullrey y Bernard, 1989)), y al dar el suplemento vitamínico y mineral los animales aumentaron la ingesta de esas vitaminas y minerales importantes para la espermatogénesis. Este efecto se ha visto en otros felinos (puma (*Felis concolor*), jaguar (*Panthera onca*), margay (*Leopardus wiedii*) y Gato Geofroy (*Oncifelis geoffroyi*)) que estaban bajo un régimen dietario (carne de caballo o pollo y/o cabezas de pollo), deficiente en los mismos elementos, y que fueron comparados con individuos bien alimentados (misma dieta suplementada con CENTRUM® o alimento comercial) de la misma especie. En todos los casos los animales con dieta de carne y CENTRUM® tuvieron mayor concentración espermática en sus eyaculados (Howard, 1993; Swanson et al, 1994a, b; 1995).

Otro aspecto que indicó un aumento en la producción de espermatozoides fue que las concentraciones obtenidas antes de la suplementación fueron mucho menores (9.85×10^6 esperm/ml) a las reportadas como normales ($28 \pm 17 \times 10^6$ esperm/ml) (Howard, 1993) para la especie, y una vez iniciada la suplementación, estos valores aumentaron hasta alcanzar y superar en algunas ocasiones, los valores normales (51.49×10^6 esperm/ml).

Solamente en un estudio de esta especie se había calculado la producción de células espermáticas por unidad de volumen testicular (cm³), observando un promedio de $4.0 \pm 0.5 \times 10^6/\text{cm}^3$ para la especie en cautiverio bajo condiciones nutricionales balanceadas. Este dato es superior a los resultados obtenidos en el presente trabajo, pero aún así existió una diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05), que permite suponer que el efecto se

debió a la mejoría en la calidad nutricional de la dieta (promedio antes de la suplementación, 0.25×10^6 esperm/cm³; después de la suplementación, 1.87×10^6 esperm/cm³). Al igual que el aumento en la concentración de los eyaculados, este efecto se puede atribuir a las vitaminas y minerales adicionadas a la dieta normal, aumentando de esta forma los elementos necesarios para estimular la espermatogénesis (Bieri y Prival, 1966; Brown y Burk, 1973; Cooper *et al.*, 1987; Dunn y Moss, 1992; Ganguly *et al.*, 1980; Hignett, 1950; Kodentsova *et al.*, 1994; Maqsood, 1952; Scott 1978; Therlfall *et al.*, 1996; Van Pelt y Rooji, 1991; Wallace *et al.*, 1983).

Como ya se mencionó, la motilidad de los espermatozoides en el eyaculado es un punto importante en la fertilidad de un animal y se evalúa por el porcentaje de las células que se ven en un campo del microscopio a un aumento de 10X. En todos los animales se obtuvo un promedio de 66.8 % de motilidad (durante todo el periodo de investigación), que para la especie es bajo ($72 \pm 12.5\%$ (Howard, 1993)) y la diferencia entre los tratamientos no arrojó una evidencia significativa que hiciera sospechar de algún efecto de la suplementación nutricional en este factor. Pero al analizar todos los datos, se observa que en siete ocasiones después del inicio de la suplementación, todos los animales (por lo menos una vez) arrojaron espermatozoides sin movimiento o muertos. En su mayoría estos eyaculados se presentaron en el último tercio del año. Quizás hubo un incremento en la producción de células y muchas salieran defectuosas o muertas.

Los resultados de la motilidad progresiva o status de los espermatozoides eyaculados fueron evaluados según lo descrito por Wildt *et al.* (1988), y estuvieron dentro de los rangos normales para la especie (3.5 – 4) (Howard, 1993; Morais *et al.*, 2002), ya que su promedio fue de 3.41. Cabe recordar que este tipo de evaluaciones es muy subjetivo, debido a que se realizan de acuerdo con las percepciones de cada investigador y los rangos en que se evalúan aumentan en 0.5 puntos, por lo que el promedio obtenido en el presente estudio es el cálculo de todas las observaciones, que fluctuaron entre 3 y 4.5. Aunque los datos estuvieron dentro de los rangos normales, existió una diferencia numérica entre los

tratamiento (antes: 3.16 ± 0.40 ; después: 3.77 ± 0.68), que no llegó a ser estadísticamente significativa ($P > 0.05$).

Aunque las anomalías encontradas en los eyaculados para los animales en estudio fueron relativamente altas para la especie (80 % de normalidad reportado para ocelotes) (Wildt 1987b), en promedio más del 40 % de las células espermáticas fueron anormales. Esto mejoró un poco durante el periodo de suplementación de las dietas, pero sin que la diferencia llegara a ser estadísticamente significativa. Quizás por el pequeño número de individuos no se logró observar el efecto real de la calidad de la dieta. Cabe destacar que los felinos en general presentan altos índices de anomalías como eyaculados normales (Wildt *et al.*, 1986; 1987a, b, c). Una causa de las anomalías puede estar asociada con la baja variabilidad genética de las poblaciones cautivas y con las dietas mal balanceadas que reciben (Barone *et al.*, 1994; Pukazhenthii *et al.*, 2001). Así, se ha reportado que pumas en buenas condiciones nutricionales (pero con altos niveles de cortisol sanguíneo) arrojan en promedio aproximadamente un 15 % de normalidad (Swanson *et al.*, 2003) y de la misma manera, animales con alimentación más deficiente producen un semen con un 20 % de normalidad, aproximadamente (Swanson *et al.*, 2003). Por lo tanto, aun cuando las características seminales de los ocelotes del presente estudio pueden mejorar o mantenerse. Estas dependerán de la variabilidad genética de cada individuo, pero también pueden mejorar una vez que la complementación de la dieta (con vitaminas y minerales) se realice en forma rutinaria y la alimentación este apropiadamente, como lo observaron en Brasil (Morais *et al.*, 2002).

6.4 Conclusiones

- ◊ La electroeyaculación es una herramienta muy útil para la evaluación seminal de los animales potencialmente peligrosos, porque permite una colección segura tanto para el operador como para el animal, por estar este último bajo anestesia a nivel quirúrgico.

- ◇ La suplementación multivitamínica y mineral tiene un efecto positivo sobre la producción de espermatozoides (concentración y producción por unidad de testículo), debido a la gran gama de nutrientes que se está proporcionando a los animales con este tipo de productos.
- ◇ Como los animales en estudio arrojaron altos índices de alteraciones morfológicas, sería de gran interés estudiar genéticamente a esos individuos, para descartar problemas de endogamia.
- ◇ Es importante poder calcular la tasa de producción espermática de los animales, ya que es la unidad básica en que se expresa la mejoría que los tratamientos aplicados pueden producir.

7. EXPERIMENTO II: Metabolitos hormonales en las heces antes y después de una suplementación vitamínica y mineral en ocelotes en cautiverio

7.1 Material y métodos

7.1.1 Colección de las muestras

Los ocelotes que se utilizaron en este estudio fueron de dos zoológicos de la Ciudad de México:

Zoológico de Chapultepec: -Macho joven sin descendencia, identificación: Xcaret
Zoológico de San Juan de Aragón: -Macho adulto con descendencia, identificación:
Chester
-Macho joven sin descendencia, identificación:
Joselote.

Los ocelotes se mantuvieron con su dieta normal (ver Cuadro 6.1) durante los primeros seis meses del estudio; durante los siguientes 12 meses a la dieta normal se le adicionó media tableta de CENTRUM® Multivitamínico al día.

La colección de las muestras fecales se llevó a cabo gracias a los cuidadores de los animales y se realizó una vez por semana, durante todo el período de investigación (18 meses). Uno de los machos murió en el mes de febrero del 2002, por lo cual sólo se obtuvo la mitad de las muestras en ese animal. El procedimiento consistió en recolectar los excrementos de los animales directamente del suelo de los encierros nocturnos o dormitorios individuales (lo que facilitó su identificación), a primera hora en la mañana. Las muestras eran recogidas en bolsas sellables e identificadas con el nombre del individuo y la fecha de colección. Luego eran almacenadas en congelación (-20° C) hasta su traslado al laboratorio donde eran trasvasadas a tubos de polipropileno de 5 ml y congeladas (-20 °C) hasta su análisis.

7.1.2 Extracción de esteroides de las muestras

En los excrementos recolectados se determinaron las concentraciones de testosterona, como indicador reproductivo, y de cortisol, como un indicador de estrés. Ambas determinaciones se hicieron por medio de radioinmunoanálisis (RIA), en el laboratorio de Fisiología II del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV), dirigido por la Dra. Martha Romano. Para dicho efecto se utilizó el método seco, descrito por Brown *et al.* (1993), modificado por Brousset (2003). El método consiste en secar la muestra de heces en un Speedvac Rotary Evaporator (marca SAVANT), pesar 0.180 a 0.200 g de excremento seco, transferirla a un tubo de ensayo de vidrio con tapa de rosca, debidamente identificado, y realizar la extracción de las hormonas esteroides. La extracción comenzaba diluyendo la muestra en etanol absoluto al 80 % (1 ml de agua destilada y 4 ml de etanol absoluto): esto se mezclaba en vórtex por un minuto, luego se marcaba el nivel del líquido en el tubo y se hervían las muestras en baño María a 93 – 100 °C por 20 minutos. Durante este tiempo se debían revisar los niveles para evitar que se evaporaran completamente las suspensiones; para esto se rellenaban los tubos con etanol hasta la marca inicial, a medida que se evaporaba el líquido. Luego se centrifugaron los tubos a 3000 r.p.m. por 20 minutos y el sobrenadante se pasaba a otro tubo con la misma identificación que su antecesor. Estos tubos eran secados en baño María (36 °C) con aire a presión hasta que no quedara líquido; las partículas que quedaban en las paredes eran resuspendidas en 1 ml de etanol, se mezclaban en un vórtex por un minuto, se dejaban reposar por 30 minutos y se centrifugaban a 3000 r.p.m. por 20 minutos más. El sobrenadante era transferido a un tubo RIA debidamente identificado, a éste se le agregaban 2 ml de buffer RIA diluido (75% de buffer RIA concentrado mas 25% de agua des-ionizada), dejando una dilución final de 2.

7.1.3 Radioinmunoanálisis

7.1.3.1 Radioinmunoanálisis para testosterona

La determinación de los niveles de testosterona (**T4**) en los extractos se realizó para tener una aproximación del estado reproductivo de los animales, por medio de un método no-invasivo, que permite cuantificar la concentración de la hormona (picogramos). Este estudio permite conocer la actividad hormonal de los animales en forma longitudinal y también comparar los resultados con los del estudio invasivo (muestra de sangre).

Los niveles de T4 se determinaron mediante la técnica de RIA, la cual utiliza un marcador de testosterona radioactiva con tritio (^3H) del laboratorio **PerkinElmer Life Science Inc**, que tiene un rango de actividad específica de 85 – 105 Ci/mmol; un anticuerpo específico para testosterona, Antitestosterone 1000T (#07-189016), del Laboratorio ICN con reacción cruzada de 18.75 % con 5α - dihidrotestosterona, 3 % con 5α -androstano - 3α , 17β - diol, 1% con 5-androsteno – 3β , 17β - diol y menos de 0.57 % con otros metabolitos esteroideos y posee una sensibilidad de 5 – 10 pg. Otro componente del protocolo es el líquido de centelleo, el cual se fabrica en el laboratorio de Fisiología II del CINVESTAV, y amplifica la señal radioactiva de manera que pueda leerse en un contador de centelleo radioactivo.

Para la realización del RIA se usaron 100 μl de muestra, 100 μl de anticuerpo, 50 μl de hormona radioactivamente marcada con tritio, 500 μl de carbón activado, 5 ml de líquido de centelleo (protocolo utilizado en el laboratorio de Fisiología II del CINVESTAV). Los primeros tres componentes se mezclaron el primer día de trabajo y se dejó incubando por 18 a 24 horas en una cámara fría a 4 °C; transcurrido el tiempo de incubación, la reacción se detuvo agregando el carbón activado, el cual se mezcló muy bien con la solución incubada; se esperó por 10 minutos para la reacción y se centrifugó a 4° C, lo que permitió separar el carbón activado, que contenía las hormonas libres (radioactivas y no), del sobrenadante, en el cual estaban las hormonas unidas al anticuerpo. El

sobrenadante se decantó en viales de vidrio en los cuales se mezcló la solución con el líquido de centelleo. Los viales con la mezcla radioactiva (extracto de muestra, anticuerpo específico, marcador radioactivo, líquido de centelleo) se llevaron al contador de centelleo marca **Beckman LS 6000 TA** o en su caso, al contador **Tri – carb 2000 CA liquid scintillation Analyzer United Technologies Packard**, para radiaciones Beta, la lectura de luminiscencia fue durante un minuto por cada vial, para obtener las cuentas por minuto (cpm) y cuantificar así la cantidad de hormona de la muestra problema.

7.1.3.2 Radioinmunoanálisis para cortisol

En los extractos descritos anteriormente, además de los esteroides sexuales como la testosterona, se determinó la presencia de cortisol en las heces. Por ser esta hormona un producto de la actividad adrenocortical, se puede utilizar como indicador del estrés y relacionarlo con la actividad hormonal reproductiva en forma longitudinal.

Se utilizó el anticuerpo del Laboratorio **CHEMICON**, específico para cortisol, producido a partir de suero de conejo. El marcador radioactivo fue **Hidrocortisona [1, 2, 6, 7, ³H(n)], (Cortisol)** del laboratorio **PerkinElmer Life Science Inc**, que tiene un rango de actividad específica de 70 – 100 Ci/mmol. El procedimiento de análisis y lectura fue el mismo que para testosterona (100 µl de muestra, 100 µl de anticuerpo, 50 µl de hormona radiactivamente marcada con tritio, 500 µl de carbón activado, 5 ml de líquido de centelleo).

7.1.3.3 Validación del RIA

La validación que se realizó en el laboratorio fue mediante la observación de paralelismo entre las diluciones seriadas de una mezcla de extractos de los animales en estudio y la curva estándar del ensayo (para testosterona y cortisol).

7.1.4 Análisis de datos

Una vez obtenidas las cuentas por minuto (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:

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

$\%B/B_0$ = Porcentaje de unión al anticuerpo UI= Unión Inespecífica UT= Unión Total

Con los datos de la concentración y el porcentaje de unión de los estándares, se construyó la curva estándar para obtener la regresión lineal y, posteriormente las concentraciones de las hormonas de cada una de las muestras, mediante el programa **RIA logit**. Una vez realizado esto, los datos se ajustaron a las diluciones, que dependieron de la concentración de cada muestra y los pesos utilizados para hacer los extractos (variaron entre 0.18 a 0.20 g) de cada muestra, para obtener finalmente los ng/g de heces secas.

El control de calidad se determinó por medio de la obtención de la desviación estándar de cada uno de los duplicados, el cálculo del coeficiente de variación promedio de las muestras y los controles externos, determinación de la F calculada por la curva estándar, y la determinación de los controles externos e internos (Zambrano y Díaz, 1996)

7.1.4.1 Prueba de hipótesis

Hipótesis: Las concentraciones de testosterona en excremento aumentaran significativamente ($P < 0.05$) después del inicio de la suplementación vitamínica y mineral en la dieta.

$H_0: \mu_1 \geq \mu_2$

$H_a: \mu_1 < \mu_2$

Donde:

μ_1 : concentración de testosterona de los ocelotes antes del inicio de la suplementación vitamínica y mineral.

μ_2 : concentración de testosterona de los ocelotes después del inicio de la suplementación.

H_0 : es la probabilidad de que la concentración de testosterona, antes de la suplementación con media tableta de CENTRUM®, sea igual o menor a la concentración de testosterona después de iniciada la suplementación en la dieta.

H_a : es la probabilidad de que la concentración de testosterona después del inicio de la suplementación vitamínica y mineral (μ_2) sea mayor que la concentración de testosterona antes del tratamiento (μ_1) ($P < 0.05$).

7.1.4.2 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se realizó una prueba de t pareada, utilizando el programa estadístico SAS®.

7.2 Resultados

7.2.1 Validación

Las pruebas de desafío entre diluciones seriadas de una mezcla de extractos de los animales en estudio y la curva estándar del ensayo resultaron en la forma esperada, disminuyendo la concentración de la hormona a medida que aumentaba la proporción de la dilución. Esto, además, permitió encontrar la dilución exacta que debía ser usada en los extractos de las muestras.

7.2.2 Descripción de los datos obtenidos

Los datos de los tres ocelotes machos (Xcaret, Josleote, Chester) fueron ordenados y analizados como una sola población, evaluando las concentraciones de cortisol y testosterona fecales. Durante el periodo de investigación, el macho CHESTER falleció en febrero de 2002, por lo cual sólo se cuenta con la mitad de las muestras de este animal.

La concentración mínima de testosterona en la población descrita fue de 229.17 ng/g de heces secas (antes de la suplementación vitamínica y mineral) y la máxima fue de 4760.63 ng/g de heces secas (después del inicio de la suplementación), ambas en el mismo individuo (Xcaret). El promedio de las concentraciones de testosterona antes y después de la suplementación fue diferente (Cuadro 7.1), observándose un efecto del tratamiento. El promedio de la concentración de testosterona de la población antes de la suplementación alimenticia, con media tableta diaria de CENTRUM[®], fue de 1010.64 ± 340.7 ng/g de heces secas y el promedio de las concentración posterior a la suplementación fue de 1230.17 ± 345.12 ng/g de heces secas, lo que dio una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.034$) de 219.52 ± 72.57 ng/g de heces secas, atribuible a la aplicación del tratamiento en los animales en estudio.

Cuadro 7.1: Concentraciones promedio de testosterona en excremento seco, de tres ocelotes antes y después del tratamiento con un complejo de vitaminas y minerales.

<i>ID</i>	<i>Concentración promedio de testosterona antes de la suplementación (ng/g)</i>	<i>Concentración promedio de testosterona después de la suplementación (ng/g)</i>	<i>Diferencia de Promedios (ng/g)</i>	<i>P</i>
Xcaret	1273.81 ± 783.03	1553.03 ± 809.002	279.22 ± 197.44	
Joselot	625.79 ± 197.51	866.43 ± 626.09	240.64 ± 170.15	
Chester	1132.29 ± 512.77	1271.05 ± 802.46	138.76 ± 98.11	
Todos	1010.64 ± 340.7 ^a	1230.17 ± 345.12 ^b	219.52 ± 72.57	0.034

Las literales diferentes indican resultados estadísticamente significativos ($P < 0.05$)

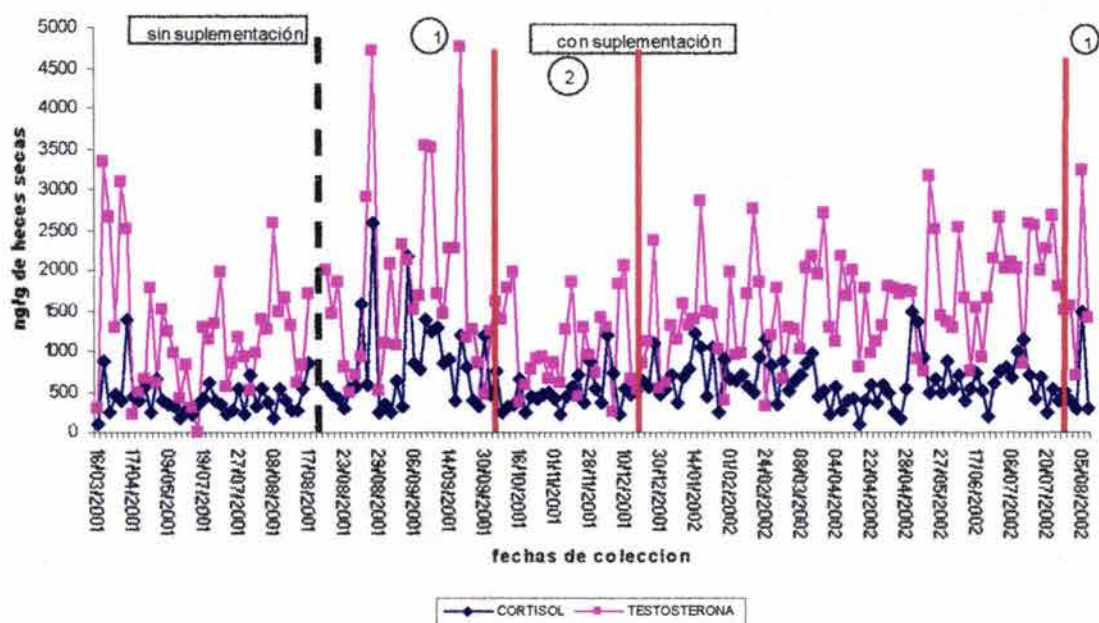
Las concentraciones máximas y mínimas de cortisol obtenidas en los excrementos de los tres individuos fluctuaron entre 94.72 y 2582.46 ng/g de heces secas, antes y después de la suplementación, respectivamente, y ambos valores se encuentran en el mismo individuo (Xcaret). En dos de los ocelotes (Xcaret y Joselote) se mantuvo la misma dinámica, como se puede observar en el Cuadro 7.2. En el otro macho (Chester) no ocurrió así, lo que se puede atribuir a la menor cantidad de muestra que se obtuvo de él. El promedio de la concentración de cortisol en el excremento de la población antes de la suplementación fue de 698.46 ± 27.75 ng/g de heces secas y después del inicio del tratamiento fue de 738.7 ± 94.48 ng/g de heces secas. La diferencia que existe entre ambos valores no llegó a ser significativa, pero en esta investigación no se quiso evaluar el efecto de la dieta sobre el nivel de estrés de los animales.

Cuadro 7.2: Concentraciones promedio de cortisol antes y después de la suplementación en la dieta

<i>ID</i>	<i>Concentración promedio de cortisol antes de la suplementación (ng/g)</i>	<i>Concentración promedio de cortisol después de la suplementación (ng/g)</i>
Xcaret	424.97 ± 244.29	648.39 ± 380.51
Joselote	699.96 ± 280.57	730.86 ± 408.93
Chester	970.48 ± 413.81	870.43 ± 347.69

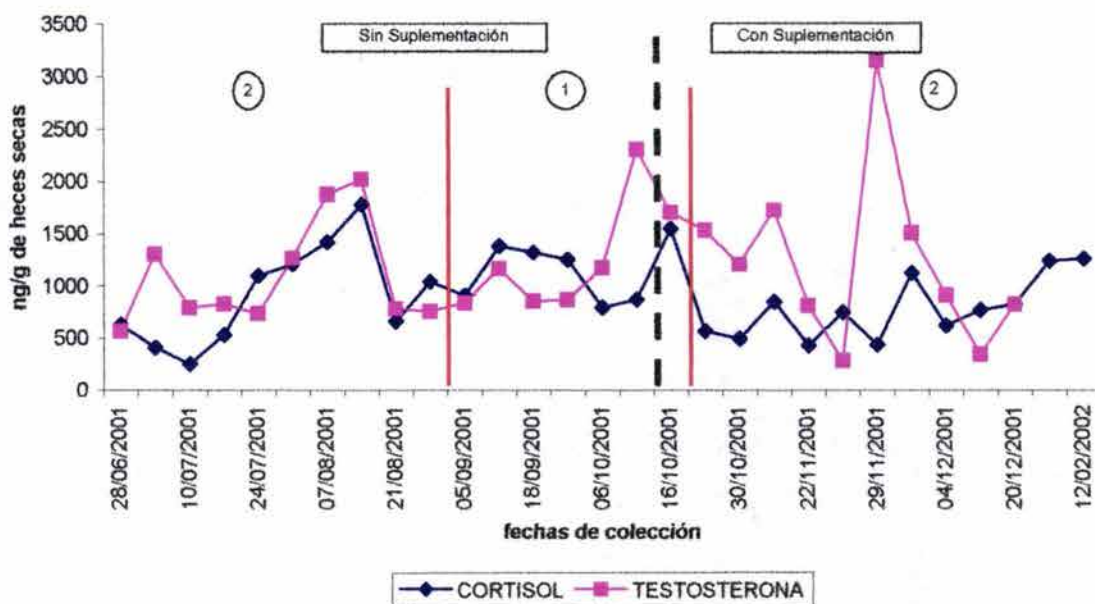
ID: identificación de los ocelotes

Al comparar en forma simultanea los resultados de testosterona y cortisol (en los tres individuos) durante todo el periodo de evaluación, se logró observar que ambos esteroides se comportaron en forma semejante: cuando aumentaron los niveles de cortisol, aumentaron los niveles de testosterona, en especial previo al periodo reproductivo de las hembras, como se logra observar en la figura 5, 6 y 7



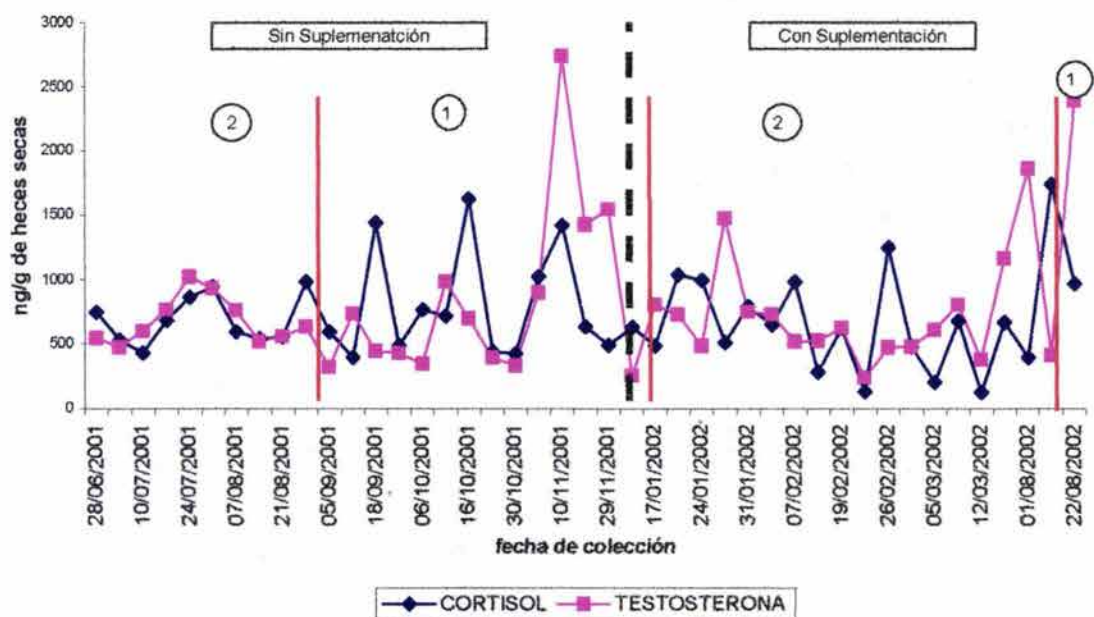
1= periodo previo a la época reproductiva; 2= época reproductiva

Figura 5: Dinámica de las concentraciones de testosterona y cortisol a través de todo el periodo de investigación de Xcaret, macho del zoológico de Chapultepec.



1= periodo previo a la época reproductiva; 2= época reproductiva

Figura 6: Dinámica de las concentraciones de testosterona y cortisol a través de todo el periodo de investigación de Chester, macho del zoológico de San Juan de Aragón.



1= periodo previo a la época reproductiva; 2= época reproductiva

Figura 7: Dinámica de las concentraciones de testosterona y cortisol a través de todo el periodo de investigación de Joselote, macho del zoológico de San Juan de Aragón

7.3 Discusión

Estudios del tipo aquí presentados, de hormonas esteroides en heces fecales, han sido realizados en otros países de Latinoamérica (Brasil) para ocelote y otros pequeños felinos. A diferencia de esta ocasión, se utilizaron kits comerciales de RIA para la determinación de andrógenos en heces de ocelotes (Morais *et al.*, 2002) y en otros felinos en investigaciones de Brown *et al.* (1996). En dichos reportes se encontraron niveles de testosterona en excremento ($1.78 \pm 0.31 \mu\text{g/g}$ de heces húmedas) semejantes a los obtenidos en esta tesis, para los datos posteriores a la suplementación alimenticia ($1.23 \pm 0.35 \mu\text{g/g}$ de heces secas). Esto se debe a que los autores comenzaron la suplementación vitamínica y mineral previo a los análisis, tratando de fortificar las dietas de los animales en estudio (Morais *et al.*, 2002); además, el anticuerpo para la realización de los RIA, que utilizaron, posee reacciones cruzadas con metabolitos de testosterona diferentes, a los que reacciona el

anticuerpo utilizado en el presente estudio. Los datos obtenidos en esta investigación indican que antes de recibir el suplemento vitamínico y mineral, los niveles de testosterona de los ocelotes estaban disminuidos, lo que va en desmedro de la reproducción de los animales (Swanson *et al.*, 2003). Los niveles de testosterona obtenidos en este estudio, antes y después del inicio de la suplementación alimenticia, están muy relacionados con los obtenidos por Swanson *et al.* (1994, 2003), quienes reportaron que los niveles de andrógenos circulantes en sangre eran diferentes entre los animales que eran continuamente suplementados y alimentados con carne y aquellos animales que sólo se alimentaban de carne magra.

Como se ha reportado, en animales con deficiencias en vitamina A existen menores niveles de testosterona y LH, posiblemente como resultado de los cambios lipídicos dentro de los testículos o por efecto directo sobre la pituitaria (Gambal, 1966). Además, las restricciones de energía dietaria retardan el crecimiento y retrasan la liberación pulsátil de GnRH y LH (Williams, 1999). En animales privados de la ingesta de alimentos la gametogénesis y esteroidogénesis gonadal están inhibidas; sin embargo, si estas deficiencias nutricionales son suplidas, los testículos parecen responder normalmente. Del mismo modo, la secreción de LH se suprime cuando el combustible metabólico está disminuido; la pituitaria de animales despojados de sus alimentos responde secretando niveles normales de LH cuando se estimula con GnRH (Wade, 1999). Por las variaciones en la producción de esteroides observados en este estudio puede deducirse que los animales antes de iniciar el estudio, se encontraban bajo la carencia de algunos nutrientes, carencia que fue reversible, ya que su capacidad de producir testosterona mejoró a medida que la suplementación se hizo en forma rutinaria. ón de testosterona en las células de Leydig *in vitro* es dependiente, entre otros, de microminerales y macrominerales primarios, por ejemplo, el fósforo y calcio. El aumento observado en la concentración de testosterona de los animales tratados podría atribuirse a la inclusión del Multivitamínico CENTRUM[®] en la dieta, que estaría contrarrestando la deficiencia de esos minerales. (Hignett, 1950; Maqsood, 1952).

La suplementación alimenticia es el factor ambiental más simple de controlar en la reproducción, y tiene efectos directos en este sistema, aumentando las oportunidades de crianza y la conformación de la respuesta a las indicaciones de largo plazo para la reproducción estacional, como lo es el fotoperíodo. Por eso la alimentación sirve como el primer y último factor para la regulación de la fertilidad (Wade, 1999).

Estudios anteriores en pequeños felinos mexicanos reportaron metabolitos de glucocorticoides fecales. La determinación de corticoides fue realizada con anticuerpos específicos para corticosterona (Brousset, 2003), con el propósito de determinar niveles de estrés en dichos animales. Además, anterior a este estudio existe un reporte de trabajo de cortisol en jaguares (*Panthera onca*) (Ojeda, 2002), donde se utilizó el mismo anticuerpo usado en este estudio, específico para cortisol, al igual que la misma hormona radioactiva. El estudio sirvió de referencia para realizar el análisis de laboratorio del presente estudio, y observar la dinámica de esta hormona a través de todo el estudio y su comportamiento con respecto a la testosterona (ver figuras 5, 6 y 7).

Las concentraciones obtenidas para cortisol, aun cuando no fueron significativamente diferentes, sí presentaron una variación (la baja significancia podría deberse al bajo número de individuos, $n = 3$). Los pequeños felinos tienen niveles de cortisol circulantes mayores que los más grandes (Swanson *et al.*, 1994; 2003; Moreira *et al.*, 2001), por lo que, probablemente, aun realizando otros esfuerzos de corrección del bienestar de los ocelotes, los niveles de estos esteroides siempre estarían elevados. Por ese motivo, se trató de evaluar la concentración con un método lo menos invasivo posible para no alterar aún más los niveles basales de la especie, los que realmente son específicos de especie (Nogueira y Silva, 1997). Otro punto importante a considerar son los reportes en grandes felinos (jaguar, por ejemplo), en los que se observó que, aún teniendo buena calidad de nutrición, presentan altas concentraciones de cortisol circulante (Brown *et al.*, 1994), lo que es muy semejante a lo encontrado en el presente estudio.

La dinámica que siguen las concentraciones de testosterona y cortisol a través del periodo de estudio permite suponer que las concentraciones de cortisol no están actuando en forma inhibitoria sobre la producción de testosterona, como se acostumbra reportar en muchas especies (ver figura 5, 6 y 7). Reportes en cerdos maduros (Hipikin y Raesaide, 1986) e inmaduros pre-puberales (Li, 1991) han descrito que altos niveles de cortisol circulante producen un incremento en las concentraciones de testosterona, incluso después de tratamientos agudos con ACTH. Otros autores reportaron que tratamientos crónicos con cortisol llegan a causar disminución en la producción de ese esteroide sexual (Liptrap y Raeside, 1975). Sin embargo, el mayor estímulo para la producción de testosterona lo produce la hidrocortisona que puede mejorar la esteroidogénesis, por estimulación de las células de Leydig con LH.

El estímulo producido por la liberación de cortisol es específico de algunas especies como el conejo. En ratas, bajo condiciones estresantes se elevan las concentraciones de testosterona, debido a que la rata dominante tiene altos niveles de una enzima que contrarresta las elevadas concentraciones de glucocorticoides para asegurar su reproducción (Monder *et al.*, 1994), y los individuos subordinados presentan típicamente elevadas concentraciones de glucocorticoides (Sapolsky, 1994). Este fenómeno no solamente está referido a roedores, ya que se ha reportado en primates no humanos y cánidos (*Lycaon pictus*) entre otras. Por lo tanto, en los ocelotes estudiados, las altas concentraciones de cortisol podrían estar favoreciendo la producción de testosterona, por un mecanismo de acción no aclarado.

7.4 Conclusiones

1. Los estudios no invasivos son una herramienta muy útil en animales silvestres, porque permiten una evaluación con el menor perjuicio hacia ellos y un menor riesgo para el operador.

2. Los métodos no invasivos son herramientas ya probadas en varias especies, por lo que sus resultados son tan fidedignos como los que utilizan evaluaciones sanguíneas.
3. El método no invasivo utilizado en este estudio permitió ver que existe un incremento en la producción de testosterona en un periodo previo a la época reproductiva de la especie, en la Ciudad de México.
4. La aplicación de suplementos vitamínicos y minerales en la dieta promovió el aumento en los niveles de testosterona en heces, lo que va en beneficio de la reproducción de los animales.
5. Las dietas con que los animales eran alimentados antes del estudio, aun estando mal balanceadas, no llegaron a causar un estrés nutricional, lo que se observó en la no diferencia de la concentración de cortisol antes y después de la suplementación, que no fue estadísticamente significativas ($P = 0.73$).
6. En esta especie los incrementos en las concentraciones de cortisol circulante no son inhibidores de la producción de testosterona, aunque se debe seguir estudiando la verdadera causa y el sitio y mecanismos de acción.

8. EXPERIMENTO III: Evaluación de metabolitos hormonales séricos en ocelotes antes y después de una suplementación vitamínica y mineral

8.1 Material y métodos

8.1.1 Obtención de las muestras

Durante 18 meses se estudiaron cinco ocelotes machos en tres zoológicos diferentes:

Zoológico de San Juan de Aragón	- Joselote, macho joven, sin descendencia - Chester, macho adulto, con descendencia.
Zoológico de Chapultepec	- Xcaret, macho adulto, sin descendencia.
Zoológico de León	- Guillo, macho joven, sin descendencia. - Viejo, macho adulto, con descendencia.

Al inicio del periodo de investigación los ocelotes recibían una dieta normal de carne de caballo o pollo (ver Cuadro 6.2) la que es deficiente en algunas vitaminas, minerales y ácidos grasos (ver Cuadro 2.1), y que fue suplementada con media tableta de CENTRUM® seis meses después de iniciado el periodo de investigación, para poder comparar los efectos de la suplementación vitamínica y mineral sobre diversos aspectos de la reproducción de los ocelotes machos en cautiverio.

De cada ocelote se extrajeron muestras sanguíneas de 8 ml para el análisis de hormonas esteroides (testosterona y cortisol), vitaminas y minerales, en un tubo con gel acelerador de la coagulación (para obtener suero sanguíneo). Ambas muestras fueron rotuladas y congeladas a -20° C hasta su análisis en los laboratorios de IAMS en E.U.A (análisis nutricional) y en el Laboratorio de Fisiología II, a cargo de la Dra. Martha Romano del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (análisis hormonal). Las muestras se obtuvieron de la vena safena, utilizando tubos con vacío marca Vacutainer. El procedimiento se realizó una vez que el animal estuvo anestesiado en un plano quirúrgico, previo al inicio de la primera serie de

electroejaculación y aproximadamente 15 minutos después de la sedación inicial. Las muestras se obtuvieron cada dos meses, en las mismas fechas que las colecciones de semen.

La cuantificación de testosterona en suero sanguíneo se realizó para 1) comparar y validar la técnica no invasiva, 2) observar el efecto de la aplicación de la suplementación alimenticia sobre la producción y liberación de este esteroide, y 3) evaluar su dinámica longitudinal a través del estudio. La cuantificación de cortisol sérico se realizó para comparar y validar la técnica no invasiva de cortisol.

8.1.2 Extracción de testosterona

La extracción de los esteroides sexuales del suero sanguíneo se realizó con 5 ml de éter anhidro a 4 °C, mezclados con 1 ml de suero sanguíneo, en un tubo cónico de vidrio (o guardando la proporción de 5:1, según la disponibilidad de muestra). Se mezcló por dos minutos en el vórtex para realizar una buena homogenización y extracción de los esteroides hacia el éter. Una vez mezclado, se dejó reposar por 15 minutos, para que la fase acuosa se separara de la fase etérea. Transcurrido este tiempo la solución se congeló en una mezcla de hielo seco con acetona industrial, durante 10 minutos. Esto ocasionó la congelación de la fase acuosa, pero no la de la fase etérea, que se decantó hacia tubos nuevos (previamente identificados). Los tubos se colocaron a baño maría a 36 °C hasta la evaporación absoluta de la fase etérea. El material seco se resuspendió en 500 µl de buffer RIA diluido y se dejó reposar por 30 minutos antes de centrifugar a 3000 r.p.m. Acto seguido, se traspasó la solución a nuevos tubos RIA, previamente rotulados e identificados, hasta su análisis en el laboratorio.

8.1.3 Extracción de cortisol

La extracción del cortisol del suero sanguíneo fue muy semejante a la realizada para testosterona. La diferencia radica en el disolvente orgánico que se utilizó, ya que para los

glucocorticoides se utiliza diclorometano en vez de éter anhidro. El resto del procedimiento fue exactamente el mismo.

8.1.4 Radioinmunoanálisis para testosterona

El análisis se realizó con el mismo protocolo del análisis de hormonas fecales, que, en resumen, consistió en utilizar testosterona radioactiva con tritio (^3H) del laboratorio **PerkinElmer Life Science Inc**, el mismo anticuerpo específico para testosterona (**Antitestosterone 1000T; # 07-189016 Laboratorio ICN**) y el líquido de centelleo fabricado en el Laboratorio de Fisiología II del CINVESTAV. El procedimiento fue el mismo ya descrito en el Experimento II.

8.1.5 Radioinmunoanálisis para cortisol

Los análisis se hicieron de la misma manera descrita en el Experimento II para cortisol, utilizando los mismos componentes (anticuerpo del Laboratorio **Chemicon**, marcador radioactivo del laboratorio **PerkinElmer Life Science, Inc.**) y el protocolo de RIA.

8.1.6 Validación de la prueba y análisis de los datos

Para esta parte de la investigación se utilizaron los mismos procedimientos de validación que en el radioinmunoanálisis para el método no invasivo. Es decir, que se investigó la relación de paralelismos entre diluciones seriadas de una mezcla de extractos de sueros de los animales en estudio y la curva estándar del ensayo. También se utilizaron sueros sanguíneos de gatos domésticos machos, para evaluar el porcentaje de recuperación de esteroides de los protocolos de extracción.

El análisis de los datos se realizó de la misma manera que en la determinación de hormonas fecales, con la misma hipótesis, fórmula (porcentaje de unión al anticuerpo), prueba de hipótesis y análisis estadístico (t pareada y SAS®).

8.2 Resultados

La media de la concentración de testosterona antes de la suplementación alimenticia con CENTRUM® fue de 2.18 ± 0.364 nmol/L de suero y después de la suplementación fue 1.44 ± 0.819 nmol/L de suero ($P > 0.05$). La suplementación vitamínica y mineral no afectó la concentración de testosterona.

La concentración promedio de cortisol antes de la suplementación, fue de 2.34 ± 1.01 ng/ml de suero y posterior al inicio de la suplementación fue de 2.95 ± 0.88 ng/ml de suero ($P > 0.05$), observándose que la suplementación vitamínica y mineral no tuvo efecto sobre los niveles de cortisol.

8.3 Discusión

La medición de hormonas sexuales como la testosterona y de hormonas de la corteza suprarrenal ha sido usada por mucho tiempo y resulta ser de gran importancia para evaluar la condición reproductiva y como un indicador de estrés.

Los datos encontrados en el presente estudio no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) en los niveles séricos de testosterona atribuibles al tratamiento con CENTRUM®. De hecho, esos niveles de testosterona fecal fueron más bajos que los reportados por otros autores para la misma especie (3.95 ± 1.17 nmo/L, Morais *et al.*, 2002; 6.94 ± 0.94 nmol/L Swanson *et al.*, 2003). Se ha reportado que las vitaminas A y E afectan la producción de testosterona (Cooper *et al.*, 1987; Dunn y Moss, 1992; Gambal, 1966; Ganguly *et al.*, 1980), ya que éstas actúan directamente sobre los

órganos productores de este esteroide. Por lo tanto, un aumento en la concentración sérica de vitamina A y E, producto de la suplementación vitamínica y mineral, debería reflejarse en la concentración sérica de testosterona de los animales tratados, pero no fue así.

Es importante resaltar que las técnicas de extracción y almacenamiento influyen en las determinaciones de esteroides. Las muestras deben ser colectadas con los materiales adecuados (agujas del calibre correspondiente) y manejadas con los cuidados necesarios para que no ocurran alteraciones, como la hemolización de los sueros sanguíneos o degradaciones metabólicas de los esteroides a medir. Como fue reportado por Owens *et al.* (1980), los resultados de radioinmunoanálisis de esteroides se alteran en muestras de sangre entera o suero sanguíneo que fueron incubadas a temperatura ambiente. También existen reportes de la disminución de la concentración de esteroides desde que la muestra es mezclada con el anticoagulante hasta la refrigeración, o en aquellas muestras coaguladas, especialmente para analizar progesterona en vacas (Holdsworth, 1980; Owens *et al.*, 1980; Oltner y Edqvist, 1982; Reimers *et al.*, 1983; Short, 1958; Vahdat *et al.*, 1979, 1981). A esto se le aúna el reporte de Short (1958), quien observó que la progesterona en sangre de bovinos con anticoagulante (oxalato, específicamente) se metaboliza en otro esteroide que se identificó como 20 β -hidroxipreg - 4- en- 3- ona. Van der Molen y Groen (1968) indicaron que esta conversión se ve favorecida por la presencia de glucosa, pero la incubación de las células rojas sin glucosa favorece la oxidación de este esteroide a 20 α -metabolito de progesterona, explicando la posible desaparición y aparición de la progesterona en plasma a partir de sangre entera que observaron Vahdat *et al.* (1981) y Oltner y Edqvist (1982). Estos efectos son aplicables a varias especies, pero aun siguen siendo específicos de especie (Wiseman *et al.*, 1983), por lo que en este estudio se puede sospechar que existieron dichos efectos, mas no puede asegurarse que los resultados aquí obtenidos se deba a ellos, ya que en especies como el ocelote no existe nada descrito con respecto al manejo de las muestras sobre los resultados de los análisis. Los bajos niveles de testosterona encontrados pueden atribuirse a problemas de colección de las muestras, ya que en algunas ocasiones el suero sanguíneo obtenido estaba hemolizado al momento de

realizar la prueba de RIA y este artefacto de técnica es bien conocido como causante de alteraciones al momento de la interacción con el anticuerpo específico en el análisis y durante el conteo de radioactividad. Por lo tanto, los datos pueden estar alterados.

Los datos de cortisol sérico no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$). Es probable que al momento de tomarse las muestras los animales se estresaban, lo que hace poco probable encontrar diferencias, ya que para medir cortisol el animal debe por lo menos estar más tranquilo que al momento de la captura, debido a que el cortisol aumenta en forma casi inmediata una vez ocurrido algún estímulo estresante. Por lo tanto, se recomienda que las colecciones de sangre para cortisol sean por lo menos después de 15 minutos de inyectado el anestésico en el animal, porque se supone que en estos tiempos los niveles de cortisol pueden llegar al nivel basal o lo más próximo posible a el (Carlstead *et al.*, 1993; Swanson *et al.*, 2003). Estos resultados también pueden atribuirse a otros factores, como la técnica de colección o análisis. La hemólisis pudo haber afectado la detección del cortisol, porque la literatura señala valores de 35.2 ± 4.8 ng/ml de cortisol en el suero, lo que es 11 veces mayor (2.34 ± 1.01 y 2.95 ± 0.88 ng/ml, antes y después de la suplementación vitamínica y mineral, respectivamente) a lo obtenido en esta investigación.

9. EXPERIMENTO IV: Evaluación de algunos nutrientes en ocelotes antes y después de una suplementación vitamínica y mineral

9.1 Material y métodos

Durante 18 meses seis ocelotes machos, de tres zoológicos diferentes (ver Cuadro 6.1) fueron muestreados cada dos meses, para realizar análisis de nutrientes en sangre. Los primeros seis meses los animales en estudio fueron alimentados con la dieta normal de cada zoológico (ver Cuadro 6.2), que es deficiente en algunas vitaminas y minerales. Los siguientes 12 meses, a la dieta normal de los ocelotes se le adicionó media tableta de CENTRUM® (ver Cuadro 2.2) al día para complementar las deficiencias.

Todos los análisis sanguíneos que a continuación se presentan se realizaron en los laboratorios de IAMS, Ohio, EUA, a través del Center for Research of Endangered Wildlife y del Dr. William Swanson del zoológico de Cincinnati.

9.1.1 Obtención de muestras

Las muestras se obtuvieron de la vena safena, una vez que el animal estaba anestesiado. En tubos con EDTA se extrajo 1 ml de sangre para los análisis de ácidos grasos y en tubos con gel acelerador de la coagulación se recolectaron 8 ml de sangre para los estudios de vitaminas y minerales.

9.1.2 Análisis de ácidos grasos

La sangre entera fue separada en plasma y en la fracción celular. El plasma y la capa de células de la serie blanca fueron removidos y el paquete de células rojas, congelado a -70 °C. Al descongelar los tubos a temperatura ambiente las membranas se separaron. Las células rojas se transfirieron a tubos de centrifuga de policarbonato de 30 ml y se mezclaron

con 20 a 25 ml de solución salina hipotónica (0.710 g de Na_2HPO_4 , 5 mM de fosfato a pH 8.0 en 1 lt de HPLC⁸ H_2O) a 4 °C. Se mezcló vigorosamente en vórtex por 1 a 2 minutos; se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 minutos. El pellet de membranas se obtuvo por centrifugación a 19500 G por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue cuidadosamente retirado para minimizar las alteraciones a las membranas. Se repitieron los pasos de la solución salina hipotónica y la centrifugación. Después se adicionaron 2 ml de solución salina hipotónica fría al pellet de membranas y se mezcló bien. La mezcla se transfirió a tubos de centrifuga limpios de 2 ml, que se centrifugaron a 30000 G a 4 °C por 15 minutos. El sobrenadante se eliminó (las membranas son opacas de un color suavemente rosa). Las membranas se transfirieron a viales de reacción de 5 ml con una micropipeta de 1 ml. Los viales se pesaron para obtener el peso exacto de la muestra.

Los perfiles de ácidos grasos fueron determinados por derivación de metil-éter, seguida por una cromatografía de gases con detección de flama de ionización, usando las modificaciones de Outen *et al.* (1976) que en resumen son: 200 mg de muestra en un contenedor con estándar interno fueron liofilizados en un liofilizador marca Laurel, MD, modelo Hetovac VR-1 ATR, y sometidos a **trans-esterificación** con 3 ml de **boro-triflorido al 10 % en metanol**. Las muestras fueron reactivadas por 50 minutos a 105 °C. Los **metil ésteres de ácidos grasos (MEAGS)** fueron extraídos con 1 ml de una mezcla de hexano y etil éter (50:50). Los extractos de MEAGS fueron transferidos a un muestreador automático e inyectados en un cromatógrafo de gas (Varian 3500) con 23 columnas DB (J & W Scientific, Folsom, CA) para la separación.

9.1.3 Análisis de vitaminas A y E en suero

Se mezcló 1 ml de BHT⁹ al 0.1 % en metanol con 400 μl de la muestra de suero en un tubo de ensayo con tapa atornillada. Las muestras se mezclaron en un vórtex

⁸ HPLC: High Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alta densidad)

⁹ Lab Sigma Chemical Co, St Louis, MO

aproximadamente por 5 segundos y se les agregó 1 ml de BHT al 0.1 % en hexano¹⁰. Los tubos de ensayo fueron mezclados por aproximadamente 5 segundos más y después fueron centrifugados a 2200 RPM por 5 minutos. La capa superficial fue transferida a un tubo de cultivo limpio.

La extracción fue con BHT al 0.1 % y repetida dos veces más, con la recuperación de la capa superficial en cada ocasión, para depositarla en el mismo tubo de cultivo. Las muestras fueron evaporadas hasta secarlas con nitrógeno en un baño de agua. Al residuo se le adicionó 1 ml de BHT al 0.1% en metanol y el contenido fue transferido a viales de automuestreo de 2 ml.

Las muestras fueron analizadas en un HPLC Agilent 1100 Series, con arreglo de diodo (Agilent, Wilmington, DE). La separación fue realizada con analizador de columnas Prodigy 3, 4.6 X 150 mm (Phenomenex, Torrance, CA), usando un programa de flujo de elución con 95 % de metanol: 5 % de agua¹¹. El flujo inicial fue de 1.0 mL/min. A los 5 minutos, el flujo fue aumentado a 2.5 mL/ min. A los 25 minutos el flujo regresó a 1.0 mL/min. La vitamina A fue detectada a los 324 nm y la vitamina E a los 292 nm.

9.1.4 Análisis de calcio y fósforo

Todas las muestras fueron analizadas por índice de colorimetría, usando un Hitachi 911 Chemistry Analyzer¹², siguiendo las indicaciones de uso del equipo. Se utilizó una alícuota de 500 µl de suero en una cubeta limpia; se mezcló con los reactivos que indica el fabricante, y se dejó incubar a 37 °C por el tiempo programado en el analizador. Posteriormente se realizó la lectura espectrofotométrica. Todos los valores fueron validados con datos de gato doméstico, suponiendo que existe una relación con el ocelote.

¹⁰ Hexano grado HPLC, Lab. VWR, West Chester, PA.

¹¹ Metanol y Agua de grado de HPLC, de Fisher Scientific Co, Pittsburg, PA.

¹² Roche Diagnostic, Indianapolis, IN.

9.1.5 Análisis de los datos

9.1.5.1 Prueba de hipótesis

Hipótesis: Los nutrientes sanguíneos a estudiar (vitamina A, E, calcio, fósforo, ácidos grasos omega-3 y omega-6) aumentarán significativamente ($P < 0.05$) después del inicio de la suplementación vitamínica y mineral en las dietas normales de los ocelotes.

$$H_0: (\mu_1 - \mu_2) = 0$$

$$H_a: (\mu_1 - \mu_2) \neq 0$$

Donde:

μ_1 : media de las diferentes variables medidas (vitamina A, vitamina E, calcio, fósforo, ácidos grasos omega-3 y ácidos grasos omega-6) antes del inicio de la suplementación vitamínica y mineral

μ_2 : media de las mismas variables después de que se comenzó la aplicación de media tableta de CENTRUM® diaria en la dieta.

“ H_0 ” es la probabilidad de que no exista diferencia entre las variables medidas antes y después de la aplicación del tratamiento, con una significancia de 0.05. “ H_a ” es la probabilidad de que exista una diferencia entre las medias de las variables antes y después de la aplicación del tratamiento, con una significancia de 0.05.

9.1.5.2 Análisis estadístico

Se realizó una prueba de t pareada (SAS®).

9.2 Resultados

Los resultados (Cuadro 9.1) muestran que sólo hubo un efecto significativo ($P = 0.001$) de la complementación sobre la concentración de vitamina E. La complementación no afectó en forma significativa al resto de las variables (vitamina A, ácidos grasos omega-3 y omega-6, calcio y fósforo).

Cuadro 9.1. Valores promedios obtenidos del análisis nutricional de la población en estudio, antes y después del inicio de la suplementación vitamínica y mineral

Suplem.	Vit A µg/ml	Vit E µg/ml	Omega 3 %	Omega 6 %	Calcio mg/ml	Fósforo mg/ml	Ca: P
Antes	0.67 ± 0.33 ^a	5.48 ± 1.54 ^b	0.56 ± 0.2 ^d	20.39 ± 3.28 ^e	9.93 ± 0.5 ^f	5.43 ± 0.57 ^g	1.8 ^h
Después	0.85 ± .31 ^a	7.08 ± 1.59 ^c	0.74 ± 0.36 ^d	18.08 ± 3.44 ^e	9.57 ± 0.36 ^f	5.07 ± 0.57 ^g	1.9 ^h
P	0.09	0.001	0.27	0.09	0.1	0.4	0.39

Ca: P = relación calcio fósforo en sangre

Suplem: Suplementación vitamínica y mineral.

Literales diferentes indican resultados estadísticamente no significativos ($P > 0.05$).

Literales iguales indican resultados estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

9.3 Discusión

Aun cuando no existen datos específicos reportados para esta especie referentes a los niveles de vitaminas y minerales en sangre, los obtenidos en esta investigación se compararon con los del gato doméstico (*Felis catus*) y guepardo (*Acinonyx jubatus*) (Cuadro 9.2) y no se encontraron muchas diferencias (Crissey *et al.*, 2003).

El aumento significativo de la concentración de vitamina E después del inicio de la suplementación vitamínica y mineral se puede atribuir a la aplicación del suplemento en la dieta, ya que esto fue lo único que varió durante el periodo de investigación. Además, la dieta normal de los zoológicos es totalmente deficiente en esta vitamina (Cuadro 6.2), por lo que al proporcionarla en la dieta se están corrigiendo esta carencia.

Cuadro 9.2. Datos bibliográficos de valores normales para vitamina A, vitamina E, calcio y fósforo, para gato doméstico y guepardo (*Acinonyx jubatus*)

	Vit A nmol/L	Vit E μ mol/L	Calcio ng/dl	Fósforo ng/dl
Gato doméstico (mínimo)	734 \pm 55.9	22.9 \pm 3.85	9.5	3.84
(máximo)	3357 \pm 2696.3	16.2 \pm 2.44	10.5	7.8
Guepardo (mínimo)	1068 \pm 195.8	21.2 \pm 0.62	N/R	N/R
(máximo)	3217 \pm 919.6	44.9 \pm 4.19	N/R	N/R

N/R: no reportado (Crissey *et al.*, 2003).

Como se observa en el Cuadro 10 los resultados de ácidos grasos omega-6 no fueron significativos por lo que no se rechazó la hipótesis nula (Ho). Es decir, no hubo diferencia entre las medias ($P > 0.05$). Se ha reportado que la vitamina E regula la síntesis y metabolismo, a nivel hepático, de los ácidos grasos esenciales, por lo que un aumento en esta vitamina reduciría las concentraciones sanguíneas de ácidos grasos omega 6 (linoleato y araquidónico) aumentando las concentraciones de ácido grasos omega 7 y omega 9 (en la forma 16:1 n7; 18:1 n9; 20:1 n9; 20:3 n9), producto de la estimulación de la síntesis de NOVO en el hígado (MacDonald *et al.*, 1984b). Por lo tanto, con los resultados obtenidos se recomienda realizar nuevos estudios con un número mayor de individuos para comprobar los reportes de literatura respecto a las concentraciones de ácidos grasos omega-6.

La relación entre los minerales calcio y fósforo no se vio alterada desde el inicio del estudio aun cuando los animales eran alimentados con dietas deficientes en esos minerales (ver Cuadro 9.1) (Ullrey y Bernard, 1989). Esto se puede atribuir a que el calcio no se encuentra estático sino en un estado constante de movilización y depósito, a medida que tiene lugar el crecimiento y mantenimiento óseo y que fluctúan las demandas orgánicas de calcio plasmático. El nivel de calcio plasmático circulante es controlado estrictamente mediante mecanismos homeostáticos y es independiente de la ingesta dietética de calcio de un animal (Case *et al.*, 1997). Al igual que el calcio, el fósforo proporciona soporte estructural al esqueleto y también es liberado al torrente circulatorio como respuesta a los

mecanismos homeostáticos. Estos mecanismos de control homeostático involucra a la hormona paratiroidea, que es liberada al torrente sanguíneo como respuesta a un ligero descenso del calcio plasmático, lo que estimula la síntesis de vitamina D activa en el riñón e incrementa los niveles de reabsorción de calcio y fósforo desde los huesos y en los túbulos renales aumentando la reabsorción de calcio y reduciendo la reabsorción de fósforo. Esto tiene como consecuencia un aumento en la retención de calcio en el organismo y un aumento de las pérdidas urinarias de fósforo. Este mayor aprovechamiento de calcio y fósforo también se realiza en el intestino aumentándose la absorción de estos minerales (*Case et al.*, 1997).

9.4 Conclusiones

1. La suplementación de las dietas normales de zoológicos con base en carne de caballo y pollo (ver Cuadro 6.2) con un complejo nutricional (CENTRUM[®]) mejora los niveles nutricionales en sangre de vitamina E.
2. La relación calcio y fósforo sanguínea no se vera alterada con una dieta desbalanceada en esos minerales, ya que el organismo tiene un control homeostático estricto sobre ellos, excepto en alteraciones graves y crónicas, donde llega a producir algunas patologías.

10. Correlaciones de los resultados

Se realizaron correlaciones de Pearson para observar las relaciones que existieron entre los resultados de las diferentes variables estudiadas a través de todo el periodo de investigación (Cuadro 10.1).

Cuadro 10.1: Correlaciones de Pearson más significativas entre las diferentes variables estudiadas

	Concen	Conteo celular	Prod esperm	Testost	Cortisol	Vit A	Omega-6
Concen	-----	63 % P 0.23	53 % P 0.53	76 % P 0.13	47 % P 0.42	94 % 0.01	45 % P 0.44
Conteo celular	63 % P 0.23	-----	94 % P 0.01	90 % P 0.03	59 % P 0.28	54 % P 0.35	80 % P 0.09
Prod esperm	53 % P 0.36	94 % P 0.01	-----	87 % P 0.05	70 % P 0.18	40 % P 0.5	87 % 0.05
Testost	76 % P 0.13	90 % P 0.03	87 % P 0.05	-----	84 % P 0.07	75 % P 0.13	60 % P 0.28
Cortisol	47 % P 0.42	59 % P 0.28	70 % P 0.18	84 % P 0.07	-----	55 % P 0.33	33 % P 0.58
Vit A	94 % 0.01	54 % P 0.35	40 % P 0.5	75 % P 0.13	55 % P 0.33	-----	19 % P 0.75
Omega-6	45 % P 0.44	80 % P 0.09	-87 % 0.05	60 % P 0.28	33 % P 0.58	19 % P 0.75	-----

Concen: concentración espermática; Conteo celular: conteo total de células espermáticas de los eyaculados; Prod esperm: producción espermática por unidad de volumen testicular; Testost: concentración de testosterona en excremento; Cortisol: concentración de cortisol en excremento; Vit A: concentración de vitamina A en sangre; Omega-6: porcentajes de ácidos grasos omega-6 en sangre.

Las correlaciones más importantes fueron:

- Concentración espermática y concentración de vitamina A en sangre (94 % de correlación, $P = 0.01$), lo cual concuerda con reportes en otras especies, que señalan a la vitamina A como un componente importante en la espermatogénesis.

- Conteo total de células espermáticas por eyaculado y producción de espermatozoides por unidad de volumen testicular (94 % de correlación $P = 0.01$), que en la biología de la espermatogénesis es normal, ya que si aumenta la producción de

espermatozoides a nivel testicular existirá un aumento en el número de espermatozoides eliminados por la eyaculación.

- Cantidad de células espermáticas en los eyaculados en relación con las variaciones en la concentración de testosterona, se observó una correlación positiva y significativa con el conteo total de espermatozoide en los eyaculados ($R = 90 \%$, $P = 0.03$) y con la producción de espermatozoides por unidad de volumen testicular ($R = -87 \%$, $P = 0.05$). Esto tiene relación con la función de la testosterona en los testículos, específicamente sobre las células de Sertoli ya que es el lugar donde actúa, en conjunto con la FSH.

- Producción espermática por unidad de volumen testicular y concentración de ácidos grasos omega-6 ($R = 87 \%$, $P = 0.05$). Esta relación se puede atribuir a los efectos negativos que ejercen los ácidos grasos omega-6 sobre las células de los túbulos seminíferos y las células de Sertoli, por eso una disminución de los ácidos grasos produciría un aumento en la espermatogénesis (Long y Ingle, 1952; Judy, JK, 1968, citados por Threlfall *et al.*, 1996)

- Concentraciones fecales de cortisol y testosterona ($R = 84 \%$, $P = 0.07$), aunque esta correlación no es estadísticamente significativa, al observar los datos gráficos (figura 5, 6 y 7) se ve la relación dinámica que estas dos hormonas tienen durante todo el periodo de investigación.

11. Discusión general

Siendo la reproducción fundamental para la perpetuidad y éxito de las especies, la fisiología reproductiva juega un rol crítico en el campo de la biología de la conservación y de la preservación de la diversidad genética y biológica. La pobre información histórica de la reproducción de los felinos silvestres, en especial de los **pequeños felinos latinoamericanos**, con la que se cuenta demanda investigación para el desarrollo de métodos de fertilidad o propagación de programas de reproducción asistida en estas especies. Por ser una familia de gran importancia en los ecosistemas y de gran distribución,

los felinos deberían ser más estudiados, pero las investigaciones se han centrado en los grandes felinos, dejando a los pequeños con bastantes vacíos de información.

Al proporcionar dietas mal balanceadas y deficientes en algunos elementos, se está proporcionando un ambiente no apto para la reproducción. Este fue el caso de los ocelotes en cautiverio que estuvieron bajo investigación, ya que las dietas que les daban a estos animales eran deficientes en vitaminas y minerales (National Research Council, 1986) y excesivos en ácidos grasos omega-3 y omega-6 (MacDonald, 1984a).

Los resultados obtenidos durante los primeros seis meses de la investigación (período sin suplementación), a través de la evaluación de semen con electroeyaculación, permitieron observar que la concentración espermática fue menor en comparación con los indicados en la literatura para la especie (ver anexo 2) (Morais *et al.*, 2002; Swanson *et al.*, 1994; 2003). Esto puede ser atribuido a la deficiencia de vitamina E, porque en las dietas normales de los ocelotes en cautiverio (ver Cuadro 6.2) esta vitaminas se encuentran en cantidades mínimas o no está presente y probablemente esto estaba causando una degeneración del epitelio germinal del testículo (Scott, 1978), incluso llevando a una inhibición irreversible de la espermatogénesis (Wu *et al.*, 1973). Al aumentar las concentraciones de vitamina E en la dieta, que se vio mejorado en los niveles sanguíneos ($P = 0.001$), el ambiente biológico testicular se mejoró, como consecuencia de que esta vitamina juega una función directa sobre la espermatogénesis, motilidad y morfología espermática (Julien y Murray, 1977; Scott *et al.*, 1998; Verzina *et al.*, 1996). A nivel endócrino, esta vitamina se asocia con alteraciones de la LH, FSH, testosterona o inhibina (Copper, 1987) y con la producción de prostaglandinas, por su papel en el control de la fosfolipasa A, que es una pieza clave en el ciclo del ácido araquidónico, precursor de la síntesis de prostaglandinas (Pappu *et al.*, 1978). El efecto de la suplementación vitamínica y mineral se pudo observar en el aumento significativo de los niveles de testosterona en excremento ($P = 0.034$), en la concentraciones espermática ($P = 0.01$) y en la producción de

espermatozoides por unidad de volumen testicular ($P = 0.04$), después del inicio de la suplementación.

Al comparar los resultados obtenidos con otros de la misma especie, pero en otras latitudes del mundo, pudimos observar que inicialmente la producción de espermatozoides de los ocelotes estaba por debajo de la media reportada ($9.85 \pm 18.21 \times 10^6$ (Brasil y diferentes zoológicos de Latinoamérica) en animales en cuya dieta la suplementación con media tableta de CENTRUM® ya era rutinaria (Morais *et al.*, 2002; Swanson *et al.*, 1994; 2003). En el caso de los zoológicos de Latinoamérica en los que no se suplementaba (la mayoría), las concentraciones fueron muy bajas: más de la mitad de los eyaculados contenían menos de 1 millón células espermáticas (Wildt *et al.*, 1995). Una vez comenzada la suplementación alimenticia, las concentraciones espermáticas aumentaron ($51.5 \pm 35.75 \times 10^6$) hasta alcanzar a los animales de suplementación continua de otros países, que, según diferentes autores, varía entre 11 y 45×10^6 espermatozoides/ml (Howard, JG.; 1993; Morais *et al.*, 2002; Swanson *et al.*, 1994a; 2003; Wildt *et al.*, 1995). Esta fue una de las razones de la elección de las tabletas de CENTRUM®, ya que la mayor parte de los reportes de mejoría en la fertilidad y calidad seminal en otras especies surgen usando este mismo complemento alimenticio. Además, es de fácil adquisición y la AZAA la tiene dentro de las dietas de la mayoría de los felinos silvestres en cautiverio (Ullrey y Bernard, 1989).

Este aumento en la concentración espermática se puede corroborar al observar la correlación de Pearson que tiene esta variable con la concentración de vitamina A en sangre ($R = 94.5 \%$, $P = 0.01$) ya que la vitamina A actúa sobre la liberación de GnRH, pero también en actividades específicas, que incluyen mitosis, diferenciación celular, síntesis de ARN y proteína, síntesis y sulfatación de esteroides (Ganguly *et al.*, 1980). Además, una deficiencia en esta vitamina actúa directamente sobre las células testiculares, ya que existen uniones proteicas de retinoides ubicadas en el epidídimo distal, túbulo deferente, vesícula seminal y próstata, que producen degeneración testicular (Bieri y Prival, 1966) y de las células germinales, dejando al túbulo seminífero sólo con células de Sertoli,

espermatogonia tipo A y unos pocos espermatoцитos en pre-leptoteno (Van Pelt y De Rooji, 1991) Así mismo, existen unas proteínas de unión ubicadas en la cabeza y cola del epidídimo, proteína citoplasmática unida a retinol (CRBP) y la proteína citoplasmática unida a ácido retinoico (CRABP)(Kato *et al.*, 1985; Porter *et al.*, 1983), que tienen relación con el buen funcionamiento del epidídimo en la maduración espermatogénica (Robaire y Hermo, 1988).

Como las dietas normales de los ocelotes en cautiverio en Latinoamérica, incluyen carne de caballo o pollo y contienen excesos de ácidos grasos omega-6, lo que se conjunta con la deficiencia de los felinos para la regulación de éstos, se produce un aumento de ácidos grasos omega-6 circulantes (MacDonald, 1984b). Pero los niveles sanguíneos adecuados de vitamina E regulan la síntesis y metabolismo de los ácidos grasos esenciales omega-6 (linoleato y araquidonato) reduciendo su concentración por transformación a omega-7 y omega-9 (MacDonald, 1984b; Riviers y Frankel, 1980). Esto hace sospechar que la disminución de los ácidos grasos omega-6 en los animales de estudio pudo estar relacionada con el aumento significativo de vitamina E en sangre de los ocelotes ($P = 0.001$), pero como la disminución de omega-6 no fue estadísticamente significativa ($P = 0.09$), no se puede atribuir a ese efecto, por lo que se recomiendan estudios futuros con un mayor número de animales, porque este pudo ser el factor que influyera sobre la falta de significancia.

Como se observó, los resultados de la disminución de omega-6 no fueron estadísticamente significativos (probablemente por el pequeño número de animales estudiados), el análisis de correlación de Pearson mostró una fuerte asociación con la producción de espermatozoides por unidad de volumen testicular de los ocelotes ($R = 87\%$, $P = 0.05$), lo que concuerda con investigaciones realizadas en humanos, los cuales presentaban altos niveles de estos ácidos grasos en sangre, que les producía alteraciones a nivel de espermatogénesis y bajas concentraciones espermáticas. Al mejorar su nivel nutricional, sus eyaculados recuperaban también las concentraciones normales para la

especie (Long y Ingle, citado por Threlfall *et al.*, 1996). Este efecto también ha sido observado en carneros que presentaban elevadas concentraciones de omega-6 en sangre y baja calidad de eyaculados, una vez que se les redujo el aporte de este tipo de ácidos grasos, se observó el mismo efecto que en humanos (Judy, citado por Threlfall *et al.*, 1996).

A pesar de que siempre se ha descrito al cortisol como un anti-esteriodogénico por excelencia, producto de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, el cual modifica el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Li, 1991), durante el periodo de investigación, en los tres animales estudiados por medio de métodos no invasivos, los niveles de cortisol y testosterona tuvieron la misma dinámica de circulación durante todo el periodo (figuras 5, 6 y 7): mientras que uno aumentaba, la otra hacía lo mismo, en diferentes concentraciones. Esto no se pudo comprobar por medio de la correlación de Pearson ($R = 84\%$, $P = 0.07$), pero posiblemente el problema de la falta de significancia estadística que no nos permitió comprobar este efecto estadísticamente se puede atribuir al reducido número de animales en estudio (tres). Este tipo de relación ha sido reportada en otras especies como los cerdos (Liptrap y Raeside, 1975; Pitzel *et al.*, 1984) y los conejos (Fenske, 1980), en los cuales donde elevados niveles de cortisol circulante tienen una correspondiente elevación de testosterona, lo que se demostró por medio de inyecciones de ACTH. Sin embargo, todos los efectos son solo en elevaciones agudas de la concentración de cortisol y una vez que las condiciones se hacen crónicas, la producción de testosterona disminuye en forma abrupta (Li, 1991).

Los incrementos más marcados de testosterona con la concomitante elevación de la concentración de cortisol durante toda la investigación tuvieron relación con la época reproductiva de las hembras de la especie, en las latitudes estudiadas (ver figuras 5, 6 y 7). El incremento pudo estar relacionado con las actividades de esta época. Claro está, que al no estar en vida libre, los animales no tienen que luchar con otros animales por las hembras o territorios o buscar a la hembra en ese periodo, pero el efecto se lleva a cabo de la misma manera, aunque debe ser en menor proporción. Este efecto es más marcado en los animales

socialmente organizados, como en ratas, que la dominante tiene altas concentraciones de una enzima que contrarresta las elevadas concentraciones de glucocorticoides para asegurar su reproducción (Monder *et al.*, 1994). En especies silvestres, este mismo efecto llega a suceder (por ejemplo: perro salvaje africano (*Lycaon pictus*), mangosta enana (*Helogale parvula*)) y solamente se reproduce la pareja alfa o simplemente el macho dominante es el capaz de reproducirse efectivamente, pero durante todo el periodo reproductivo están en amenazas y peleas por las hembras, lo que conlleva a una elevación de cortisol, producto del estrés que todo esto significa (Sapolsky, 1994; Creel *et al.*, 1996, 1997; Welsh *et al.*, 1999).

Los incrementos en la producción de testosterona, producto del inicio de la temporada reproductiva de las hembras en los zoológicos en estudio, estuvieron relacionados con los aumentos en las concentraciones de cortisol y ambos estuvieron muy relacionados con un incremento en la producción de espermatozoides en la misma época. Esto es producto de una preparación para la época de apareamiento y, al observar los resultados (ver anexo 2), las mayores concentraciones espermáticas se obtuvieron después de la mitad de cada año (posterior al mes de agosto), incluso en algunos individuos solamente se obtuvo muestra durante ese periodo.

Las concentraciones de testosterona en los felinos silvestres tienen una relación relativa, pero más consistente a las características de la calidad seminal individual, más que taxonómica (Brown *et al.*, 1991b; Wildt, 1987b). En el caso de los ocelotes estudiados en la presente investigación se observó una relación estadísticamente significativa entre las concentraciones de testosterona y la cantidad de espermatozoides por eyaculado ($R = 90\%$, $P = 0.03$), y con la producción de espermatozoides por unidad de volumen testicular ($R = 87\%$, $P = 0.05$), que se puede atribuir al aumento que se observó en la concentración de testosterona fecal ($P = 0.034$) después de la suplementación vitamínica y mineral en la dieta, que se relaciona con el aumento significativo en la producción de espermatozoides por unidad de volumen testicular ($P = 0.04$). Esto está fundamentado en que la función

testicular esta regulada por la secreción de FSH y LH de la hipófisis, y el efecto primordial de la LH es la estimulación de la síntesis y secreción de la testosterona, por medio de las células de Leydig, efecto que está favorecido por la FSH, la que aumenta el número de receptores para LH en dichas células. La FSH en conjunto con la testosterona actúa sobre los túbulos seminíferos para estimular la espermatogénesis. Este efecto puede estar mediado por la activación de la función de las células de Sertoli (Speroff *et al.*, 1986)

Entre todos los factores que pudieron alterar los resultados cabe destacar las diferencias entre los individuos. Aún cuando se trató de usar una población de edad homogénea y con condiciones semejantes, siempre existen diferencias entre los animales, entre las cuales se pueden destacar las calidades de los encierros, los lugares de refugios, la disponibilidad de agua, entre otras. Además, los zoológicos estuvieron en ciudades distantes y en alturas también diferentes, que quizás pudieran tener alguna influencia en las características endócrinas y reproductivas. Estos factores pudieron observarse al momento del análisis estadístico, el cual arrojó una real diferencia entre los individuos, a pesar de pertenecer todos a la misma especie.

12. Conclusiones

1. Las dietas estándares de los ocelotes en los zoológicos estudiados (semejantes a todos los zoológicos de Latinoamérica) no contribuyen al funcionamiento completo de la espermatogénesis, debido a las deficiencias en algunos nutrientes.
2. La suplementación de las dietas de los ocelotes con media tableta de CENTRUM® Multivitamínico produjo un aumento en la concentración y producción espermática.
3. La motilidad espermática y la motilidad progresiva no se vieron afectadas por la calidad del alimento en el caso de los animales estudiados, pero se debe profundizar en esto, utilizando más animales.
4. La evaluación NO INVASIVA de los animales silvestres en cautiverio es una herramienta que permite estudiar en forma continua diferentes aspectos de la

fisiología de los animales, sin causar alteración alguna en los resultados y en los individuos.

5. Los estudios de concentración de **testosterona** y **cortisol** circulantes por medio de métodos no invasivos son de gran utilidad al momento de manipular a los individuos y las muestras, porque este tipo de técnicas no produce alteraciones en los resultados producto del manejo de los animales.
6. La concentración de testosterona fecal aumentó significativamente posterior al inicio de la suplementación en la dieta, lo que deja claro que una dieta más balanceada estimula la producción de este esteroide, lo que conlleva a una mejor calidad en la espermatogénesis.
7. Las concentraciones de cortisol circulante tienen un efecto positivo sobre la concentración de testosterona cuando son estímulos agudos, especialmente durante el periodo que precede a la época reproductiva.
8. El aumento en la concentración de testosterona fecal después del inicio de la suplementación vitamínica y mineral tuvo un efecto significativo sobre la producción espermática en los animales estudiados.
9. La adición del complemento alimenticio, como CENTRUM®, en las dietas de los ocelotes produjo un aumento significativo en las concentraciones circulantes de **Vitamina E** en sangre
10. La mejoría de la deficiencia de la **Vitamina A** que existía en las dietas tuvo un efecto positivo importante sobre la concentración espermática de los animales, lo que pudo comprobarse con las correlaciones entre las variables.
11. Los niveles sanguíneos de ácidos grasos omega-6 tienen relación con el aumento en la producción espermática en los individuos suplementados
12. Los trabajos multidisciplinarios y en cooperación con instituciones extranjeras favorecen la investigación y el descubrimiento de nuevas alternativas para la conservación de las especies, producto de las técnicas con que esas instituciones cuentan. El trabajo con las instituciones nacionales, permite dar a conocer las nuevas técnicas desarrollo e impulsar la investigación.

13. Investigaciones futuras

Los resultados obtenidos en la investigación presentada dejan nuevas interrogantes sobre la efectividad de las dietas en la reproducción de los pequeños felinos Latinoamericanos. Más que nada ahora se deben enfocar los estudios a evaluar los componentes de los alimentos y su efecto sobre el organismo de los felinos silvestres, como por ejemplo el papel que juegan los ácidos grasos poliinsaturados en la reproducción de los machos y la regulación del metabolismo de esos nutrientes. Otro punto importante que resaltó en esta investigación fue la asociación que existe entre la testosterona y el cortisol, pues al parecer es necesario un estímulo adrenocortical al inicio de la época reproductiva para un aumento en la producción de testosterona y en la espermatogénesis. Por lo tanto, es importante evaluar el efecto que tiene un estímulo con ACTH o Cortisol directamente sobre la producción de testosterona *in vitro* o ver la respuesta del organismo frente a una aplicación de cortisol en forma aguda en la época previa a la estación reproductiva.

Aun cuando los resultados más importantes lograron explicar el efecto de la suplementación alimenticia sobre la calidad seminal de los ocelotes, es importante recordar que este estudio solo tomo una población limitada al centro del país por lo que se recomienda realizar actividades semejantes con un número más amplio de individuos y con una distribución geográfica mayor, para observar si existe algún estímulo exterior a la dieta que favorezca la producción espermática en los ocelotes.

15. Literatura citada

1. Adlerkreutz H, Martin F. Oestrogen in human pregnancy faeces. *Acta Endocrinol.* 1976; 83: 410 – 419.
2. Ahluwalia B, Pincus G, Holman RT. Essential fatty acid deficiency and its effects upon reproductive organs of male rabbits. *J Nutrition* 1967; 92: 205 – 214.
3. Apgar J. Zinc and reproduction. *Ann Rev Nutr* 1985; 5: 43 - 50.
4. Apgar J. Zinc and reproduction: an update. *J Nutr Siochem* 1992; 3: 266 – 272.
5. Armario A, Castellanos JM. A comparison of cortico-adrenal and gonadal responses to acute immobilization stress in rats and mice. *Physiology and behaviour* 1984; 32: 517 – 519.
6. Aronson LR, Cooper ML. Penile spines in the domestic cat; their endocrine-behavior relations. *Anat Rec* 1967; 157: 71 – 78.
7. Aulerich RJ, Ringer RK, Slow CS. Electroejaculation of mink, *Mustela vison*. *J Anim Sci* 1972; 34: 230 - 241.
8. Bainbridge DR, Jabbour HN. Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review. *Vet Rec* 1998; 143 (6): 159-68.
9. Ballou J. Potential contribution of criopreserved germ plasma to the preservation of genetic diversity and conservation of endangered species in captivity. *Cryobiology* 1992; 29: 19 – 25.
10. Balm PHM. Stress Physiology in Animals. In: Usherwood PNR, Roberts JA, editors. *Sheffield Biological Science*. Sheffield Academic Press: CRC Press. 1991.
11. Balm PHM. Stress physiology in animals. In: Usherwood PNR, Roberts JA, editors. *Sheffield Biological Science...* Sheffield Academic press. England. 1999.
12. Bamberg E, Choi HS, Möstl E, Wurm W, Lorin D, Arbeiter K. Enzymatic determination of unconjugated oestrogens in faeces for pregnancy diagnosis in mares. *Equ Vet J* 1984; 16: 537 - 539.

13. Bambino TH, Hsueh AJW. Direct inhibitory effect of glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in vivo and in vitro. *Endocrinology* 1981; 108: 2142 – 2148.
14. Barone MA, Roelke ME, Howard JG, Brown JL, Anderson AE, Wildt DE. Reproductive characteristics of male Florida panthers: comparative studies from Florida, Texas, Colorado. *Latin America and North American Zoo's. J Mammalogy* 1994; 75(1): 150 – 162.
15. Bartke A, Smith MS, Michael SD, Peron FG, Dalterio S. Effects of experimentally induced chronic hyperprolactinemia on testosterone and gonadotropin levels in male rats and mice. *Endocrinology* 1977a; 100: 182 – 186.
16. Bartke A, Goldman BD, Bex F, Dalterio S. Effects of prolactin on pituitary and testicular function in mice with hereditary prolactin deficiency. *Endocrinology* 1977b; 101: 1760 – 1766.
17. Bauer JE. Fatty acid metabolism in domestic cats (*Felis catus*) and cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Proc Nutr Soc* 1997; 56: 1013 – 1024.
18. Bieri JG, Andrews EL. Fatty acids in rat testes as affected by vitamin E. *Biochem Biophys Res Commun* 1964; 17: 115 - 118.
19. Bieri JG, Prival EL. Effect of deficiencies of alpha tocopherol, retinol and zinc on the lipid composition of rat testes. *J Nutr* 1966; 69: 55 - 62.
20. Bisbal FJ. Distribution and habitat association of the carnivores in Venezuela. In Redford KH, Eisenberg JF, editors. *Advances in neotropical mammalogy*. Sandhill Crane Press, Gainesville, 1989: 339-362.
21. Brousset DM. Efecto del enriquecimiento ambiental sobre el bienestar de tres especies de felinos mexicanos en peligro de extinción (Ocelote, Margay y Jaguarundi) mantenidos en cautiverio (Tesis de Doctor en Ciencias). Ciudad de México (México DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.
22. Brown DG, Burk RF. Selenium retention in tissues and sperm of rats fed a torula yeast diet. *J Nutr* 1973; 103: 102 – 108.

23. Brown JL, Wildt DE, Phillips LG, Seindensticker J, Fernando SBU, Miththapala S, Goodrowe KL. Adrenal Pituitary Gonadal Relationships and Ejaculated Characteristic in Captive Leopards (*Panthera pardus*) isolated on the island of Sri Lanka. J Reprod Fert 1989; 85: 605-613.
24. Brown JL, Citino SB, Bush M, Lehnhardt J, Phillips JG. Cyclic patterns of luteinizing hormone follicle – stimulating hormone, inhibin and progesterone secretion in the Asian elephants (*Elephas maximus*). J Zoo wildlife Med 1991a; 22: 49 – 57.
25. Brown JL, Bush M, Packer C, Pusey AE, Monfort SL, O'Brien SJ, Janssen DL, Wildt DE. Developmental changes in pituitary-gonadal function in free ranging lions (*Panthera leo leo*) of the Serengeti plains and Ngorongoro crater. J Reprod Fert 1991b; 91: 29 - 40.
26. Brown JL, Wasser SK, Howard JG, Wells S, Long K, Collins Y, Raphael B, Schwarz R, Evans M, Hayt R, Valk T, Wildt DE, Graham LH. Development and utility of fecal progesterone analysis assess reproductive status in felids. Procc Am Assoc Zoo Vet. 1993.
27. Brown JL, Wasser SK, Wild DE, Graham LH. Comparative Aspects of Steroid Hormone Metabolism and Ovarian Activity In Felids Measured Non invasively In Feces. Biol Reprod 1994; 51: 776-786.
28. Brown JL, Terio KA, Graham LH. Fecal androgen metabolite analysis for non invasive monitoring of testicular steroidogenesis activity in felids. Zoo Bio 1996; 15: 425-434.
29. Brown JL, Wild DE. Assessing reproductive status in wild felid by noninvasive fecal steroid monitoring. Int Zoo Yearbook 1997; 35: 173 - 191.
30. Bush M, Seager SWJ, Wildt DE. Laparoscopy in zoo mammals. In: Harrison RM, Wildt DE, editors. Animal Laparoscopy. Baltimore: Williams and Wilkins, 1980: 169 – 182.

31. Byers AP, Hunter AG, Seal US, Graham EF, Tilson RL. Effect of season in seminal traits and serum hormone concentration in captive male siberian tigers (*Panthera tigris*). J Reprod Fertil 1990; 90: 119-125.
32. Cameron JL. Stress and behaviorally-induced reproductive dysfunction in primates. Sem Reprod Endocrinol 1997; 15: 37 – 45.
33. Carlstead K, Brown JL, Monfort SL, Killens R, Wildt DE. Urinary monitoring of adrenal responses to physiological stressors in domestic and non domestic felids. Zoo Biology 1992; 11: 165 - 176.
34. Carlstead K, Brown JL, Seidensticker J. Behavioral and adrenocortical response to environmental changes in leopards cats (*Felis bengalis*). Zoo Biol 1993; 12: 321 - 331.
35. Carvalho CF, Howard JG, Collins L, Wemmer C, Bush M, Wildt DE. Captive breeding of black footed ferrets (*Mustela nigripes*) and comparative reproductive efficiency in 1 year old versus 2 year old animals. J Zoo Wildlife Med 1991; 22: 647 – 662.
36. Choi HS, Möstl E, Bamberg E. Confirmation of pregnancy in mares by enzyme immunoassay of oestrogens in faeces. Zbl Vet Med Anim 1985; 32: 760 – 763.
37. Choi HS, Kiesenhofer E, Ganter H, Hois J, Bamberg E. Pregnancy diagnosis in sow by estimation of oestrogens in blood, urine and faeces. Anim Reprod Sci 1987; 15: 209 – 216.
38. Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. Interactions between the hypothalamic - pituitary- adrenal axis and the female reproductive system: Clinical implications. Anns Intern Med 1998; 129: 229 - 240.
39. Ciereszko A, Dabrowsky K. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across season study. Biol Reprod 1995; 52: 982 – 988.
40. Clarke IJ, Doughton BW. Effect of various anesthetics on resting plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin in ovariectomized ewes. J Endocrinol 1983; 98: 79 – 89.

41. Comhaire F, Mahmoud A. The role of food supplements in the treatment of the infertile man. *Reproductive Biomedicine* 2003; 7, (4) [Andrology Special Issue]: 385 –391.
42. Cooper DR, Kling OR, Carpenter MP. Effect of vitamin E deficiency on serum concentration of follicle stimulating hormone and testosterone during testicular maturation and degeneration. *Endocrinol* 1987; 120: 83 - 95.
43. Crawshaw PG Jr, Quigley HB. Notes on ocelot movement and activity in the pantanal region, Brazil. *Biotropica* 1989; 21(4): 377 – 379.
44. Creel S, Creel NM, Monfort SL. Social stress and dominance. *Nature* 1996; 379: 212.
45. Creel S, Creel NM, Mills MG, Monfort SL. Rank and reproduction in cooperatively breeding African wild dog: Behavioral and endocrine correlatives. *Behav. Ecol* 1997; 8: 298 – 306.
46. Crespo JA. Ecology of mammal community in Iguazú National Park, Misiones. *Rev Mus Argent Cienc Nat* 1982; 32 (2): 45-162.
47. Crockett C M, Bowers CL, Sackett GP, Bowden DM. Urinary cortisol response of longtailed macaques to five cage size, tethering sedation and room change. *Amm J Primatol* 193; 90: 55 – 74.
48. Cumming DC, Quigley ME, Yen SS. Acute suppression of circulating testosterone levels by cortisol in men. *J Clin Endocrinol Metabol* 1983; 57: 671 – 673.
49. Curry PT, Ziemer T, Van der Horst G, Burgess W, Straley M, Arthenton R W, Kitchin RM. A comparison of sperm morphology and silver nitrate stain characteristics in the domestic ferret and the black footed ferret. *Gamete Res* 1989; 22: 27 – 36.
50. Czekala NM, Durrant BS, Callison L, Williams M, Millard S. Fecal steroid hormone analysis as an indicator of reproductive function in the cheetah. *Zoo Biol* 1994; 13: 119 - 128.

51. Davidson BC, Traher CS. The importance of essential fatty acid evaluation and supplementation in feline diets. *J South Afr Vet Assoc* 1987; 3: 39-41.
52. Dierenfeld ES. Nutrition of captive cheetahs, food composition and blood parameters. *Zoo Biol* 1993; 12: 143-150.
53. Donoghue AM, Johnston WE, Seal US, Armstrong DL, Simmons LG, Gross T, Tilson RL, Wolff P, Wildt DE. Ability of thawed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific oocytes and bind and penetrate domestic cat eggs in vitro. *J Reprod Fertil* 1992; 96: 555 – 564.
54. Donoghue AM, Johnston WE, Seal US, Armstrong DL, Tilson RL, Wolff P, Petrini D, Simmons LG, Gross T, Wildt DE. In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*). *Biol Reprod* 1990; 43: 733 – 747.
55. Dufau ML, Tinajero JC, Fabbri A. Corticotropin – releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *The FASEB Journal* 1993; 7: 299 – 307.
56. Dunn TG, Moss GE. Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. *J Anim Sci* 1992; 70: 1580.
57. Durrant BS, Schuerman T, Millard S. Non-invasive semen collection in the cheetah. *AAZPA Annual Conference Proceedings*; Wheeling, W. Va.: American Association of Zoological Parks and Aquarium; 1985 564 – 567.
58. Eisenberg JF. *Mammals of the neotropics, Vol.1: the northern neotropics*. Univ. of Chicago Press, Chicago. 1990.
59. Emmons LH. A new genus and species of rat from Borneo (*Rodentia muridae*). *Proc Biol Soc Washington* 1993; 106 (4): 752 - 761.
60. Emmons LH. A felid study of ocelot (*Felis pardalis*) in Peru. *Rev. Ecolg (terre Vie)* 1988; 43: 133 – 157.
61. Erdman RA, Shaver RD, Vandersall JH. Dietary choline for the lactating cow: possible effects on milk fat synthesis. *J Dairy Sci* 1984; 67: 410.
62. Ewing LL, Brown BL. Testicular steroidogenesis. In: Johnson AD, Gomes WR, editors. *The Testis Vol. IV*. Academic Press, New York, 1977; 239 – 287.

63. Feldman E, Nelson R, editors. Canine and feline endocrinology and reproduction. 2nd Edition. W.B. Saunders, Philadelphia, USA; 1996.
64. Fenske M. Adrenocorticotropin and cortisol induced changes of integrated corticosteroid and androgen plasma levels in male rabbits. *Life Sci* 1980; 27: 2219 – 2221.
65. Fenske M. Role of cortisol in the ACTH – induced suppression of the testicular steroidogenesis in guinea pig. *J Endocrinol* 1997; 154: 407 – 414.
66. Fiennes RN, Graham-Jones O. Studies of nutritional disease (osteodystrophia fibrosa) of young lions associated with changes of the skeleton and symptoms of muscular weakness. *Proc. Zool. Soc London* 1960; 133: 573-591.
67. Flood PF, Thrush BJ, Clark CD, Rawlings NC, Cook S. Androgens in the faeces of male muskoxen. In: Schaftenaar W, Buitter RM, Dielman SJ, editors; *The First International Symposium on Faecal Steroid Monitoring in Zoo Animals*, 1992. Rotterdam, 1992; 84 – 89.
68. Foley CAH, Papageorge S, Wasser SK. Non-invasive stress and reproductive measures of social and ecological pressures in free-ranging African elephants (*Loxodonta africana*). *Conserv Biol* 2000.
69. Fougner JA. Artificial Insemination in fox breeding. *J Reprod Fertil Suppl* 1989; 39: 317 – 323.
70. Fowler, M. E.; Stress. In *Zoo and Wild Animal Medicine* 2nd editions. Fowler ME; editor. WB Saunders Co. Philadelphia, Pennsylvania 1986; 33 – 35.
71. Friedman SB, Manson JW, Hamburg DA. Urinary 17- hydroxycorticosteroid levels in parents of children with neoplastic disease: a study of chronic psychological stress. *Psychosomatic Medicine* 1963; 25: 364 - 376.
72. Fuller GB, Hobson WC, Reyes FL, Winter JSD, Faiman C. Influence of restraint and ketamine anesthesia on adrenal steroid, progesterone and gonadotropins in rhesus monkeys. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1984; 175: 487 - 490.

73. Gambal D. Effect of hormones on the testicular lipids of vitamin A deficient rats. *J Nutr* 1966; 89: 203.
74. Ganguly J, Rao MRS, Murthy SK, Sarada K. Systemic mode of action of vitamin A. *Vitam Horm* 1980; 38: 1.
75. Gao, HB; Shan, LK; Hardy, MP; Supression of endogenous corticosterona levels *in vivo* increases the Steroidogenic capacity of purified rat Leydig cells *in vitro*. *Endocrinol* 1996; 137: 1714 – 1718.
76. Gao, HB; Ge, RS; Lakshmin, V; Marandici, A; Hradý, MP. Hormonal regulation of oxidative and reductive activies of 11 beta – hidroyxsteroid delay droganase en rat Leydig cell. *Endocrinol* 1997; 138: 156 – 161.
77. Goodrowe KL, Howard JG, Schmidt PM, Wildt DE. Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in vitro fertilization. *J Reprod Fert Suppl* 1989; 39: 73 - 90.
78. Goodrowe KL, Walker SL, Ryckman DP, Mastromonaeo GF, Hay MA, Bateman HL, Waddell WT. Piecing together the puzzle of carnivore reproduction. *Anim Reprod Sci* 2000; (60-61): 389-403.
79. Goymann W, Möstl E, Van't Hof T, East ML, Hofer H. Non-invasive fecal monitoring of glucocorticoides in spotted hyena (*Crocuta crocuta*). *Gen Comp Endocrinol* 1999; 114: 340 - 348.
80. 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 Biol* 1995; 14: 223 – 237.
81. Graham LH, Brown JL. Cortisol metabolism in the domestic cats and implications for non-invasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids. *Zoo Biol* 1996; 15: 71 – 82.
82. Hafiez AA, Kirdassy ZHM, Malkh NM, Zayat EMI. Role zinc in regulating testicular function. Part 3. Histopathological changes induced by dietary zinc deficiency in testes of male albino rats. *Nahrung* 1990; 34: 65.

83. Hales DB, Payne AH. Glucocorticoid-mediated repression of P450scc mRNA and de novo synthesis in cultured Leydig cells. *Endocrinol* 1989; 124 (5): 2099 – 2104.
84. Heinrich, N; Meyer, MR; Furkert, J; Sassen, A; Beyermann, M; Barigk, W; Berger, H. Corticotropin releasing factor (CRF), agonist stimulate testosterone production in mouse Leydig cell through CRF receptor-1. *Endocrinol* 1998; 139: 651 – 658.
85. Hignett SL. Factors Influencing herd fertility in cattle. *Vet Rec* 1950; 62: 652.
86. Hipikin RW, Raesaide J. I: A possible stimulating effect of cortisol on testosterone production by purified porcine Leydig cell using a large – scale superfusion technique. *Biol Reprod* 1986; 34 (Suppl. 1): 164.
87. Howard JG, Pursel VG, Wildt DE, Bush M. Comparison of various extenders for freeze-preservation of semen from selective captive ungulates. *J Am Vet Med Assoc* 1981; 179 (11): 1157 – 1161.
88. Howard JG, Bush M, Hall LL, Wildt DE. Morphological abnormalities in spermatozoa of 28 species of non-domestic felids. *Proc. 10th Int. Congr. Anima. Reprod. And AI. Urbana* 1984; Vol. II: 57.
89. Howard JG, Bush M, Wildt DE. Semen collection analysis and cryopreservation in non-domestic mammals. In: *Morrow Current Therapy in Theriogenology 2*. W.B. Saunders Co. Philadelphia. Pennsylvania 1986; 1047-1053.
90. Howard JG, Wildt DE. Ejaculate and hormonal characteristics in the leopard cat (*Felis bengalensis*) and the sperm function as measured by in vitro penetration of zona-free hamster ova and zone-intact domestic cat oocytes. *Mol Reprod Dev* 1990; 26: 163 – 174.
91. Howard JG, Bush M, Morton C, Morton F, Wentzel K, Wildt DE. Comparative semen cryopreservation in ferrets (*Mustela putorius furo*) and pregnancies after laparoscopic intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1991; 92 (1): 109 - 118.

92. Howard JG, Donoghue AM, Barone MA, Goodrowe KL, Blumer ES, Snodgrass K, Starnes D, Tucker M, Bush M, Wildt DE. Successful induction of ovarian activity and laparoscopy intrauterine artificial insemination in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *J Zoo Wildlife Med* 1992a; 23: 288-300.
93. Howard JG, Barone MA, Donoghue DM, Wildt DE. The effect of pre-ovulatory anesthesia and ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. *J Reprod Fert* 1992b; 96: 175-186.
94. Howard JG. Semen collection and analysis in carnivore. In: Fowler M, Miller R, editors; *Zoo and Wildlife Medicine, Current Therapy 3*. W.B. Saunders Co. Philadelphia. Pennsylvania 1993; Chapter 32: 390-399.
95. Howard JG. Assisted reproductive techniques in non-domestic carnivores. In: Fowler M, Miller R, editors. *Zoo and Wildlife Medicine, Current Therapy 4*. W.B. Saunders Co. Philadelphia, Pennsylvania 1999; Chapter 61.
96. Huang BM, Stocco DM, Hutson JC, Norman RL. Corticotrophin – releasing hormone stimulates steroidogenesis in mouse Leydig cells. *Biol Reprod* 1995; 53: 620 – 626.
97. Hulse GK, Coleman GJ. The role of endogenous opioids in the blockade of the reproduction functions in the rat following exposure to acute stress. *Pharmacol Biochem Behav* 1983; 19: 795 – 799.
98. Hurley WL, Doane RM. Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. *J Dairy Sci* 1989; 72: 784.
99. Hwang DH, Carrol AE. Decrease formation of prostaglandins derived from arachidonic acid by dietary linolenate in rats. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 590 – 597.
100. Jacobs M, Lightman SL. Studies in the opioid control of anterior pituitary hormones. *J Physiol (Lond.)* 1980; 300: 53 – 60.
101. Johnson LM, Gay VL. Luteinizing hormone in the cat. I. Tonic secretion. *Endocrinol* 198; 109: 240 – 246.

102. Johnston LA, Donoghue AM, O'Brien SJ, Wildt DE. Rescue and maturation in vitro follicular oocytes collected from non domestic felid species. *Biol Reprod* 1991; 45: 898-906.
103. Jones CA, Refsal KR, Lippert AC, Nachreiner RF, Schawacha MM. Changes in the adrenal cortisol secretion as reflected in the urinary cortisol/creatinine ratio in dog. *Dom Anim Endocrinol* 1990; 7: 559 - 572.
104. Judy JK. Differences in the level of fertility among rams when measured by fertility and fecundity of ewes and methods for predicting this trait. PhD Dissertation, Ohio State University 1968.
105. Julien WE, Murray FA. Effect of selenium and selenium with vitamin E on in vitro motility of bovine spermatozoa. *Proc Amer Soc Anim Sci*. 69th Annual Meeting, University of Wisconsin, Madison 1977; 174.
106. Juniewicz PE, Jonhson BH. Influence of adrenal steroids upon testosterone secretion by the boar testis. *Biol Reprod* 1981; 25: 725-733.
107. Kato M, Blaner WS, Mertz JR, Dos K, Dewitt S. Influence of retinoid nutritional status and Cellular retinol and cellular retinoic acid binding protein concentrations in various rat tissues. *J Biol Chem* 1985; 260: 4832 – 4838.
108. Kodentsova VM, Vrzessinskaya OA, Spiriche VB. Male fertility: a possible role of vitamins. *Ukr Biokhim Zh* 1994; 66: 17-22.
109. Konecny MJ. Movement patterns and food habits of four sympatric carnivore species in Belize, Central America. In: Redford KH, Eisenberg JF editors; *Advances in neotropical mammalogy*. Sandhill Crane Press, Gainesville, Florida 1989; 243 – 264.
110. Kostic T, Andric S, Kovacevic R, Maric D. The effect of opioid antagonists in local regulation of testicular response to acute stress in adult rats. *Steroids* 1997; 62 (11): 703 - 708.
111. Kotrschal K, Hirschenhauser K, Möstl E. The relationship between social and stress and dominance is seasonal in greylag geese. *Anim Behav* 1998; 55; 171 – 176.

112. Krook L, Barret RB, Usui K, Molke RE. Nutritional secondary hyperthyroidism in the cat. *Cornell Vet* 1963; 52: 224 – 240.
113. Kubokawa K, Ishii S, Tajima H, Saitou K, Tanabe K. Analysis of sex in feces of giant pandas. *Zoolog Sci* 1992; 9: 1017 - 1023.
114. Lasley BL, Shideler SE. Methods for assessing reproduction in non domestic species. In: Fowler M, Miller M, editors. *Zoo and Wild Animal Medicine, Current Therapy 3*. W. B. Saunders Co. USA 1993; 79-86.
115. Kwineciski GG, Petire GI, DeLuca HF. Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat. *J Nutritional* 1989; 119: 741 – 744.
116. Lasley BW, Kirkpatrick JF. Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. *J Zoo Wildlife Med* 1991; 22: 23-31.
117. Lawson DM. Anesthetics and neuroendocrine function. In: Steger RW, Johns AJ, editors. *CRC Handbook of pharmacologic methodologies for the study of the neuroendocrine system*; Florida: CRC Press 1985; 385 – 424.
118. Leopold AS. *Wildlife of Mexico*. Berkeley; University of California Press 1959.
119. Li PS. Effect of cortisol on testosterone production by immature pig Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 38: 205 – 212.
120. Lincoln GA. Use of pulsed infusion of luteinizing hormone –releasing hormone to mimic seasonally induced endocrine changes in the ram. *J Endocrinol* 1979; 83: 251 – 260.
121. Lindburg DG, Durrant BS, Millard SE, Osterhuis JE. Fertility assessment of cheetah males with poor quality semen. *Zoo Biol* 1993; 12: 97-103.
122. Liptrap RM, Raeside JI. Increased in plasma testosterone concentration after injection of adrenocorticotrophin into boar. *Endocrinol* 1975; 66: 123 – 131.
123. Ludlow ME, Sunquist ME. Ecology and behavior of ocelots in Venezuela. *National Geographic research* 1987; 447 – 461.
124. MacDonald ML, Rogers QR, Morris JG. Nutrition of the domestic cat, a mammalian carnivore. *Annuals Reviews of Nutrition* 1984a; 4: 521 – 562.

125. MacDonald ML, Rogers QR, Morris JG, Cupps PT. Effects of linolenate and arachidonate deficiencies on reproduction and spermatogenesis in the cat. *J Nutrit* 1984b; 114: 719 – 726.
126. Madej A, Forsberg M, Edqvist LE. Urinary excretion of cortisol and oestrone sulfate in pregnant mink fed PCB and fractions of PCB. *Ambio* 1992; 21: 582 – 585.
127. Malak AG, Thibier M. Plasma LH and testosterone responses to synthetic gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) or dexamethasone-GnRH combined treatment and their relationship to semen output in bulls. *J Reprod Fertil* 1982; 64 (1): 107 – 113.
128. Maqsood M. Thyroid functions in relation to reproduction of mammals and birds. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1952; 27: 281.
129. Maric D, Kostic T, Kovacevic R. Effects of acute and chronic immobilization stress on rat Leydig cell steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996; 58 (3): 351 - 355.
130. Martin ICA. The principles and practice of electroejaculation of mammals. *Symp Zool Soc London* 1978; 43: 127 - 132.
131. Mason JW, Hardwood CT, Rosenthal NR. Influence of some environmental factor on plasma and urinary 17 – hydroxycorticosteroid levels in the rhesus monkey. *Amm J Physiology* 1957; 190: 429 – 433.
132. Mazzaro LM, Helmich JL. Vitamin E kinetics in harbors seals. *Proc Assoc Aquat Med* 1995; 26: 118.
133. McDowel LR. Vitamins in animal nutrition. Cunha TJ, editor. Academic Press, San Diego 1989.
134. McNeilly AS, Sharpe RM, Fraser HM. Increased sensitivity to the negative feedback effect of testosterone induced by hiperprolactinemia in adult male rat. *Endocrinol* 1983; 112: 22 – 28.
135. Mellen JD. Factor influencing reproductive success in small captive exotic felids (*Felis spp*): a multiple regression analysis. *Zoo Biol* 1991; 10: 95 -110.

136. Mellen JD. Adult sexual behavior using domestic cats (*Felis catus*) as a model for exotic small felids. *Zoo Biol* 1992; 11: 17-32.
137. Mellen JD. A comparative analysis of scent-marking social and reproductive behavior in 20 species of small cats (*Felis catus*). *American Zoologist* 1993; 33 (2): 151 – 166.
138. Millar MJ, Fisher MI, Elcoate PV, Mawson CA. The effects of dietary zinc deficiency on the reproductive system of male rats. *Can J Biochem Physiol* 1958; 36: 557.
139. Miller MW, Hobbs NT, Sousa MC. Detecting stress response in Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*) reliability of cortisol concentration in urine and feces. *Canadian Journal of Zoology* 1991; 69: 15 - 24.
140. Miller WJ, Pitts WJ, Clifton CM, Schimittles SC. Experimentally produced zinc deficiency in the goat. *J Dairy Sci* 1964; 47: 556.
141. Moberg GP, editor. Influence of stress on reproduction: measure of well-being. *Animal Stress*. Bethesda MD. American Physiological Society 1985; 245 – 267.
142. Moberg GP. Problems in defining stress and distress in animals. *J Am Vet Med Assoc* 1987; 181: 1246 – 1250.
143. Monder C, Hardy MP, Blandchard RJ, Blanchard DC. Comparative aspects of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Testicular 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: development of a model for the mediation of Leydig cell function by corticosteroids. *Steroids* 1994; 59 (2): 69 – 73.
144. Mondolfi E. Notes on the biology and status of the small cats in Venezuela. In: Miller S, Everett DD editors. *Cats of the world: biology, conservation, management*. National Wildlife federation: Washington, DC 1986; 501.
145. Monfort SL, Mashburn KL, Brewer BA, Creel SR. Evaluating adrenal activity in African wild dog (*Lycaon pictus*) by fecal corticosteroid analysis. *J Zoo Wildlife Med* 1998; 29: 129 – 133.
146. Morais RN, Muccialo RG, Gomes MLF, Lacerda O, Moraes W, Moreira N, Graham LH, Swanson WF, Brown JL. Seasonal analysis of semen characteristic,

- serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*Leopardus wiedii*) and tigrina (*Leopardus tigrinus*). *Theriogenology* 2002; 57: 2027-2041.
147. Moreira N, Monteiro-Filho ELA, Moraes W, Swanson WF, Graham LH, Pasquali OL, Gomes MLF, Morais RN, Wildt DE, Brown JL. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. *Zoo Biol* 2001; 20: 103 – 116.
 148. Morrow C, Wildt DE, Monfort SL. Reproductive seasonality in the female scimitar – horned oryx (*Oryx dammah*). *Animal Conservation* 1999; 2: 261 – 268.
 149. Morrow D. *Current Therapy in Theriogenology*. W.B. Saunders Company. Philadelphia, USA 1986.
 150. Möstl E, Choi H S, Wurm W, Ismaili M N, Bamberg E. Pregnancy diagnosis in cows and heifers by determination of oestradiol - 17 α in faeces. *Br Vet J* 1984; 140: 287 – 291.
 151. National Research Council, *Predicting feed intake of food producing animals*. National academy Press, Washinton DC 1987; 85.
 152. Navarro D. Status and distribution of the ocelot (*Felis pardalis*) in south Texas. (MSc. Thesis). Kingsville (Texas) USA: Texas A & M Univ 1985.
 153. Nelson RJ. *An introduction to behavioral endocrinology* 2nd. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA 2000.
 154. Noci I, Saltarelli O, Dubini V, Tantini C, Chelo E, Messori A, Scarselli G. Plasma concentrations of FSH and testosterone in male infertile patients. *Acta Eur Fertil* 1985: 16.
 155. Nogueira G, Silva J. Plasma cortisol levels in captive wild felines after chemical restrain. *Braz Med Biol Res* 1997; 30: 1359 – 1361.
 156. Nowell K, Jackson P. *Wild cats: status survey and conservation action plan*. Gland: IUCN World Conservation Union 1996.
 157. Ojeda J. Mediciones de conducta y cortisol fecal como indicadores no invasivos en jaguares (*Panthera onca*) cautivos y silvestres (Tesis de Maestría). México (DF):

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 2002.

158. Oliveira TG. Neotropical cats: ecology and conservation. Sao Luis, Brasil; EDUFMA 1994: 222.
159. Orr TE, Taylor MF, Bhattachararya AK, Collins DC, Mann DR. Acute immobilization stress disrupts testicular steroidogenesis in adult male rats by inhibiting the activities of 17α -hydroxylase and $17, 20$ - lyase without affecting the binding of LH/hCG receptors. *J Androl* 1994; 15: 302 – 308.
160. Ots I, Horak P. Great tits *Parus major* trade health for reproduction. *Proc R Soc Lond B* 1996; 263: 1443 – 1447.
161. Outen GE, Beever DE, Fenlon JS. Direct methylation of long-chain fatty acids in feeds, digesta and faeces without prior extraction. *J Sci Food Agric* 1976; 7 (5): 419 – 425.
162. Owens RE, Atkins DT, Rahe CH, Fleeger JL, Harms PG. Time-dependent loss of radioimmunoassayable levels of progesterone following ambient temperature incubation of heparinized bovine blood. *Theriogenology* 1980; 13 (4): 305 – 309.
163. Palme R, Möstl E. Biotin-streptavidin enzyme immunoassay for the determination of oestrogens and androgens in boar faeces. *Proceedings of the 5th Symposium on the Analysis Steroids*. Academia Cairo, Budapest 1993; 111 – 117.
164. Palme R, Robia C, Baumgartner W, Möstl E. Transport stress in cattle as reflected by an increase in faecal cortisol metabolites. *Vet Rec* 2000; 146: 108 – 109.
165. Palmer NC. Osteodystrophia fibrosa in cats. *Aust Vet J* 1968; 52: 151 – 155.
166. Pappu AS, Fatterpaker P, Sreenivasan A. Role of vitamin E in cellular processes. *World Rev Nutr Diet* 1978; 31: 190.
167. Parvinen M, Nikula H, Huhtaniemi L. Influence of rat seminiferous tubules on Leydig cell testosterone production in vitro. *Molec Cell Endocr* 1984; 37: 331 - 336.
168. Pereni K. The medical management and disease of mustelids. *Proc Am Assoc Zoo Vet* 1992: 116-135.

169. Phillips LG, Simmons LG, Bush M, Howard JG, Wildt DE. Gonadotropin regimen for inducing ovarian activity in captive wild felids. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 181: 1246 – 1250.
170. Pitzel L, Harting A, Fenske M, Holtz W, Konig A. The effect of long acting ACTH on plasma corticosteroids, testosterone and LH levels in the male pig. *Exp Clin Endocr* 1984; 83: 14 - 20.
171. Platz CC, Wildt DE, Howard JG. Electroejaculation and semen analysis and freezing in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *J Reprod Fertil* 1983; 67: 9.
172. Podestra EJ, Milani A, Steffen H, Neher R. Steroidogenic action of calcium ions in isolated adrenocortical cells. *Biochem J* 1980; 186: 391.
173. Pope CE, Zhang YZ, Dresser BL. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. *J Zoo Wildlife Med* 1991; 22: 87.
174. Porter SB, Ong DE, Chytil FR, Orgebin-Crist MC. Localization of cellular retinol binding protein and cellular retinoic acid – binding protein in rat testis and epididymis. *J Androl* 1985; 6: 197 – 212.
175. Pukazhenti BS, Wildt DE, Howard JG. The phenomenon and significance of teratospermia in felids. In: Concannon PW, Englan GCW, Farstad W, Lindforsberg C, Verstegen JP, Doberska C, editors. *Advance in reproductive in dog, cats and exotic carnivores*. Colchestes, UK: Journals of Reproductive and Fertility. Ltd. 2001; 423 – 433.
176. Rasmussen DD, Liu JH, Wolf PL, Yen SS. Endogenous opioid regulation of gonadotropin – releasing hormones release from the human fetal hypothalamus in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 57: 881 – 884.
177. Rengger JR. *Naturgeschichte Der Saeugethiere Von Paraguay*. Basel, 1830.
178. Resko JA. Endocrine correlates of infertility in male primates. *Am J Primatol Suppl* 1982; 1: 37 – 42.
179. Rivier C, Rivier J, Vale W. Stress induced inhibition of reproductive functions: Role of endogenous corticotrophin – releasing factor. *Science* 1986; 231: 607 – 609.

180. Rivier C, Rivest S. Effect of stress on the activity of the hypothalamus -pituitary - gonadal axis: peripheral and central mechanism; a review. *Biol Reprod* 1991; 45: 523 - 532.
181. Rivers JPW, Frankel TL. Fat in the diet of dog and cats. In: Anderson RS, editor. *Nutrition of the dog and cat*. Oxford: Pergamon Press 1980; 67 – 99.
182. Roth TL, Howard JG, Donoghue AM, Swanson WF, Wildt DE. Function and culture requirements of snow leopard (*Panthera uncia*) spermatozoa in vitro. *J Reprod Fertil* 1994; 101 (3): 563 – 569.
183. Saltz D, White GC, Bartmann RM. Urinary cortisol, urea nitrogen excretion and winter survival in mule deer fawns. *J Wildlife Management* 1992; 56: 640 - 644.
184. Sapolsky RM. Neuroendocrinology of the stress – response. In: Becker JB, Breedlove SM, Crews D editors. *Behavior Endocrinology*. MIT Press, Cambridge, MA 1992; 287 – 324.
185. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoides influence stress response? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine reviews* 2000; 21 (1): 55 – 89.
186. Schawarzenberger F, Möstl E, Palme R, Bamberg E. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Anim Reprod Sci* 1996; 42: 515-526.
187. Scott ML. Vitamin E. In: *Handbook of lipid Research* Vol 2. New York: Plenum Press 1978; 133.
188. Scott R, MacPherson A, Yotes RW, Hussain B, Dixon J. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *British Journal Urology* 1988; 82: 76-80.
189. Seager SWJ. Semen collection ands artificial insemination in captive wild cats, wolves and bears. *Procc Annu Meet Am Assoc Zoo Vet* 1974; 29.
190. Seager SWJ, Platz CC, Hodge W. Successful pregnancy using frozen semen in the wolf. *Int Zoo Yearbook* 1975; 15: 140.

191. Seager SWJ, Demorest CN. Reproductive in captive wild carnivores. In: Fowler M, Miller R editor. Zoo and Wildlife Medicine, Current Therapy 2. W.B. Saunders Co. Philadelphia 1986; 852-881.
192. Selye H. Stress. Acta Inc Montreal 1950.
193. Selye H. The evolution of the stress concept. Am Sci 1973; 61: 692.
194. Shille VM, Wing AE, Lasley BL, Banks JA. Excretion of radiolabels estradiol in the cat (*Felis catus*): A preliminary report. Zoo Biol 1984; 3: 201 – 209.
195. Shille VM, Haggerty MA, Shackleton C, Lasley BL. Metabolites of estradiol in serum, bile intestine and feces of the domestic cat (*Felis catus*). Theriogenology 1990; 34 (4): 779-794.
196. Shille VM, Kollias GV, Thatcher MJ, Waterman S. Determination of reproductive status in the serval and bobcat using a validated, direct radioimmunoassay of fecal estradiol. Biol Reprod Suppl 1991; 44: 121.
197. Slusher R, Bistner SI, Kircher C. Nutritional secondary hyperparathyroidism in a tiger. J Am Vet Med Assoc 1965; 147: 1109-1115.
198. Speroff L, Glass RH, Kase NG. Endocrinología ginecología e infertilidad. 3º edición; Ediciones Toray S.A., Barcelona, 1986.
199. Stratakis CA, Chrousos GP. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. Ann NY Acad Sci 1995; 771: 1 – 18.
200. Sunquist ME, Sunquist FC, Daneke DE. Ecological separation in a Venezuelan llanos carnivore community. In: Redford KH, Eisenberg JF editors. Advances in Neotropical Mammalogy. Gainesville, Florida: Sandhill Crane Press 1989; 197-232.
201. Swanson WF, Roth TL, Wildt DE. In vivo embryogenesis, embryo migration and embryonic mortality in the domestic cat. Biol Reprod 1994a; 51: 452-464.
202. Swanson WF, Citino SB, Quigley KB, Wildt DE, Cambre RC, Brousset DM, Morais R, Moreira N, O'Brien SJ, Johnson WE. Reproductive survey of the endemic felids latinamerican zoo's: male's reproductive and implication for conservation. Proc Am Assoc Zoo Vet. Pittsburgh, USA 1994b.

203. Swanson WF, Roth TL, Brown JL, Wildt DE. Relationships of circulating steroid hormones, luteal luteinizing hormone receptor and progesterone concentration and embryonic mortality during early embryogenesis in the domestic cat. *Biol Reprod* 1995; 53: 1022-1029.
204. Swanson WF, Brown JL, Wildt DE. Influence of seasonality reproductive traits of the males Pallas cat (*Felis manul*) and implication captive management. *J Zoo Wildlife Med* 1996a; 27 (2): 234 - 240.
205. Swanson WF, Howard JG, Roth TL, Brown JL, Alvarado T, Burton M, Starnes D, Wildt DE. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelot (*Felis pardalis*). *J Reprod Fertil* 1996b; 106: 87-94.
206. Swanson WF, Wildt DE. Strategies and progress in reproductive research involving small cats species. *Int Zoo Yearbook* 1997; 35: 152-159.
207. Swanson WF, Citino SB, Quigley KB, Wildt DE, Cambre RC, Brousset DM, Morais R, Moreira N, O'Brien SJ, Johnson WE. Reproductive status of endemic felid species in Latin American zoos and implications for ex-situ conservation. *Zoo Biol* 2003; 22: 421 – 441.
208. Syed V, Shafiq A, Ritzen EM. Stage specific inhibition of intestinal cell testosterone secretion by rat seminiferous tubules in vitro. *Molec Cell Endocr* 1985; 40: 257 - 264.
209. Terio KA, Brown JL. Assessing adrenal status in cheetahs by fecal corticoid analysis. *J Zoo Wildlife Med* 2000; 196 - 203.
210. Tewes ME, Everett DD. Status and distribution of the endangered ocelot and jaguarundi in Texas. In: Miller S, Everett DD, editors. *Cats of the world: Biology, conservation, management*. National Wildlife Federation, Washington DC 1986; 300.
211. Threlfall WR, Lepine AJ. The influence of diet on sperm quality and quantity. In: Carey DP, Norton SA, Bolser SM. *Recent advance in canine and feline*

- nutritional research. Proceeding of the 1996, IAMS International Nutrition Symposium. Wilmington Ohio, USA. Orange Frazer Press 1996: 99-114.
212. Ullrey DE, Bernard JB. Meat diets for performing exotic cats. *J Zoo Wildlife Med* 1989; 20: 20-25.
213. Ullrey DE, Bernard JB. Vitamin D: Metabolism, Sources Unique problems in zoo animals meeting needs. In: Fowler M, Miller R, editors. *Zoo and Wildlife Medicine, Current Therapy 4*. WB Saunders Co. Philadelphia Pennsylvania 1999; Chapter 11.
214. Van de Kar LD, Richardson-Morton KD, Rittenhouse PA. Stress: Neuroendocrine and pharmacological mechanism. In: Jasmin G, Cantin M editors. *Stress Revisited: Neuroendocrinology of Stress. Methods and Achievements in Experimental Pathology* 1991; 14: 133 – 173.
215. Van Pelt AMM, De Rooij DG. Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vit - A deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. *Endocrinol* 1991; 128 (2): 697-704.
216. Verzina D, Mauffette F, Roberts KD, Bleon G. Selenium-vitamin E supplementation in infertile man. Effects on semen parameters and micronutrients levels and distribution. *Biol Trace Elem Res* 1996; 53: 65-83.
217. Wade GN. Energy balance, effects on reproduction. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopaedia of Reproduction*, vol. 1. Academic Press, San Diego 1999; 1091 – 1100.
218. Wallace E, Calvin HI, Cooper GW. Progressive defects observed in mouse sperm during the course of three generations of selenium deficiency. *Gamete Res* 1983; 4: 377.
219. Wallach JD, Boever WJ. Disease of exotic animals; medical and surgical management. *Felidae*. WB Saunders Co ed. West Washington Square, Philadelphia 1983; Chapter 4.
220. Wasser SK, Papageorge S, Foley C, Brown JL. Excretory fate of estradiol and progesterone in the African elephant (*Loxodonta africana*) and patterns of fecal

- steroid concentrations throughout the estrous cycle. *Gen Comp Endocrinol* 1996; 318 - 329.
221. Wasser SK, Bevis K, King G, Hanson E. Noninvasive physiological measures of disturbance in the northern spotted owl. *Conserv Biol* 1997; 11: 1019 – 1022.
222. Wasser SK, Hunt KE, Brown JL, Cooper K, Crocket CM, Berchest U, Millspang JJ, Larson S, Monfort, SL. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in diverse array of non-domestic mammalian and avian species. *General and Comparative Endocrinology* 2000; 120: 260-275.
223. Watson PF. A review of techniques of semen in mammals. *Symp Zool Soc Lond* 1978; 43: 97 – 126.
224. Welch TH, Kemper-Green CN, Livingston KN. Stress and reproduction. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopaedia of Reproduction*. Academic Press, San Diego 1999; 662 – 674.
225. Whitten PL, Stavisky R, Aurell F, Russel E. Response of fecal cortisol to stress in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Am J Primat* 1998; 44: 57 – 69.
226. Wildt DE, Bush M, Whitlock BS, Seager SW. Laparoscopy: a method for direct examination of internal organs in zoo veterinary medicine and research. *Int Zoo Yearbook* 1978; 18: 194 – 197.
227. Wildt DE, Platz CC, Chakraborty PK, Seager SWJ. Oestrous and ovarian activity in a female jaguar (*Panthera onca*). *J Reprod Fertil* 1979; 56: 555-558.
228. Wildt DE, Chan SYW, Seager SWJ, Chakraborty PK. Ovarian activity circulating hormone and sexual behavior in the cat, I: relationship during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. *Biol Reprod* 1981; 25: 15-28.
229. Wildt DE, Bush M, Howard JG, O'Brien SJ, Meltzer D, Van Dyk A, Ebedes H, Brand DJ. Unique seminal quality in the South Africa cheetah and a comparative evolution in the domestic cats. *Biol Reprod* 1983; 29: 1019-1025.

230. Wildt DE, Chakraborty PK, Meltzer D, Bush M. Pituitary and gonadal response to LH releasing hormone administration in the female and male cheetah. *J Endocr* 1984; 101: 51-56.
231. Wildt DE, Howard JG, Chakraborty PK, Bush MM. reproductive physiology of the clouded leopard: a circannual analysis of adrenal-pituitary-testicular relationships during electroejaculation or after an adrenocorticotrophin hormone challenge. *Biol Reprod* 1986a; 34: 949-959.
232. Wild DE, Howard JG, Hall LL, Bush M. Reproductive physiology of the clouded leopard; I: electroejaculates contain high proportion of pleiomorphic spermatozoa throughout the year. *Biol Reprod* 1986b; 34: 937 - 947.
233. Wildt DE, Bush M, Goodrowe KL, Packer C, Pusey AE, Brown JL, Joslin P, O'Brien SJ. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature* 1987a; 329: 328 – 331.
234. Wildt DE, O'Brien SJ, Howard JG, Caro TM, Roelke ME, Brown JL, Bush M. Similarity in ejaculate-endocrine characteristics in captive versus free-ranging cheetahs of two subspecies. *Biol Reprod* 1997b; 36: 351-360.
235. Wildt DE, Phillips LG, Simmons LG, Goodrowe KL, Brown JL, Howard JG, Bush M. Seminal endocrine characteristic of the tiger and the potential for artificial breeding. In: Tilson RL, Seal US, editors. *Tigers of the world: the Biology, Biopolitics, management and conservation of an endangered species*. Noyes publications, Park Ridge, New Jersey 1987c; 255 - 279.
236. Wildt DE, Phillips LG, Simmons LG, Chakraborty PK, Brown JL, Howard JG, Teare A, Bush M. A comparative analysis of ejaculate and hormonal characteristics of the captive male cheetah, tiger, leopard and puma. *Biol Reprod* 1988; 38: 245-255.
237. Wildt DE. Potential application of IVF technology for species conservation. In: Bavister BD, Cummins J, Roldan ERS, editors. *Fertilization in Mammals*, Norwell, MA 1990; 349 – 364.

238. Wildt DE, Bush M, O'Brien SJ, Murray ND, Taylor A, Marshall-Graves JA. Semen characteristic in free living koalas (*Phascolarctos cinereus*). *J Repro Fertil* 1991; 92: 99 – 107.
239. Wildt DE, Donoghue AM, Jonhston LA, Schmidt PM, Howard JG. Species and genetic effects on the utility of biotechnology for conservation. *Symp Zool Soc Lond* 1992a; 64: 45 – 59.
240. Wildt DE, Monfort SL, Donoghue AM, Johnston LA, Howard JG. Embryogenesis in conservation biology or, how to make an endangered species embryo. *Theriogenology* 1992b; 37: 161-184.
241. Wildt DE, Brown JL, Bush M, Barone MA, Cooper KA, Grisham J, Howard JG. Reproductive status of cheetahs (*Acinonyx jubatus*) in North American zoos, the benefits of physiological survey for strategic planning. *Zoo Biol* 1993; 12: 45-80.
242. Wildt DE. Endangered species spermatozoa: diversity, research and conservation. In: Bartke A, editor. *Function of Somatic Cells in the Testes*. Springer Verlag. New York 1994; 1 – 24.
243. Wildt DE, Pukazhenthii B, Brown JL, Monfort S, Howard JG, Roth T. Spermatology for understanding managing and conserving rare species. *Reprod Fertil Develop* 1995; 7: 811-824.
244. Wildt DE. Male reproduction: Assessment, management and control of fertility. in wild mammals in captivity, principles and technique. In: Kleinman DG, Allen ME, Thompson KV, Lumpkin S. Chicago and London. The University of Chicago Press 1996; 429 – 450.
245. Wildt DE, Roth TL. Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids. *Int Zoo Yrbk* 1997; 35: 164 – 172.
246. Wildt DE, Wemmer C. Sex and wildlife: The role of reproductive biology in conservation. *Biodiv Conserv* 1999; 8: 965 – 976.
247. Williams GL. Nutritional factor and reproduction. In: Knobill E, Neill JD, editors. *Encyclopaedia of Reproduction*. Academic Press, San Diego. Vol. 3 1999; 412 – 422.

248. Wingfield JC, Whaling CS, Marler P. Communication in vertebrate aggression and reproduction: The role of hormone. In: Knobill E, Neill JD editors. *The Physiology of Reproduction*, 2nd eds. Raven Press, New York 1994; 303 – 342.
249. Wingfield JC, Jacobs J, Hillgarth N. Ecological constraints and the evolution of hormone – behavior interrelationship. *Ann NY Acad Sci* 1997a; 807: 22 – 41.
250. Wingfield JC, Hunt K, Breuner C, Dunlap K, Fowler G, Freed L, Lepson J. Environmental stress, field endocrinology, and conservation biology. In: Clemen and Buchhals, editors. *Behavior Approaches to Conservation in the Wildt*. Cambridge Univ. Press 1997b; 95 – 131.
251. Wooten E, Nelson MM, Simpson ME, Evans HM. Effect of pyridoxine deficiency on the gonadotrophic content of the anterior pituitary in the rat. *Endocrin* 1955; 56: 59.
252. Wu SH, Oldfield JE, Whanger PD, Weswig PH. Effect of selenium, vitamin E, and antioxidants on testicular function in rats. *Biol Reprod* 1973; 8: 625.
253. Zambrano AF, Díaz SV. *El Radioinmunoanálisis y su control de calidad*. Centro nuclear de México Nabor Carrillo e Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. México 1996.

ANEXOS

Anexo 1. Hoja de registro para las colecciones durante las sesiones de electroeyaculación.

ELECTROEJACULATION FORM

_____ NZP/RPP#

Date _____ Weight kg _____ lb _____ Species _____ Studbook # _____
 Location _____ Probe size _____ DOB _____ ISIS/House # _____
 Environment _____ Ejaculator _____ Wild/captive born _____ House name _____
 Clinicians _____ General health _____ Proven _____

COLLECTION	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Volts												
m A												
Volume												
Urine (+/-)												
% Motility												
Status												
pH												
Opacity												
Erection (+/-)												
Stimulus #												

ANESTHESIA (Check off all NZP drugs)

Drug	Dose	Route	Time	Result

FROZEN
 # Pellets _____
 Pre-freeze mot. _____
 Pre-freeze stat. _____
 Pre-freeze ct. _____
 Pre-fr. mot. ct. _____

OTHER SAMPLES
 Fixed sperm _____
 Salt stored eggs _____
 Skin _____
 Heparin _____
 Other _____

AI _____ **IVF** _____
 Female # _____
 Motility _____
 Status _____
 # Mot. sperm _____

SERUM SAMPLES
 # _____ Time _____
 pre _____
 post 1 _____
 post 2 _____
 post 3 _____
 15 min _____
 30 min _____
 45 min _____
 60 min _____

pH _____

	TESTES	Right	Left
Total spermic volume _____	Firmness*		
Sperm count/ml (in millions) _____	Length (cm)		
Total sperm count _____	Width (cm)		
Total percent motility _____	Volume**		
Total status _____	Total vol.***		

*1=hard,2=normal,3=flacid
 **Volume=LxW² x 0.524
 ***Total vol.=R vol.+L vol.

GENERAL COMMENTS: _____

Anexo 2 Datos completos de las colecciones de semen por medio de la electroeyaculación y su evaluación.

ID	Zoo	fecha	TX	Vol eyac	Vol esp	Mot	Status	pH	Concen	Cont Total ¹	Prod esp/test ³	Sin acros ²	Daño acros ²	Anorm 1° ²	Anorm 2° ²	Anorm Total ²
Chester	Aragón	14-02-01	sin	0.589				9								
Chester	Aragón	03-05-01	sin	0.115				9								
Chester	Aragón	20-07-01	sin	0.794				9								
Chester	Aragón	15-08-01	sin	0.575				9								
Chester	Aragón	11-10-01	sin	0.403				9								
Chester	Aragón	05-12-01	con	0.506	0.261	80	4	8	64	16.704	1.115	1	10	18	17	35
Chester	Aragón	31-01-02	con	0.672				9								
Guillo	León	24-03-01	sin	0.020	0.010	70	3	7,75	5,250	0.053	0.004	8	9	22	10	32
Guillo	León	25-05-01	sin	0.022				6,6								
Guillo	León	18-08-01	sin	0.008												
Guillo	León	15-10-01	sin	0.038												
Guillo	León	06-12-01	sin													
Guillo	León	02-02-02	con													
Guillo	León	23-03-02	con	0.231	0.231	70	3		77.9	17.995	1.673	7	13	35	15	50
Guillo	León	18-05-02	con	0.348	0.348				38.8	13.502	1.434	9	15	31	5	36
Guillo	León	20-07-02	con	0.475	0.475				41.1	19.523	1.801	6	11	24	18	42
Guillo	León	21-09-02	con	0.140	0.140				28.7	4.018	0.356	2	6	18	22	40
Guillo	León	23-11-02	con	0.220	0.116	20			16.854	1.955	0.185	3	15	25	9	34
Joselote	Aragón	14-02-01	sin	0.176	0.108	60	3	8,3	1.8	0.194	0.021	5	13	36	22	58
Joselote	Aragón	03-05-01	sin	0.229				8,7								
Joselote	Aragón	20-06-01	sin	0.649				8,8								
Joselote	Aragón	15-08-01	sin	0.183				8,8								
Joselote	Aragón	11-10-01	sin	0.435				9								
Joselote	Aragón	05-12-01	con	0.412				8,5								
Joselote	Aragón	31-01-02	con	0.371				8,33								
Joselote	Aragón	21-03-02	con	1.058				7,43								
Joselote	Aragón	16-05-02	con	0.286				8,5								
Joselote	Aragón	27-07-02	con	0.708				8,5								
Joselote	Aragón	19-09-02	con	1.269				8,76								
Joselote	Aragón	01-11-02	con		0.848			8,56	28.3	23.998	2.373	8	14	30	24	54

ID	Zoo	fecha	TX	Vol eyac	Vol esp	Mot	Status	pH	Concen ¹	Cont Total ¹	Prod esp/test ³	Sin acros ²	Dañoa cros ²	Anorm 1° 2	Anorm 2° 2	Anorm Total ²
Viejo	León	06-09-98	sin	0.058	0.058			8,7								
Viejo	León	24-03-01	sin					6,5								
Viejo	León	25-05-01	sin					6,5								
Viejo	León	18-08-01	sin					6,5								
Viejo	León	15-10-01	sin	0.070				8,1								
Viejo	León	06-12-01	sin													
Viejo	León	02-02-02	con	0.100				8,5								
Viejo	León	23-03-02	con	0.810												
Viejo	León	20-07-02	con	0.970				8,6								
Viejo	León	21-09-02	con	0.381	0.100	70	4	8,5	25.3	2.530	0.217	4	8	26	25	51
Viejo	León	23-11-02	con	1.784	1.111				9	9.999	0.568	2	6	21	11	32
Xcaret	Chapul	06-10-00	sin	0.232	0.232	80	3	8,3	12	2.784	0.129					
Xcaret	Chapul	13-02-01	sin	0.148	0.004	50	3	8,5	82.6	0.330	0.013	5	7	30	23	53
Xcaret	Chapul	02-05-01	sin	0.055	0.005	60	3	8,5								
Xcaret	Chapul	03-07-01	sin	0.421	0.421	85	4	8,6	32	13.472	1.072	6	12	27	15	42
Xcaret	Chapul	16-08-01	con	0.246				8,8								
Xcaret	Chapul	10-10-01	con	0.288	0.288	90	4,6	8,1	112	32.256	2.107	4	8	15	15	30
Xcaret	Chapul	08-12-01	con	0.343				8,2								
Xcaret	Chapul	30-01-02	con	0.480				8,35								
Xcaret	Chapul	20-03-02	con	1.248				8,8								
Xcaret	Chapul	14-05-02	con	1.119				8,43								
Xcaret	Chapul	26-07-02	con	0.932				8,8								
Xcaret	Chapul	18-09-02	con	0.998	0.998			8,34	194	193.612	10.068	7	10	30	23	43
Xcaret	Chapul	30-10-02	con	0.721	0.721			8,21	161	11.608	0.479	9	15	53	10	63

1: millones de espermatozoides/ml. 2: porcentaje de espermatozoides. 3: espermatozoides/cm³

TX: Tratamiento. Vol eyac: Volumen eyaculado. Vol esp: Volumen con espermatozoides. Concen: Concentración espermática.

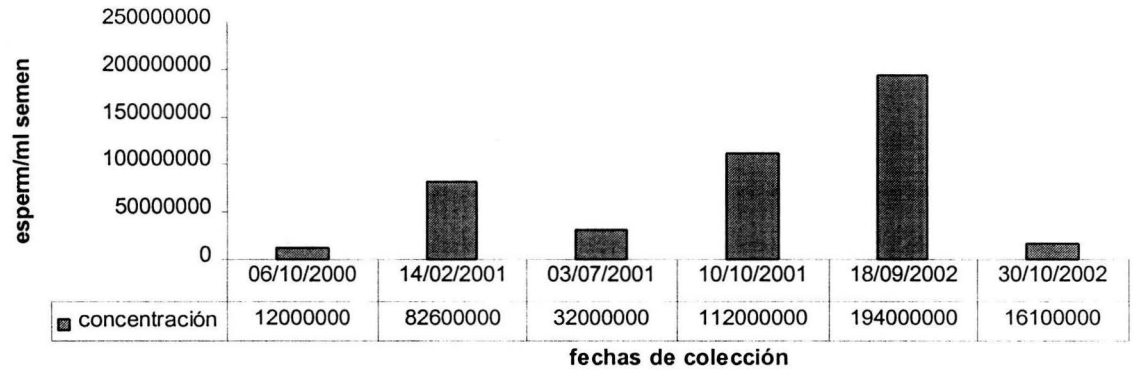
Cont Total: Conteo total de espermatozoides en el eyaculado. Prod esp/test: Producción de espermatozoides por volumen testicular. Sin acros: espermatozoides sin acrosoma. Daño acros: espermatozoides con daño acrosomal.

Anorm 1°: espermatozoides con anomalías primarias. Anorm 2°: espermatozoides con anomalías secundarias.

Anorm Total: Espermatozoides anormales.

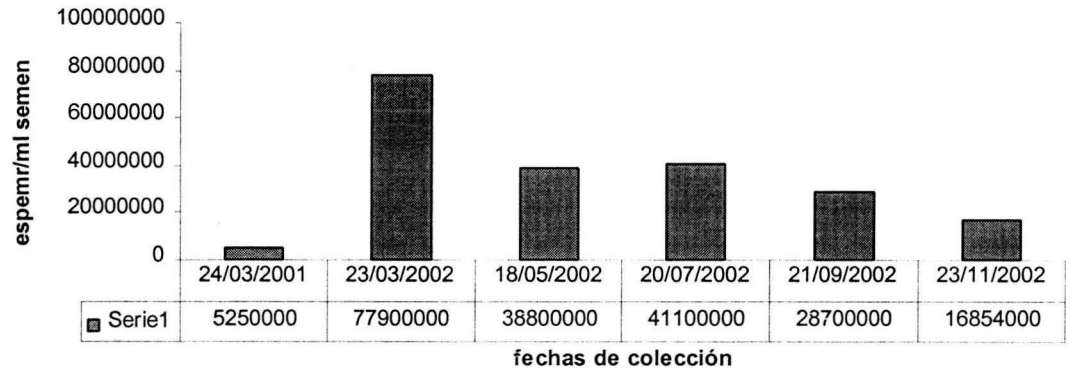
Anexo 3: Concentración espermática de Xcaret, zoológico de Chapultepec (solo fechas de colección donde se obtuvo semen).

CONCENTRACION ESPERMÁTICA DE XCARTE

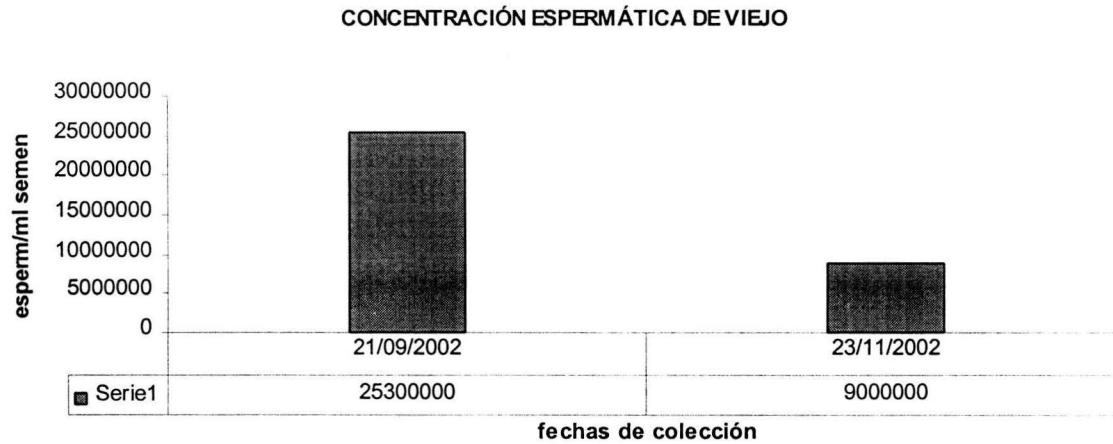


Anexo 4: Concentración espermática de Guillo, zoológico de León (solo fechas de colección donde se obtuvo semen).

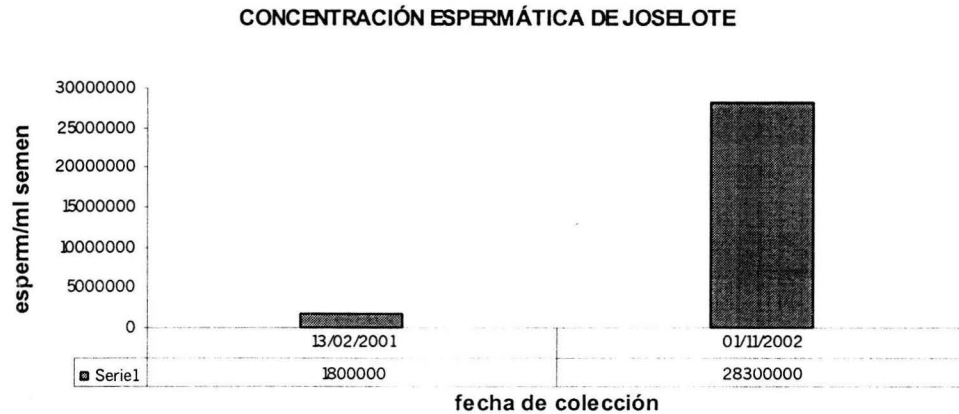
CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA DE GUILLO



Anexo 5: Concentración espermática de Viejo, zoológico de León (solo fechas de colección donde se obtuvo semen).



Anexo 6: Concentración espermática de Joselote, zoológico de San Juan de Aragón (solo fechas de colección donde se obtuvo semen).



Anexo 7: Cuadro de variaciones entre los diferentes elementos nutricionales analizados y variaciones individuales de los mismos.

ID	Variable	Vitamina A*	Vitamina E*	Omega 3**	Omega 6**	Relación Ca:P
Viejo	min	0.168	2.33	0.486	12.671	1.012
	max	0.767	8.49	2.363	21.891	2.28
	X sin	0.94	4.83	0.699	18.667	1.429
	X con	0.375	5.403	1.293	14.883	1.779
Joselote	min	0.24	6.158	0.202	13.433	1.527
	max	1.82	11.669	0.837	30.372	2.14
	X sin	1.227	6.933	0.565	24.297	1.949
	X con	1.217	8.779	0.338	23.812	1.863
Chester	min	0.381	2.05	0.299	16.475	1.6
	max	0.949	6.98	0.818	23.267	1.97
	X sin	0.483	3.425	0.428	21.007	1.861
	X con	0.832	5.521	0.763	18.582	1.699
Guillo	min	0.43	3.42	0.517	11.25	1.62
	max	1.22	9.71	1.092	23.554	2
	X sin	0.711	4.932	0.86	20.585	1.839
	X con	0.755	7.975	0.755	17.6	1.839
Xcaret	min	1.065	4.29	0.218	9.48	1.833
	max	1.426	16.965	1.559	22.611	2.9677
	X sin	0.61	7.097	0.309	15.757	2.091
	X con	3.577	8.795	0.509	16.2625	2.477

* µg/ml ** % de ácidos grasos totale