

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL**

**CARACTERIZACIÓN DEL CICLO REPRODUCTIVO DE LA HEMBRA  
DE ZACATUCHE (*Romerolagus diazi*) A TRAVÉS DE LA  
UTILIZACIÓN DE MÉTODOS NO INVASIVOS: NIVELES DE  
PROGESTERONA Y ESTRÓGENOS FECALES Y CITOLOGÍA  
VAGINAL.**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS  
PRESENTA:**

**LILIANA AURORA RAMOS GARDUÑO**

**TUTOR Y COMITÉ TUTORAL:**

**FERNANDO GUAL SILL (Director de Tesis)**

**MARTA C. ROMANO PARDO**

**MARIO PÉREZ MARTÍNEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIA

A mis padres Alejandro Ramos Leyva y Simona Garduño Frausto, por su guía cariño y apoyo, gracias mamá por ser la abuela más fabulosa, sin tu ayuda hubiera sido más difícil.

A Iván Rodríguez R, por ser mi compañero, mi cómplice, mi soporte... por tolerar, comprender y por animarme cada día...este logro también es tuyo.

A Antonio Cid mi pequeño impulso, por aguantar que mami jugara menos...esto también es para ti, te amo hijo.

A mi hermano Alejandro...con todo mi cariño.

A los zacatuches y especialmente a las de esta investigación, que sigan en este planeta mucho, mucho tiempo más a pesar de tener todo en contra.

*La grandeza de una nación y su progreso moral podrían ser juzgados por la forma en que trata a sus animales*

*M. Gandhi*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a mi Facultad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT, por la beca otorgada durante la realización de estos estudios.

A mi director de tesis, el Dr. Fernando Gual Sill, por su apoyo, interés y guía recibidos en todo momento.

A mi comité tutorial, la Dra. Marta Romano Pardo, por su dirección y apoyo en el trabajo para la realización de los RIA's.

Al Dr. Mario Pérez Martínez, por tener el tiempo de escucharme y recibirme siempre y por todas las dudas aclaradas y su orientación.

A mi jurado, la Dra. Ana María Rosales, Dulce Brousset, Gerardo Suzán y Arturo Rivera, agradezco de manera muy especial por su amable e inmediata disposición a revisar mi trabajo y por todas y cada una de sus valiosas aportaciones que han dado mayor sentido y forma a esta tesis.

A la Dra. Nuria de Buen de A. por sus enseñanzas y dirección en la evaluación de las citologías vaginales, por todas sus invaluable aportaciones, muchas gracias Dra. Nuri.

Al Dr. Carlos Vázquez Peláez por su tiempo y dirección para la realización de los estudios estadísticos, gracias doc.

Al Dr. Carlos Esquivel Lacroix, por otorgarme tiempo, por escucharme y orientarme.

Al Dr. Luis A. Zarco Q., por su orientación y su tiempo.

A la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre del gobierno del Distrito Federal y al Zoológico de Chapultepec, a sus directivos, por permitirme realizar este trabajo en una especie tan importante, especialmente al Dr José Bernal Stoopen.

Al Departamento de Patología de la FMVZ UNAM por apoyarme con instalaciones y material, por las horas microscopio para la revisión de las mismas, a las Dras. Laura Romero y Beatriz Vanda por su orientación en las observaciones. A Luis Antonio Morales Arreola, Sra Juliana González y a Jaime Eugenio Córdova por su ayuda para material, tinciones y fotos, gracias. A Emma Serrano e Itzel Yáñez por animarme y acompañarme. A Marycruz Domínguez por su ayuda desde lejos, que aunque ya no residas en el departamento te sigo considerando como de acá.

A mis amigos del Zoológico de Chapultepec por ayudarme siempre que lo necesité, a Rogelio Campos, Edgar Gayosso, Javier Ojeda, Erika Servín, Ignacio Rangel, Ángeles Pintado, Osvaldo López, Lourdes Reyes, Saúl Soto, Norma Berdeja, Lilia Gandarias y Adriana Rivera.

A los guarda-animales del albergue de los zacatuches Raúl Ramírez Evangelista, Ramón Huanet, Vicente Frausto y Sergio Portillo.

A todo el personal del laboratorio de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, IPN, especialmente a Alba Rodas, Ricardo Valadez, Luz María Buendía y Lorena Hinjosa.

Al departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio de la FMVZ, UNAM por acogerme como alumna y permitirme ocupar un sitio donde poder trabajar.

Al departamento de Reproducción de la FMVZ, UNAM; a la Dra. Ana Delia Rodríguez Cortez por permitirme trabajar algunas de mis muestras en el laboratorio.

A todo el personal de la División de Estudios de Posgrado de la FMVZ, UNAM y a la Dra Clara Aguillón por toda su paciencia y orientación.

Al Dr Carlos Cedillo por su apoyo y orientación en todo momento y por su ayuda en la toma de las fotomicrografías.

Y al resto de mis amigos... por estar... preguntar... compartir...animar...y ayudar, gracias.

## RESUMEN

México es considerado como una región prioritaria para la conservación de la biodiversidad. Nuestro país es el más rico del Continente Americano en cuanto a diversidad del Orden *Lagomorpha*; el *Romerolagus diazi*, conocido como zacatuche, conejo de los volcanes o teporingo, es el único conejo realmente endémico y en peligro de extinción. Existen escasos datos acerca de su reproducción. El objetivo de esta investigación fue la determinación del ciclo reproductivo en hembras de zacatuche mantenidas en cautiverio mediante técnicas no invasivas y citología vaginal; el muestreo se realizó durante los meses de junio, julio y agosto del 2009. Se colectaron heces de las hembras y se tomaron citologías vaginales de manera periódica. Para la citología se utilizó el índice de Maduración (porcentaje de células basales-parabasales/intermedias/superficiales) y tinción de Papanicolaou modificada. Para la evaluación hormonal fecal se determinaron mediante Radio Inmuno Análisis <sup>125</sup>I (RIA) concentraciones de Progesterona (P4) y 17 β Estradiol (E2). Los sujetos de estudio se alojaron en jaulas individuales sin la presencia visual de machos en el Zoológico de Chapultepec (Ciudad de México), aunque con cierto contacto (auditivo y olfativo principalmente) con otras hembras y machos. La evaluación citológica mostró recurrencia celular en superficiales, intermedias y parabasales durante todo el periodo del muestreo, sin manifestación de ciclos periódicos y bien definidos, además de una correlación débil del grado de hiperemia vulvar (color) con la presencia de células superficiales (26%), es decir, no hubo evidencia importante de la intensidad en la tonalidad de la mucosa vulvar que se relacione con la receptividad de la hembra y la presencia de células superficiales. De las concentraciones hormonales obtenidas, la P4 mostró concentraciones promedio de 106.14±25.14ng/ml para el grupo A (hembras con toma de citología vaginal) y de 39.41±12.81ng/ml para el grupo C (hembras a las cuales únicamente se

tomaron muestras de heces para evaluación hormonal, sin muestreo celular vaginal), encontrando diferencia estadística entre grupos  $p < 0.0007$ , esta diferencia podría ser indicativa de un efecto neuro-endocrino inducido por la manipulación cervico-vaginal en las hembras del grupo A. Las concentraciones obtenidas para el E2 resultaron superiores a las que estima confiablemente la curva estándar del estuche comercial. De acuerdo a las observaciones citológicas y hormonales se puede concluir que la hembra de zacatuche no presenta un ciclo estral bien definido y presenta un patrón muy similar al conejo doméstico *Oryctolagus cuniculus* misma que presenta ovulación inducida; no hay manifestación clara de etapa de celo o estro en la hembra para la receptividad del macho, la correlación entre la celularidad vaginal y la concentración hormonal (P4) fue débil. Esta podría ser la causa que el *Romerolagus* se haya resistido a la total extinción pues su reproducción es constante y la probable inducción a la ovulación lo hace más eficiente que las ovuladoras espontáneas. La citología vaginal y la determinación hormonal en heces son herramientas útiles para el acercamiento al conocimiento de la fisiología reproductiva de las especies silvestres en apoyo a su conservación. Palabras clave: Zacatuche, *Romerolagus diazi*, Citología Vaginal, Progesterona, Radio Inmuno Análisis, Ciclo Reproductivo.

## ABSTRACT

Mexico is considered as a strategic region for preservation of biodiversity. From all American countries, ours is the richest in diversity in the *Lagomorpha* Order. The volcano rabbit, zacatuche or teporingo, as it is known in Spanish, is the only endemic rabbit and it is considered as an endangered species. There are few data available on their reproduction. The objective of this research was to determine the reproductive cycle of female volcano rabbits kept in captivity by non-invasive methods and vaginal cytology (Chapultepec zoo, Mexico City). Sampling was conducted from June to August 2009. Feces from females were collected from floor cages and vaginal cytologies were taken periodically. Cytology evaluation was carried out by Papanicolaou stain and by evaluation of the maturation index (vaginal cellular percentage). Levels of reproductive hormones in feces such as progesterone (P4) and 17  $\beta$  Estradiol (E2) were determined by radioimmunoassay (RIA <sup>125</sup>I). Females were kept in individual cages at the Chapultepec Zoo (Mexico city) without visual contact with males, although with a certain degree of auditory and olfactory contact with other females and males. Cytologic evaluation showed recurrence in the three kinds of epithelial cells (superficial, intermediate and parabasal) without a periodic cellular dynamism, as well as a weak correlation between the vulvar mucosa color and superficial cells (26%), this is, there was no significant evidence between vulvar color, female receptivity and the presence of superficial cells. Average concentration of progesterone by RIA was 106.14 $\pm$ 25.14ng/ml for group A (females with cytological evaluation) and 39.41 $\pm$ 12.81ng/ml for group C (females without cytological evaluation, only non-invasive monitoring of reproductive hormone in feces), with a significant difference ( $P < 0.0007$ ) between groups. This difference might indicate there is a neuroendocrine effect induced by vaginal and cervical stimulation. Estradiol concentrations are not presented in this investigation because concentrations obtained were higher than those from the kit's standard curve. Based on cytological observations and hormonal results, we can conclude that the volcano

rabbit does not have a well defined oestrus cycle, sharing a very similar patter to the cycle of female *O. cuniculus* (with induced ovulation), in which there are not clear signs of heat or estrus stage. The correlation between progesterone concentrations and cytology was not strong; this could help explain why the *Romerolagus* is not extinct. Their continuous reproduction cycle throughout the year and induced ovulation, may render the volcano rabbit with a more efficient reproduction than females with spontaneous ovulation. Vaginal cytology and non-invasive monitoring of hormone metabolites in feces are useful tools to better understand the reproductive physiology of wild species and their conservation.

Key words: Volcano rabbit, *Romerolagus diazi*, vaginal cytology, Progesterone, radioimmunoassay (RIA), oestrus cycle.

## CONTENIDO

	pag
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	<b>1</b>
<b>1.1: Los lagomorfos mexicanos.</b>	<b>3</b>
<b>1.2: Aspectos taxonómicos.</b>	<b>3</b>
<b>1.3: Morfología.</b>	<b>5</b>
<b>1.4: Hábitat y distribución.</b>	<b>5</b>
<b>1.5 Especies raras y de distribución restringida.</b>	<b>6</b>
<b>1.6 Deforestación, fragmentación y biodiversidad.</b>	<b>8</b>
<b>1.7 Historia natural.</b>	<b>10</b>
<b>1.8 Aspectos reproductivos.</b>	<b>11</b>
<b>1.9 Citología vaginal.</b>	<b>12</b>
<b>1.10 Fisiología y anatomía reproductiva           de la coneja doméstica.</b>	<b>15</b>
<b>1.11 Monitoreo no invasivo de hormonas reproductivas y           Radioinmuno análisis (RIA).</b>	<b>16</b>
<b>2.OBJETIVO GENERAL.</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Objetivos específicos.</b>	<b>20</b>
<b>3. HIPÓTESIS.</b>	<b>20</b>
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	<b>20</b>
<b>4.1 Modelo animal.</b>	<b>20</b>
<b>4.2 Citología Vaginal y evaluación cuantitativa.</b>	<b>22</b>
<b>4.3 Colecta de muestras para monitoreo hormonal.</b>	<b>24</b>
<b>4.4 Extracción hormonal y porcentaje           de recuperación hormonal.</b>	<b>25</b>
<b>4.5 Análisis de esteroides.</b>	<b>26</b>
<b>4.6 Análisis estadísticos.</b>	<b>27</b>
<b>5. RESULTADOS.</b>	<b>28</b>
<b>5.1 Morfología Uterina.</b>	<b>28</b>

5.2 Citología Vaginal. . . . .	30
5.3 Coloración de la mucosa vulvar. . . . .	39
5.4 Radioinmuno análisis (RIA). . . . .	40
5.5 Resultados estadísticos. . . . .	42
5.5.1 Citologías. . . . .	42
5.5.2 Hormonales. . . . .	42
6. DISCUSIÓN . . . . .	43
7. CONCLUSIONES. . . . .	49
8. PERSPECTIVAS DE ESTUDIO . . . . .	51
9. LITERATURA CITADA. . . . .	52
10. ANEXOS. . . . .	64
Cuadro 1. Medidas Morfométricas de las hembras de zacatuche <i>Romerolagus diazi</i> . . . . .	64
Cuadro 2. Calendario mensual para el primer mes de muestreo citológico y de heces. . . . .	65
Cuadro 3.    Conteos celulares vaginales. Grupo A, sección a (índice de maduración). . . . .	66
Cuadro 3.    Conteos celulares vaginales. Grupo A, Sección b (índice de maduración). . . . .	67
Cuadro 4.    Conteos celulares vaginal Grupo B, (índice de maduración). . . . .	68
Cuadro 5.    Conteo celular vaginal Grupo A (predominio de células superficiales). . . . .	69
Cuadro 6    Conteo celular vaginal Grupo B (predominio de células superficiales). . . . .	69
Cuadro 7.    Correlación de conteos celulares vaginales y coloración de la mucosa vulvar, grupo A. . . . .	70

<b>Cuadro 8</b>	<b>Correlación de conteos celulares</b>	
	<b>Vaginales y coloración de la mucosa vulvar,</b>	
	<b>Grupo B.</b>	<b>71</b>
<b>Cuadro 9</b>	<b>Prueba de paralelismo para P4.</b>	<b>72</b>
<b>Cuadro 10</b>	<b>Prueba de paralelismo para E2.</b>	<b>72</b>
<b>Cuadro 11</b>	<b>Prueba alterna de paralelismo para E2 ..</b>	<b>73</b>
<b>Cuadro 12</b>	<b>Citología vaginal, promedios de los conteos</b>	
	<b>Celulares por hembra.</b>	<b>74</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

México es considerado como un país megadiverso y prioritario para la conservación ya que se encuentra entre los cinco países del mundo con mayor endemismo de plantas y vertebrados donde del 31 al 33% son mamíferos (Romero y Cervantes 2005).

El , conejo de los volcanes o Teporingo *Romerolagus diazi* es una especie endémica y rara de la parte central de México (eje neovolcánico transversal), habita principalmente cuatro volcanes a través de este eje: Popocatepetl, Iztaccíhuatl (Sierra Nevada), El Pelado, Tláloc (Sierra Chichinautzin) (Romero y Cervantes 2005; Ceballos, 2001; Velázquez y Romero 1996). Es considerado el más primitivo de los conejos y liebres vivientes (Van der Loo y De Poorter 1981; Fa y Bell, 1990). La distribución de esta especie se restringe a tres regiones que juntas cubren un área de 280 km<sup>2</sup>, aproximadamente (INE 2001; IUCN 2008; AMCELA 1996), esta zona forma parte de la provincia fisiográfica denominada Eje Neovolcánico Transversal, que por su historia y dinamismo geológico, así como por su ubicación en la confluencia e intersección de dos regiones biogeográficas (la Neártica y la Neotropical), es una de las áreas más importantes en cuanto a biodiversidad en la República Mexicana. El zacatuche es encontrado a una altitud de 2,800 a 4250 msnm, sobre todo en áreas de presencia de varias especies de zacatón (*Muhlenbergia macroura*, *Festuca rosei*, *F. amplissima* y *Stipa ichu*) y sustratos de roca, en combinación con zonas de bosques de pino de 25 m de altura (*Pinus montezumae*, *Pinus harwegi*, *P. rudis*, *P. teocote*, *P. patula* y *P. pseudostrobus*) (Fa y Bell, 1990). El zacatuche se encuentra en el libro rojo de IUCN, tipificada como en peligro de extinción desde 1966; enlistada en el apéndice I del CITES desde 1973 y en México como en peligro de extinción -SEMARNAT 2002- (Romero y Cervantes 2005; INE 2001; IUCN 2008).

Las especies raras como el zacatuche, se han convertido en un grupo prioritario para la conservación debido a su vulnerabilidad a la extinción,

normalmente se relacionan con distribución restringida y/o poblaciones poco abundantes. Dadas las enormes tasas de deforestación y contaminación del país, es fácil suponer que el número de especies extintas y en riesgo de extinción es mucho mayor que el conocido o estimado (Ceballos 2001). Datos existentes acerca de su historia natural y ecología incluyen el conocimiento de su hábitat de anidación y costumbres reproductivas. Se menciona que el periodo reproductivo contempla todo el año, siendo más intenso durante veranos tibios y húmedos y más leves durante inviernos fríos y secos (Romero y Cervantes 2005); no se tienen datos registrados acerca de su ciclo reproductivo estral.

El conejo de los volcanes o zacatuche se ha mantenido en cautiverio por seis instituciones (Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México; Zoológico de Amberes, Bélgica, Instituto Central para Animales Experimentales en Japón, Jersey Wildlife Preservation Trust y desde 1984, se introdujo al Zoológico de Chapultepec de la Ciudad de México la primer colonia de zacatuches, originaria de Parres, D.F. con 12 ejemplares (4 machos y 8 hembras). En 1998 se fundó una segunda colonia con 6 ejemplares (2 machos y 4 hembras) originarios también de Parres, D.F. donada por la Universidad Autónoma Metropolitana. En la actualidad se cuenta aproximadamente con 160 individuos. Cabe mencionar que existe también desde diciembre de 2003, en el Zoológico Los Coyotes una colonia derivada del Zoológico de Chapultepec (Campos 2009; Velázquez y del Río 2007).

Existen importantes avances en el conocimiento e investigación sobre este lagomorfo, sin embargo, los reportes en aspectos reproductivos para esta especie son limitados. Para el manejo efectivo de las especies en cautiverio y en vida libre, es necesario conocer de manera precisa el estatus reproductivo que llevará a programas de reproducción exitosos. Parámetros reproductivos como duración del ciclo estral, duración de la gestación, y edad de inicio de la pubertad por ejemplo, afectan profundamente el crecimiento de las poblaciones silvestres. El

conocimiento del comportamiento hormonal reproductivo es el primer paso en el estudio de la biología de la reproducción de cualquier especie (Graham 2004).

### **1.1 Los lagomorfos mexicanos**

El orden de los lagomorfos comprende 65 especies en dos familias, las pikas (*Ochodontidae*) y los conejos y liebres (*Leporidae*). En México sólo existe la familia *Leporidae* con tres géneros y 14 especies de conejos y liebres, representan la diversidad máxima de lagomorfos del continente americano y sitúa a México como uno de los países que aloja más especies de conejos y liebres en el mundo. De estas 14 especies, cinco pertenecen a las liebres (*Lepus*) y el resto al grupo de los conejos (*Sylvilagus* y *Romerolagus*). De todas éstas, 8 especies en total son endémicas (cinco especies de liebres y tres de conejos) (Romero y Cervantes 2005).

México tiene importantes especies endémicas de lagomorfos como la liebre de Tehuantepec (*Lepus flavigularis*), liebre negra (*L. insularis*), conejo de tres Marías (*Sylvilagus graysoni*), conejo del Omiltemi (*S. insonus*), conejo serrano (*S. cunicularius*), conejo de San José (*S. mansuetus*), y el teporingo, zacatuche o conejo de los volcanes (*Romerolagus diazi*). La mayoría de estas especies se consideran en riesgo de extinción (Ceballos, 2005). El zacatuche es una especie rara y en peligro de extinción (libro rojo de la UICN desde 1966; Convenio sobre el Tratado Internacional de Especies en Peligro de Flora y Fauna Silvestres, CITES I; SEMARNAT 2002) (Romero y Cervantes 2005).

### **1.2 Aspectos taxonómicos**

En 1893 el Ing. Fernando Ferrari Pérez describió al zacatuche como *Lepus diazi* (volcán Iztaccíhuatl, Puebla, México). Después el género *Romerolagus* fue descrito por Merriam (1896, Popocatépetl, México), al mismo tiempo lo nombró *Romerolagus nelsoni*. Esta especie es monotípica y pertenece a la familia Paleolaginae, familia Leporidae, orden Lagomorpha. Sin embargo, Corbet (1893) consideró que el zacatuche es un lepórido de la subfamilia *Leporinae* de acuerdo

con las características de su tercer premolar inferior. Más tarde, Herrera (1897) basado en comparaciones osteológicas entre el *Romerolagus*, pikas del género *Lagomys* (*Ochotona*) y liebres del género *Lepus* lo incluyó en el género *Lagomys*. Finalmente, Millar (1911) propuso la combinación *Romerolagus diazi*. Actualmente, *R. diazi* sigue siendo considerada especie monotípica (Cervantes y Martínez 1996).

No existen registros fósiles del zacatuche, sin embargo, es considerado como un lepórido primitivo por sus características creneales, dentales, cromosómicas, por relación con sus huéspedes sifonápteros, ácaros y céstodos que son todos específicos y por su distribución actual. Todo esto lo relaciona estrechamente con *Pronolagus* y *Pentalagus*, especies con las cuales había sido considerado como parte de la antigua subfamilia Palaeolaginae; estas son junto con el *Romerolagus* especies consideradas como “fósiles vivientes” y son el conejo de Amami (*Pentalagus furnessi*) que habita al suroeste de Japón y el conejo de las rocas rojas (*Pronolagus rupestris*), distribuido al sur y este de África. Después de evaluaciones dentales Dawson 1979, concluyó que el zacatuche pudo haberse diferenciado a partir de *Nekrolagus* (fósil del Plioceno tardío en Norteamérica), al igual que los leporinos actuales. Existe gran similitud entre los estudios cariotípicos entre *Lepus* y el zacatuche, se considera que existe un parentesco filogenético más estrecho entre el zacatuche y *Lepus* que entre el zacatuche y *Sylvilagus*. *Romerolagus* es la única especie que presenta la característica primitiva de mantener articulados el esternón y la clavícula. El zacatuche se diferenció probablemente en la meseta desértica americana y permaneció como relicto una vez terminadas las glaciaciones, se estableció en las altas montañas del sur del Valle de México, hábitat que no pudo abandonar y donde se ha conservado sin cambio evolutivo aparente (Cervantes y Martínez, 1996); sin embargo, Cervantes y colaboradores en el 2002 realizaron un estudio sobre variación genética en poblaciones de lagomorfos mexicanos y concluyeron haber encontrado menor distancia genética entre *Romerolagus* y *Sylvilagus*

*floridanus* (Cervantes y col. 2002). Cabe mencionar, que en la zona central del Eje Neovolcánico Transversal (Sierra Nevada) y en la Sierra Chichinautzin, esta especie cohabita con el género *Sylvilagus* (Hot et al 1987).

### **1.3 Morfología**

Los lagomorfos presentan el cuerpo robusto, orejas y patas traseras grandes, la cola muy pequeña o ausente, el labio superior hendido y dos pares de incisivos en el maxilar superior, los frontales son más grandes que los posteriores y presentan un surco longitudinal. Los huesos laterales craneales presentan fenestraciones (Romero y Cervantes 2005).

El zacatuche presenta un pelaje corto y denso de color ocre mezclado con negro en el dorso y en las partes laterales, con la cola del mismo color; las partes apicales y basales de los pelos de guardia son negras, con la parte media amarilla; la parte superior de las patas es de color ante, y la superficie ventral del conejo es de color marrón pálido. *Romerolagus* al igual que otras especies de *Sylvilagus* presenta un triángulo de pelo amarillento en la nuca entre la base de las orejas. La región pectoral está cubierta con pelos largos y suaves pero no existe un contraste con el color del pelaje ventral como es el caso de otros lepóridos. Las extremidades posteriores y las patas del zacatuche son cortas, sus orejas son pequeñas y redondeadas y su cola es pequeña y poco visible (Romero y Cervantes 2005; Cervantes y Martínez 1996). Su longitud total en el adulto fluctúa entre 234 a 321 mm y su peso entre 386 a 602 g (Romero y Cervantes 2005).

### **1.4 Hábitat y distribución**

En el hábitat del zacatuche el verano es templado y lluvioso mientras que el invierno es frío y seco, la temperatura media anual es de 9.6°C y la precipitación media anual de 1 334 mm; el mes más caliente es mayo y el más frío enero, siendo agosto el mes más húmedo y febrero el más seco. Ocupa áreas con un relieve abrupto, donde el sustrato consiste de abundantes rocas basálticas,

terrenos profundos, permeables y suelos oscuros, principalmente del grupo de los litosoles. Generalmente habita en áreas que van de 2800 a 4250 msnm (Romero y Cervantes 2005; Velázquez y Romero 1996).

Es considerado como una de las especies con la distribución más restringida en comparación con algunos otros mamíferos de México. Esta especie endémica se distribuye solo en la parte central del Eje Neovolcánico Transversal (ENT), donde sus poblaciones se encuentran en las laderas de las montañas del sur y sureste del Valle de México y en el Nevado de Toluca, en un patrón discontinuo de distribución. Se consideraba originalmente que el área total de distribución del *R. diazi* era de 280 Km<sup>2</sup> delimitados en la Sierra Nevada y en la Sierra Chichinautzin, particularmente entre los volcanes Popocatepetl, Iztaccíhuatl, Pelado y Tlaloc. Sin embargo, tomando en cuenta 12 pequeñas áreas aledañas a estos volcanes donde se presentan poblaciones de zacatuches, el área se extiende a 386 km<sup>2</sup>. Cabe mencionar que su distribución se ha visto seriamente afectada por los procesos de fragmentación que está sufriendo su hábitat, debido a otras causas a incendios periódicos, al creciente desarrollo urbano y a la destrucción de bosques para habitar áreas de cultivo (Romero y Cervantes 2005; AMCELA 2006; Fa y Bell 2008).

### **1.5 Especies raras y de distribución restringida**

La idea de que las especies se pueden caracterizar en raras o abundantes ha sido fundamental en ecología y evolución, puesto que han desempeñado un papel fundamental. En décadas recientes, estas especies se han convertido en un grupo prioritario para la conservación debido a su vulnerabilidad a la extinción. Existen varios tipos de rareza biológica, relacionadas con la distribución geográfica y la abundancia de las especies (Rabinowitz *et al.*,1986). En general, se consideran como especies raras aquellas que tienen distribuciones restringidas, poblaciones poco abundantes o combinaciones de ambos factores. Los criterios específicos para definir “rareza” en grupos taxonómicos particulares son variables

(Gaston, 1994). La Unión Mundial para la Naturaleza considera especies raras a las que tienen rangos de distribución menores de 50,000 km<sup>2</sup>. En México un porcentaje considerable de las especies son de distribución restringida. Esas especies pueden ser endémicas o bien de distribución marginal en el país (Ceballos y Navarro 1991; Ceballos *et al* 1998). Por ejemplo, más del 50% de las 452 especies de mamíferos terrestres tienen distribuciones menores a 10 000 km<sup>2</sup> y 20% sólo son conocidas en áreas menores. Entre las especies de distribución restringida se encuentra el teporingo (*Romerolagus diazi*), endémica y habitante del cinturón transvolcánico; y otras por mencionar: la liebre de Tehuantepec (*Lepus flavigularis*), el perro de las praderas mexicano (*Cynomys mexicanus*) y el mapache de Cozumel (*Procyon pygmaeus*) (Romero y Cervantes 2005). Una de las áreas de concentración de especies de distribución restringida es el Eje Neovolcánico. En sitios como el Popocatépetl pueden estar representadas decenas de especies con distribuciones restringidas y estas especies en algunos casos, fueron descubiertas cuando se habían extinto o estaban seriamente amenazadas. En muchos casos, tales especies pueden desaparecer como consecuencia de un solo incendio o proyecto de desarrollo, como una carretera o presa. Dadas las enormes tasas de deforestación y contaminación del país, es fácil suponer que el número de especies extintas y en riesgo de extinción es mucho mayor que el conocido o estimado. Es decir, la extinción de especies es más grave de lo que comúnmente se considera, incluso por los especialistas (Ceballos, 2001). Dentro de la zona central del Eje Neovolcánico Transversal (ENT) no hay evidencia de presencia de el zacatuche al Oeste o Este del ENT (Pico de Orizaba, Cofre de Perote, La Malinche, Nevado de Colima, Volcán de Tancítaro y Sierra Chincua) y se sugiere que la especie ha desaparecido de áreas grandes del ENT donde había estado reportado en el pasado, por ejemplo en el talud este del Iztaccíhuatl y en el nevado de Toluca. Habitantes cercanos a esta última zona comentan que esos conejos desaparecieron desde hace 15 o 20 años (Hoth y col 1987).

## **1.6 Deforestación, fragmentación y biodiversidad**

Altas tasas de deforestación amenazan la conservación de la biodiversidad en todo el mundo. Lo que mayormente preocupa es el impacto antropogénico a la transformación del hábitat en especies individuales, distribuciones y consecuentemente su estatus de conservación. México es un país megadiverso con tasas de deforestación que van desde el 0.1 % hasta un 1 a 2% anual con el mayor porcentaje de pérdida de vegetación natural nacional en estados como Veracruz, Tabasco y el Distrito Federal (Sánchez 2005, Aguilar et al 2000). En los países en vías de desarrollo, la deforestación se debe al cambio en el uso de suelo y la consiguiente transformación de bosques o selvas en zonas agrícolas o pecuarias, como resultado de una presión demográfica sobre el uso de los recursos naturales y de un aprovechamiento inadecuado de la tierra y conlleva a pérdida de la biodiversidad a nivel genético, poblacional y ecosistémico (Aguilar et al 2000, INEGI-SEMARNAP 1997, FAO 1993); la reducción de la cubierta vegetal ocasiona problemas como modificaciones en los ciclos hídricos y cambios regionales de los regímenes de temperatura y precipitación, favoreciendo con ello el calentamiento global, la disminución en el secuestro de bióxido de carbono, así como la pérdida de hábitats o la fragmentación de ecosistemas. La fragmentación de la vegetación tiene como consecuencia inmediata la reducción del hábitat para las especies, lo que puede ocasionar un proceso de defaunación o desaparición parcial o total de comunidades de algunos grupos como insectos, aves y mamíferos (Dirzo y García 1992). Las relaciones bióticas y abióticas de las comunidades también se pueden alterar en función del tamaño y la forma de los fragmentos, ya que al modificarse la distribución espacial de los recursos también se modifica su disponibilidad. El grado de interrelación de los fragmentos determina entonces la viabilidad de estas especies en el mediano y largo plazos, ya que si ésta no existe pueden producirse procesos de aislamiento, favorecerse

procesos endogámicos o bien llegar hasta la extinción local de algunas especies. (Sánchez 2005, Fahrig 2003).

Los ecosistemas más amenazados del país por su grado de fragmentación se encuentran distribuidos de manera diferencial. Los fragmentos de vegetación tropical se encuentran distribuidos más o menos homogéneamente en las regiones tropicales de México (costas del Pacífico desde Nayarit hasta Chiapas, costa del Golfo de México desde Veracruz hasta Tabasco y la península de Yucatán); en tanto que las regiones áridas más afectadas por fragmentación, en su mayoría, se encuentran en el noreste de México (Tamaulipas y Nuevo León), en algunos estados de la altiplanicie central del país (Zacatecas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro e Hidalgo) y en algunos estados de la costa este (Colima y Jalisco). Los fragmentos de regiones templadas que presentan una mayor amenaza se presentan en su mayoría en la Sierra Madre del Sur, Sierra Madre de Chiapas y el Eje Neovolcánico Transversal donde habita el zacatuche. En ésta, como en otras áreas, la urbanización altera dramáticamente la composición de las comunidades de vida silvestre, originando pérdida de la biodiversidad y un incremento de la abundancia de especies que habitan en áreas urbanas. La urbanización es un proceso complejo originado por un incremento en la densidad humana y genera cambios químicos, físicos y ecológicos significantes en las áreas de desarrollo humano, resultando específicamente en la creación de nueva cobertura de tierra y nuevos compuestos o ensamblajes de plantas y animales y puede alterar los tipos y la frecuencia de los disturbios. El proceso de urbanización, ocurre tanto en grandes ciudades como en bordes ciudad- zona rural. Usualmente, alrededor del mundo, se considera un área urbana en donde existe una densidad de 400 humanos por km cuadrado, pero existen otros factores como densidad de edificios, caminos y otros tipos de infraestructuras que contribuyen a crear ambientes urbanos. La urbanización por lo tanto es una de las causas más penetrantes de disturbios de ecosistemas naturales y de cambios en

todo el mundo, por lo que presenta la mayor amenaza a la biota (McKinney 2006; Hamer et al 2008).

### **1.7 Historia natural**

El zacatuche es gregario y vive en grupos de 2 a 5 individuos. Puede ser tanto diurno como nocturno aunque sus actividades se concentran durante el día; estas costumbres se han observado tanto en vida libre como en cautiverio. Utiliza frecuentemente vocalizaciones fuertes y agudas; esto es una característica peculiar ya que entre los lagomorfos ningún otro lepórido vocaliza, a excepción de las pikas (familia Ochotonidae). Hacen túneles subterráneos que utilizan como madrigueras que quedan escondidas en la base de los zacatones, las cuales tienen diferentes entradas que permiten contar con salidas de escape. También utilizan madrigueras abandonadas de tuzas, ardillas terrestres, armadillos o tlacoyotes, o pueden utilizar temporalmente cualquier otro tipo de refugio como hoyos o ranuras entre las rocas y montículos pedregosos. Se ha encontrado que hacen nidos al lado de las bases de los macollos, quedando los nidos ocultos. Se alimentan fundamentalmente de gramíneas amacolladas, principalmente de *Festuca amplissima*, *Festuca rossei*, *Mulhembergia macroura*, etc (Romero y Cervantes 2005).

En el zoológico de Chapultepec se proporcionan pastos amacollados principalmente *M. macroura*, *Festuca sp*, e *S. ichu*, además de alimento concentrado para conejos, zanahoria y alfalfa fresca. Otros alimentos ofrecidos ocasionalmente (dentro del programa de enriquecimiento animal) son: manzana, pera, plátano, avena, lechuga, jícama, achicoria y avena con salvado. Usualmente se complementan con un complemento vitamínico-mineral comercial (Campos 2009).

Como parte de cadenas tróficas, se ha encontrado que el zacatuche es alimento importante de especies como: Linces, coyotes, comadreas, entre otros; desafortunadamente los perros y gatos domésticos así como la cacería furtiva,

ejercen una depredación intensa sobre el zacatuche, contribuyendo también de manera significativa a la disminución de sus poblaciones (Campos 2009; Romero y Cervantes 2005).

### **1.8 Aspectos reproductivos**

En la mayoría de los mamíferos domésticos de ovulación espontánea como en la perra, la ovulación se produce a intervalos regulares, durante el periodo de celo o estro. Los cambios en la mucosa vaginal, vinculados con los incrementos de las concentraciones séricas de estrógeno durante el proestro y estro, se reflejan en la apariencia de las células epiteliales vaginales exfoliadas (Feldman 2007). El intervalo entre dos periodos de estro representa la duración del ciclo estral y las hembras muestran comportamiento de presencia de estro de manera cíclica que va acorde a la presencia de células del epitelio vaginal, preponderantemente se observan células superficiales en el estro. Por el contrario, ovuladores no espontáneos u ovuladores inducidos como el conejo doméstico, no presentan ciclo estral a diferencia de la gata que, siendo ovuladora inducida, presenta marcadamente cuatro fases que conforman un ciclo estral: proestro, estro, diestro y anestro; la ovulación es inducida entonces por un reflejo neuro-endocrino post coito que provoca un pulso de LH que origina la ovulación de 10 a 12 horas después (Ola 2008, Feldman 2007, Hoffman 2007), en el momento del estro, las células epiteliales superficiales vaginales en la gata se incrementan y esto es correlacionado con un pico de actividad folicular y de secreción de estradiol (Moreira 2007); el conejo doméstico no presenta una apariencia cíclica en las células vaginales exfoliadas y la copulación y fertilización ocurren independientemente del predominio del tipo vaginal celular que se presente (Rosell 2000; Tsiligianni et al 2004, Ola 2008).

En conejas domésticas, otro parámetro para evaluar “celo” o estro, según la descripción de Rosell 2000, el grado de hiperemia de la mucosa vulvar que se puede definir en cuatro tonalidades diferentes (blanca, rosa, roja y púrpura),

entonces, se podría pensar que las hembras que tengan la mucosa vulvar muy hiperémica (roja a púrpura) aceptarían la monta (90% de las hembras lo hacen) y por otro lado, solo el 10% de las hembras que tienen la vulva blanca aceptan la cópula y son fecundadas. Sin embargo, concluyen que la vulva roja es una fuerte presunción de estro pero no una prueba (Rosell, 2000). En la coneja, la ovulación es normalmente inducida por los estímulos asociados al coito (estimulación cervico-vaginal principalmente), existe liberación de noradrenalina en el hipotálamo, seguido por la liberación de la GnRH que a su vez desencadena la liberación de LH hipofisiaria, la P4 se mantiene en niveles muy bajos hasta aproximadamente el día 12-16 post apareamiento; si no hay gestación, entonces se produce una regresión lútea entre los días 16 a 20 (Browning et al 1980, Hoffman 2007). Después de la ovulación, la tasa de oxitocina se eleva, mientras que la prolactina decrece; además de la producción de LH, también hay producción de FSH con un pico más pequeño. La ovulación puede ser provocada por medios artificiales, actuando en distintos ámbitos pero los resultados son muy aleatorios pues puede o no obtenerse la ovulación (Rosell 2000, Ypsilantis 1996).

**1.9 Citología Vaginal.** La citología vaginal se utiliza en la mayoría de las especies como un método diagnóstico de enfermedades vaginales, uterinas, o bien, para determinar etapas del ciclo estral o preñez (citología hormonal); en la mujer es el método utilizado en la detección temprana de cáncer cervicouterino. (Feldman, 2007; de Buen 2001, Bibbo 1991;). La influencia de las hormonas ováricas sobre el epitelio vaginal ocasionan cambios citológicos característicos que permiten, en la mayoría de los casos, determinar la etapa del ciclo estral en la que se encuentra la hembra, por lo que es un procedimiento ampliamente utilizado en medicina veterinaria, sobre todo en la perra. En la citología de vagina de la perra encontramos células epiteliales de las diferentes capas del epitelio estratificado plano no queratinizado, en algunas especies se manifiesta un epitelio vaginal con queratina ocasionado por los estrógenos (Feldman 2007); también pueden

observarse células endocervicales, de reserva y en ocasiones células endometriales así como células no epiteliales como son eritrocitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y espermatozoides entre otros cuando la hembra se ha apareado previamente (de Buen 2001).

La clasificación celular que generalmente se utiliza en medicina veterinaria es:

*Basales o germinales.* Células pequeñas de forma redonda a ovalada, de tamaño uniforme (13 a 20  $\mu\text{m}$ ) con núcleo central. Por lo general se desprenden en pequeños grupos y tienen apetencia por los colorantes básicos, no suelen observarse en frotis normales, sino en procesos en los que se han lesionado las capas celulares superficiales, por ejemplo: atrofia, vaginitis o ulceraciones de la mucosa. Pueden observarse también células *Parabasales*, un poco más grandes de núcleo redondo central y tienen más citoplasma y éstas son exfoliadas de manera normal dependiendo de la influencia hormonal (proestro temprano o diestro en perras por ejemplo) (Feldman 2007).

*Intermedias.* Son las más frecuentes y numerosas, miden de 20 a 40  $\mu\text{m}$  que pueden variar de acuerdo a su grado de maduración. Son redondas o poligonales, de contornos bien definidos. Con la tinción de Papanicolaou suelen presentar citoplasma basófilo, sin embargo, en ocasiones puede ser eosinófilo dependiendo del pH celular y de los colorantes utilizados, además contienen gran cantidad de glucógeno. El núcleo es redondo u oval con membrana definida, se observan cromocentros y la cromatina sexual. Su abundante citoplasma y el tamaño del núcleo lo distinguen de las basales o parabasales. Generalmente son encontradas en el proestro, más abundantemente al final de este periodo (Feldman 2007, de Buen 2001)

*Superficiales.* Son células grandes de 40 a 60  $\mu\text{m}$ , de forma poligonal, citoplasma transparente y núcleo picnótico. El citoplasma habitualmente se tiñe de color rosa, puede variar a azul pálido dependiendo del pH celular. La afinidad tintorial de estas células depende del grado de maduración, siendo más maduras las

eosinófilas que las basófilas. A diferencia de las intermedias las células superficiales siempre presentan el núcleo picnótico, a veces pueden mostrar en su citoplasma granulaciones pequeñas de localización perinuclear o periféricas que contienen lípidos; su presencia es estrógeno-dependiente. Como la maduración del epitelio rara vez se lleva a cabo en ausencia de estrógenos, la picnosis nuclear en células superficiales maduras es una buena evidencia de actividad estrogénica. *Anucleadas*. Son células sin núcleo, éstas se observan en gran cantidad durante el estro debido a la maduración del epitelio. Pueden encontrarse también células endocervicales y/o células endocervicales de reserva. El hallazgo de células endometriales puede ser a causa de posparto o enfermedad endometrial. (de Buen 2001). Las células superficiales generalmente son encontradas al final del proestro, incrementándose en el estro (Feldman 2007, de Buen 2001).

La citología hormonal tiene por objeto determinar el tipo de células que predominan en cada etapa del ciclo, al respecto, la literatura señala diferentes índices para valorar la acción estrogénica en los frotis, como son: índice picnótico, índice eosinofílico, índice estrogénico, índice de maduración, etc. Haciendo un análisis de todos ellos, Koss (1979) concluye que el más exacto es el Índice de Maduración. En todos ellos se hace el recuento de cada tipo celular y se expresa en porcentaje (células basales-parabasales/intermedias/superficiales. En animales también se utiliza el índice de Frost (1979), muy similar al de maduración (contemplando únicamente células basales/intermedias/superficiales) en el que se identifican 100 células en 5 campos de la laminilla, observando la cantidad y las características de las células epiteliales vaginales. Se utilizará como base, la celularidad típicamente encontrada en otras especies de mamíferos y primordialmente lo descrito para conejos domésticos (de Buen, N 2001; Tsiligianni 2004).

En conejas domésticas, la literatura describe dos criterios para la evaluación del estadio estral: utilización de la citología vaginal y observación del tono de la hiperemia vulvar en base a colores y se describen como sigue: blanco,

rosa, rojo y púrpura; y de acuerdo a la celularidad vaginal predominante denominado índice de Maduración (basales-parabasales, intermedias, superficiales o anucleadas) (Tsiligianni et al 2004, de Buen 2001, Rosell 2000). Se ha descrito también que la coneja no presenta una apariencia cíclica de las células vaginales exfoliadas y la cópula puede ocurrir sin importar cuál es el tipo celular predominante en el epitelio vaginal y que estímulos sensoriales provocados por machos, parecen ser determinantes para preparar a las hembras para la receptividad sexual; hembras que fueron aisladas completamente de la influencia de machos, mostraron predominantemente presencia de células parabasales en el lumen vaginal lo cual es característico de animales en anestro. Los estímulos auditivos, olfatorios y visuales con los machos parecen ser determinantes para preparar a las hembras y que presenten receptividad sexual, hembras con presencia de dichos estímulos mostraron presencia celular predominante y variable entre epiteliales superficiales, intermedias y parabasales sin ningún patrón distintivo (Ola y Oyegbade 2008); Ypsilantis 1996 sin embargo, menciona haber podido observar “cierto ritmo” en el comportamiento celular vaginal, dividiendo 2 etapas o periodos: observando un incremento seguido de un decremento en el porcentaje de las células superficiales, con una duración de 1-2 y 2-3 días respectivamente.

### **1.10 Fisiología y Anatomía Reproductiva**

Anatómicamente la vagina de las conejas es muy larga y se divide en tres tercios (figura 1). En el tercio inferior de la vagina, la mucosa es revestida por 2 o 3 capas de epitelio escamoso estratificado y numerosos sinusoides están revestidos por células endoteliales en donde se observan a todo lo largo de la capa muscular. Cada estructura sinusoidal se encuentra dispersa entre manojos de músculo liso y tejido conectivo, organizado principalmente por fibras de colágena. En el segundo tercio de la vagina se encuentra epitelio columnar simple, con una estructura sinusoidal que fue evidente pero no tan prominente como en el tercio inferior.

Histológicamente, en el tercio superior de la vagina se encontró epitelio columnar simple y se caracterizó por presentar un arreglo compacto de fibras musculares con estructura sinusoidal. Para el muestreo del epitelio vaginal, la muestra es tomada de la parte más caudal del órgano (inferior) (Oh et al 2003, Barberini, F. 1991, Meredith 2006).

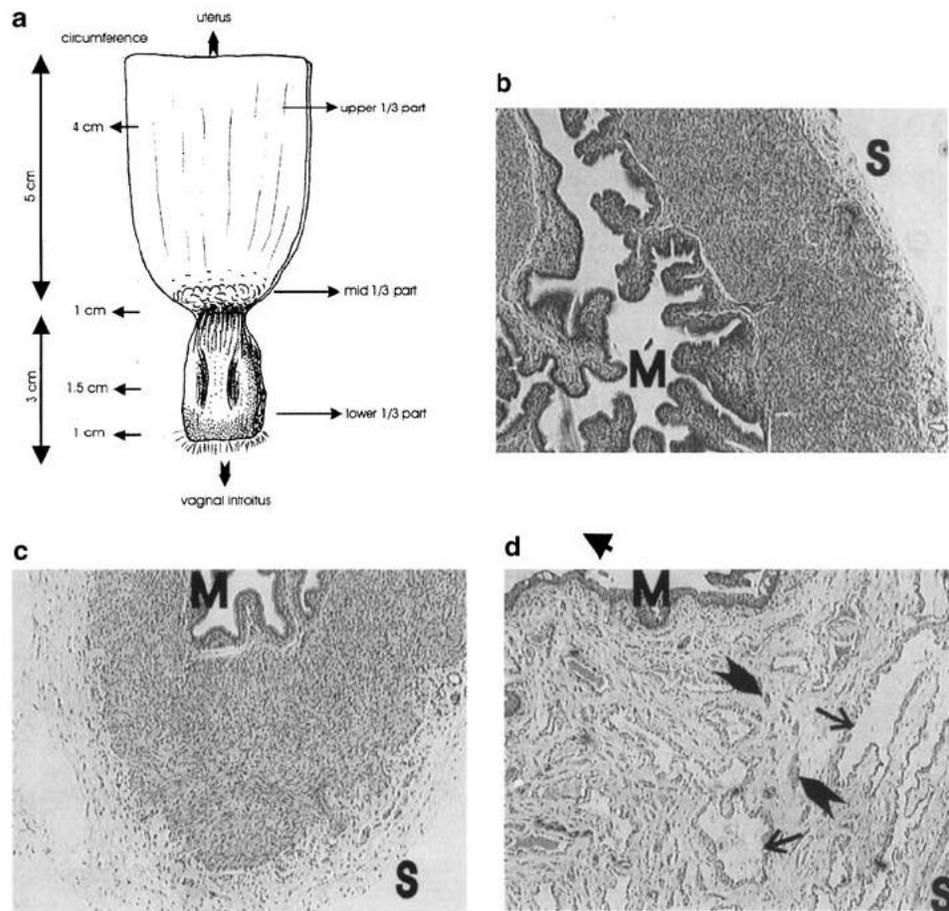


Figura 1 (a) Vagina, coneja doméstica. Diagrama esquema que muestra un corte longitudinal. Con tres tercios que lo componen, superior, medio e inferior. Fotomicrografías muestran cortes de los tercios superior (b), medio (c) e inferior (d) (H y E 40X). M = mucosa, S= Serosa, Muscular marcada con flechas (Oh et al 2003).

### 1.11 Monitoreo no invasivo de hormonas reproductivas y Radioinmunoanálisis (RIA)

El RIA se inició hace más de 40 años como un método altamente sofisticado al que sólo tenían acceso un número muy limitado de laboratorios. En la actualidad, se considera como un procedimiento de rutina en la gran mayoría de los laboratorios, tanto de investigación como en la prestación de servicios en diversas áreas de la biomedicina. Su aplicación como método altamente sensible y específico, han favorecido por ejemplo, el avance tan importante que en la última década han tenido la endocrinología y la oncología, ya que mediante el uso del RIA se ha podido determinar la concentración de un gran número de sustancias (Zambrano y Díaz 1996). El monitoreo hormonal no invasivo, ha sido usado extensivamente desde principios de los 80's para caracterizar la biología reproductiva de muchas especies de fauna silvestre como primates no humanos, antílopes, équidos, félidos, cánidos, marsupiales y aves (Brown y Wildt 1997; Graham 2004; Pukazhenthí y Wildt 2004). Esta técnica inmunológica, ha sido utilizada debido a su capacidad de medir pequeñas cantidades de hormonas, sin embargo, se requiere de un laboratorio especializado con licencia para usar trazadores radioisotópicos y contadores gamma o beta lo cual lo hace caro. (Brown, 2008). La esencia del inmunoensayo es la competencia entre el antígeno marcado radioactivamente "trazador" y el antígeno no marcado (la hormona de la muestra) unidas a un anticuerpo. Los inmunoensayos altamente sensibles dependen del uso de una cantidad limitada de anticuerpo (Brown 2008). El tipo de RIA utilizado en este estudio es el denominado en fase sólida. El anticuerpo primario es unido a una fase sólida (paredes del tubo plástico del ensayo); tanto los antígenos marcados como no marcados radioactivamente son incubados en el tubo y el antígeno no unido se remueve por decantación de la fase líquida. La radioactividad remanente en el tubo es medida en el contador gamma. Esta técnica es usada para proteínas u hormonas esteroides. La cantidad de hormona marcada radioactivamente unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de hormona no marcada presente en la muestra. (Brown 2008, Cis bio Bioassays kit 2008).

El entendimiento de la problemática del cómo se reproducen los animales es fundamental para el manejo o conservación de la fauna silvestre. Históricamente, dicha información se basó en observaciones sistemáticas de comportamientos sociales y reproductivos. Para una investigación exitosa del estatus reproductivo-endocrino, la colección de muestras repetidas para evaluaciones hormonales es necesaria. Sin embargo, en la mayoría de las especies silvestres, el muestreo repetido sanguíneo no es posible y por consiguiente las evaluaciones de metabolitos de esteroides fecales han sido desarrolladas para su evaluación. La colecta de muestras sanguíneas seriadas de animales manejables, permitió obtener datos de patrones hormonales. Al ser muy complicado tomar muestras sanguíneas secuenciales en la mayoría de las especies silvestres se fueron desarrollando mejoramientos en procesos anestésicos a partir de los años 70s, aunque sólo obteniéndose muestreos esporádicas, dando datos sugerentes de los patrones hormonales en estas especies, sin embargo el problema se mantuvo ya que solo algunas muestras sanguíneas se recuperaban de la mayoría de los animales silvestres para trazar un perfil hormonal longitudinal. Además existe evidencia que el estrés de la anestesia puede alterar el patrón de las secreciones hormonales del donador de la muestra sanguínea. Por más de 25 años, se han hecho trabajos para crear técnicas de medición hormonal en orina y heces. Los metabolitos hormonales excretados por estas vías, reflejan los patrones hormonales presentes en sangre (Pukazhenthí y Wildt 2004). La ventaja es obvia, no se requiere tocar siquiera a un animal para evaluar sus concentraciones hormonales en heces o en orina: las heces son simplemente recuperadas del suelo del encierro y analizadas en el laboratorio. Los niveles hormonales resultantes generalmente ofrecen una visión más completa que el análisis sanguíneo que se obtiene en sólo el momento del muestreo, donde los niveles pueden fluctuar rápidamente, es decir, al analizar una muestra sanguínea podríamos tener los niveles más bajos, los más altos o encontrarlos en un punto intermedio de los pulsos de secreción. Normalmente, la

concentración de metabolitos en heces es de 2 a 4 órdenes de magnitud mayor que la de los esteroides concentrados en sangre. Con el muestreo no invasivo, se obtiene la concentración hormonal que corresponde a la producción acumulada a través de un periodo de tiempo con lo que se elimina la variación circadiana del muestreo sanguíneo (Valdespino et al 2007; Brown y Wildt, 1997). Otra ventaja radica en el número de muestras que se pueden obtener, ya que la recolección de heces no se restringe a causa de la manipulación de animales; además, el número de muestras, dependerá de los requerimientos del investigador, permitiendo la realización de estudios longitudinales de la actividad reproductiva (Brown y Wildt 1997).

Respecto a la secreción de esteroides y sus metabolitos, una vez que estos han llegado a las células “blanco”, disminuyen su efecto notablemente. Sin embargo, el órgano principal de desactivación y catabolismo de esteroides (al igual que otras hormonas) es el hígado, son metabolizados y unidos a proteínas acarreadoras o libres pasan al intestino emulsificados en los ácidos biliares, lo cual permite que sean eliminados en la materia fecal; otras porciones de esteroides son eliminadas en la orina luego de haber sido filtradas en los riñones. Las hormonas esteroides se eliminan como tales o como metabolitos y su tasa de excreción y metabolismo varía de acuerdo con la fisiología de cada especie. Justo esta ruta fisiológica es la que permite determinar el funcionamiento gonadal y adrenal de un organismo por métodos no invasivos, obteniendo excretas de los organismos de interés y evaluando en ellas las concentraciones de esteroides circulantes o metabolitos que permite el conocimiento de un organismo sin necesidad de capturarlo (Valdespino et al 2007).

Existe la necesidad de generar investigación en varios rubros para obtener datos sobre ecología básica de los lagomorfos mexicanos; la adquisición de esta información es esencial para el desarrollo de futuras actividades de manejo que puedan minimizar las amenazas y sus influencias sobre las especies. Son escasos los estudios sobre los lagomorfos endémicos de México, incluyendo por supuesto

al zacatuche o teporingo. El enfoque de la información generada para esta especie, básicamente es sobre su historia de vida, densidad, tendencia, distribución poblacional y genética. El zacatuche, especie monotípica y considerada relictas, existente en hábitats fragmentados, se encuentra particularmente expuesta a la extinción. La información acerca de su biología reproductiva es limitada, por lo tanto, la generación de información en cautiverio en este ámbito, servirá para desarrollar nuevos proyectos de investigación para la preservación de la especie.

## **2. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el ciclo reproductivo de la hembra del zacatuche *Romerolagus diazi*, mediante técnicas no invasivas y citología vaginal.

### **2.1 Objetivos específicos**

2.1.1 Evaluación citológica del epitelio vaginal de la hembra de zacatuche *Romerolagus diazi* determinada por influencia de esteroides sexuales en el epitelio vaginal (progesterona y estrógenos)

2.1.2 Determinación de niveles de Progesterona y Estradiol Fecales en hembras adultas de zacatuche *Romerolagus diazi*.

2.1.3 Correlación de la celularidad vaginal y de los niveles de progesterona y estradiol fecales de hembras adultas de zacatuche.

## **3. HIPÓTESIS**

La medición de progesterona y estradiol en correlación con la citología vaginal-hormonal permitirán caracterizar el ciclo reproductivo estral en la hembra de zacatuche.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1 Modelo animal**

Se emplearon 15 zacatuches hembras, adultas mantenidas en cautiverio en jaulas individuales, ubicadas en el albergue de zacatuches (bioma templado) del Zoológico de Chapultepec. Las zacatuches se dividieron en 3 grupos (A, B y C) y

se numeraron individualmente del 1 al 15. El grupo A se integró con las hembras 1 al 5, el grupo B con las hembras 6 a 10 y el grupo C con las hembras 11 a 15. Las hembras contaban con un microchip de identificación individual. Antes de la integración de los grupos, se tomaron medidas morfométricas de cada una (anexo cuadro 1 y solamente se eligieron a las hembras con un peso mayor a 500 g y una longitud mayor a 234mm, lo cual era un indicio de que se trataba individuos sexualmente maduros (Romero y Cervantes 2006, Cervantes y Martínez 1996); el peso se monitoreó a la mitad y al final del tiempo del muestreo y no se registró ninguna disminución de peso en las hembras, manteniéndose hasta el final del muestreo; al concluir este tiempo fueron devueltas al exhibidor del albergue. El albergue o casa de noche de los zacatuches es una habitación semi- dividida por muretes en 3 segmentos; en el primero, cercano a la entrada sólo se encuentra una tarja y los elementos necesarios para la limpieza y la repartición de la dieta diaria de los zacatuches. En el siguiente se encuentran albergadas las 15 zacatuches de este estudio en dos torres o baterías con 8 jaulas individuales cada una. En el último segmento se encuentran 4 torres o baterías con zacatuches hembras y machos en su mayoría (figura 2). Este albergue tiene entradas desde el exhibidor hacia pequeñas cajas de aluminio donde los zacatuches pueden resguardarse a voluntad. Se tomaron muestras de heces y citologías durante 3 meses; en el cuadro 2 (anexo) se presenta como ejemplo el primer mes de muestreo. Estas hembras, aunque aisladas físicamente, nunca lo estuvieron de estímulos olfativo, auditivo y visual por parte de los otros individuos albergados en esta casa de noche.



Figura 2. Jaulas de albergue de las zacatuches. Zoológico de Chapultepec, México.

#### **4.2 Citología Vaginal y evaluación cuantitativa**

Se tomaron 4 citologías vaginales semanales de cada hembra del grupo A; Lunes, martes, jueves y viernes con el fin de apreciar los cambios celulares después del estímulo cérvico-vaginal y evaluar si existieran cambios por la posible inducción a la ovulación por el estímulo mecánico; en la coneja doméstica, la ovulación sucede aproximadamente 12 horas post coito o post estimulación mecánica pero es de manera aleatoria. (Rosell 2000, Ypsilantis et al 1996). En el grupo B, se tomaron 2 citologías vaginales cada semana (lunes y jueves), disminuyendo con esto el estrés del manejo al momento de la toma de muestra y comparar así los cambios celulares contra el grupo A. Para el grupo C, no se contempló la toma de muestra citológica (grupo control). Las citologías se tomaron con hisopos pediátricos de aluminio y punta de algodón, estériles humedecidos con agua destilada estéril; la toma de muestra para citología se realizó insertando cuidadosamente la punta completa del hisopo rotándolo hacia la derecha, lo que permitió el acceso sin forzar el mismo, al tercer tercio de la vagina, las muestras fueron extendidas en portaobjetos de vidrio (la sujeción física y muestreo vaginal

se muestran en las figuras 3 y 4); inmediatamente después se sumergieron para su fijación en alcohol de 96° durante por lo menos 10 minutos y luego fueron secadas al aire para su posterior tinción con la técnica de Papanicolaou modificada de acuerdo a la técnica utilizada en el laboratorio de Citopatología del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y bajo la asesoría de la Dra. Nuria de Buen de Argüero. Se registró la coloración de la mucosa vulvar solamente del último mes de muestreo debido a que fue un parámetro que no se contempló al inicio del planteamiento de la investigación; la evaluación de la coloración de la mucosa vulvar es un parámetro que se utiliza para evaluar la receptividad para el apareamiento en coneja doméstica. La valoración citológica hormonal se realizó utilizando el índice de Maduración, índice que en su resultado indica la maduración celular dependiente de hormonas sexuales y se refleja en porcentaje; en el que se identificaron 100 células en 5 campos de la laminilla, observando la cantidad y las características celulares de las células epiteliales vaginales y se utilizó como base, la celularidad típicamente encontrada en otras especies de mamíferos y primordialmente lo descrito para conejos domésticos (de Buen, N 2001; Tsiligianni, 2004, Ola 2008, Ypsilantis et al 1996 , Bibbo y Wied 1991). Durante el periodo del muestreo se tuvo la oportunidad de realizar una revisión macro y microscópica de un útero de una hembra de zacatuche adulta que murió en el Zoológico de Chapultepec y se pudo comparar con la anatomía e histología de la coneja doméstica.



Figuras 3 y 4. Sujeción física, revisión vulvar y toma de muestra citológica.

### 4.3 Colecta de muestras para monitoreo hormonal

Las heces se tomaron (cúmulo de 24 horas) del piso de la jaula de cada hembra. Dichas muestras se tomaron de manera aleatoria de lunes a viernes durante 12 semanas y se pesaron de 0.5 a 1 gr. de heces por muestra, estas heces se congelaron a  $-14^{\circ}\text{C}$  hasta su proceso para extracción de metabolitos en el laboratorio. En las hembras del grupo C (grupo control), sólo se colectaron heces y se realizaron determinaciones hormonales para Progesterona (P4) y  $17\beta$  Estradiol (E2).

Las muestras fueron procesadas desde su extracción, determinación y análisis de los resultados en el laboratorio de la Dra. Marta Romano del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, IPN, con la asesoría del Biol. Ricardo A. Valdez auxiliar de investigación del mismo laboratorio, y de la MVZ. M en C. Alba Rodas Martínez con la asesoría para la obtención de los extractos de heces y los porcentajes de recuperación. Los estuches comerciales utilizados PROG-CTRIA de CISBIO Bioassays Francia para la medición de P4 y ESTR-CTRIA Bioassays Francia para la medición de E2, reactivos amablemente proporcionados por la Dra. Marta Romano P; el marcador o trazador utilizado para ambas mediciones hormonales (P4 y E2) fue Yodo  $\text{I}^{125}$ . Las muestras utilizadas para la evaluación de las concentraciones hormonales se describen en el cuadro I.

Cuadro I Muestras para RIA que corresponden a colecta del último mes tanto para el grupo A como para el grupo C

Día de muestreo	Fecha	Hembras grupos
41	200709	A y C
45	240709	A y C
46	270709	A y C
50	310709	A y C
51	030809	A y C

55	070809	A y C
56	100809	A y C
60	120809	A y C

#### **4.4 Extracción hormonal y porcentaje de recuperación hormonal**

El método de extracción utilizado fué el método seco, descrito por Brown et al (1994), modificado por Brousset (2005). Las heces se mantuvieron en congelación a – 14 °C desde el momento de la colecta, se descongelaron y los “pellets” de heces se desbarataron previamente para después deshidratar en un horno de convección mecánica de 65 a 210°C marca Precision Scientific (de 2 a 4 horas); una vez deshidratadas se pulverizaron con ayuda de un mortero y tamizadas para separar los fragmentos vegetales más grandes. Nuevamente se guardaron en congelación en tubos cerrados e identificados. Ya pulverizadas todas las muestras se pesaron en una balanza digital marca Precision 220M, obteniendo 0.2 g y se colocaron en tubos de vidrio donde se agregaron 5 ml de etanol al 80% diluido con agua destilada, se mezclaron con vórtex durante 1 minuto, se llevaron a ebullición a 75-78°C durante 20 minutos, se recuperó el volumen deshidratado a 5 ml y se centrifugaron durante 20 minutos en una centrífuga Beckman modelo TJ-6 con unidad de refrigeración USA; posteriormente se decantaron a tubos de vidrio limpios y se llevaron a deshidratación con aire a presión a baño María (Marca Precision) (37°C), este proceso duró de 2 a 5 horas, posteriormente se agregó a cada tubo deshidratado 1 ml de etanol absoluto para resuspensión y se llevó a agitación en vórtex (Multitube Vortexer (VWR) durante 20 minutos; posteriormente se reposaron las muestras 30 minutos y se centrifugaron durante 20 minutos, luego se decantaron en tubos tapados de polipropileno y se mantuvieron en congelación a -20 grados centígrados hasta el momento de la lectura hormonal.

#### 4.5 Análisis de esteroides

Para la validación de los ensayos fecales se eligieron al azar extractos de cuatro hembras y se realizaron pruebas de porcentaje de recuperación con el fin de conocer si existiera una posible interferencia causada por las sustancias contenidas en la muestra lo cual es independiente a los antígenos específicos de la unión del anticuerpo, por lo que esta prueba revela el grado en que la concentración medida corresponde a la concentración real de una sustancia. Para este método, se utilizó la fórmula:

$\% \text{ de recuperación} = \text{monto observado} / \text{importe esperado} * 100$  (Brown 2008).

Se utilizaron los estuches comerciales (Cis Bio®) de acuerdo a los lineamientos del producto. Los extractos fueron diluïdos con solución amortiguadora o “buffer”, preparado en el laboratorio. Las determinaciones para P4 y E2 se realizaron con los estuches comerciales (determinación cuantitativa directa) de Cisbio Bioassays® Francia (Prog-CTRIA para P4 y Estr-CTRIA para E2). Ambos equipos utilizan anticuerpos policlonales de conejo anti P4 o anti E2 humanos. La reacción cruzada en el equipo para la determinación del E2 es: 100% para Estradiol, 3.5% para estriol, 1.7% para estrona, 1.16% para 17 alfa etinilestradiol, 0.26% para androstenediol, 0.15% para 2 metoxi estradiol y 17 alfa estradiol, 0.07% para Nortestrel y 0.02% para Estrona 3 B-D-glucurónido. Las reacciones cruzadas del anticuerpo para P4 son: Progesterona con 100%, Desoxicorticosterona 6.2%, 20 alfa dihidroprogesterona con 2.2%, 6 beta dihidroprogesterona con 2.1%, 16 alfa hidroxiprogesteroa con 1.6%, 5 beta dihidroxiprogesteroa con 0.7%, 17 alfa hidroxiprogesteroa con 0.5%, Testosterona con 0.09%, cortisol con <0.02%, al igual que con el estradiol y la pregnenolona.

Se realizaron validaciones y comparaciones fisiológicas con el fin de estandarizar la técnica. La validación en el RIA es crucial para demostrar que las mediciones hormonales reflejan con precisión los eventos fisiológicos de interés y se considera fundamental para demostrar que las fluctuaciones en el metabolito hormonal que se está midiendo, proporciona información fisiológicamente

relevante (Brown 2008). Se utilizaron extractos de heces de algunas hembras para ambas hormonas para este fin. Para la P4 se hicieron pruebas de paralelismo con extractos de heces de tres hembras por duplicado con las diluciones 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80 (ANEXOS, cuadro 7, figura A). Para E2, se eligieron muestras de 2 hembras que se corrieron por duplicado y con las mismas diluciones que para la P4 (ANEXOS, cuadro 8, figura B). También se realizaron pruebas de paralelismo para E2 con un extracto de heces y diluyendo en solución amortiguadora para RIA (buffer RIA) y con el estándar 0 del estuche comercial de estradiol (ANEXO, cuadro 9, figura C). Se calcularon las mejores diluciones para trabajar las muestras (extractos) en los estuches comerciales, de las zacatuches quedando 1:12 para P4 y 1: 5 para E2.

Se calcularon coeficientes de variación para ambas hormonas. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron de 2.9 y 12.8 % respectivamente para la progesterona. Coeficientes de variación para E2. Intra e interensayo 23% y 14% respectivamente. Los resultados fueron analizados siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 4.6 Análisis estadísticos

Se realizaron promedios y desviaciones estándar para los conteos celulares por hembra. Se calcularon promedios generales para células superficiales, intermedias y parabasales en 2 grupos de zacatuches (Ay B). Se utilizó un modelo de mediciones repetidas

$$y_{ijkl} = \mu + G_i + A_{j(i)} + \delta_{(ij)} + D_k + \epsilon_{(ijk)l}$$

donde:  $y_{ijkl}$  es la l-ésima observación aleatoria de las células superficiales, intermedias y parabasales (CS, CI y CP), asociadas al k-ésimo día, a la j-ésima hembra y al i-ésimo grupo.  $\mu$  es el promedio poblacional, G es el efecto del l-ésimo grupo (grupo A y grupo B);  $A_{j(i)}$  es el efecto de la j-ésima hembra anidada en el i-ésimo grupo,  $\delta_{(ij)}$  es el error de restricción debido a la aleatorización de las

hembras dentro del i-ésimo grupo NID ( $0, \sqrt{\sigma^2 d}$ );  $D_k$  es el efecto del k-ésimo día de observación y el  $\epsilon_{(ijk)l}$  es el error aleatorio NID( $0, \sigma^2$ ). Los datos fueron transformados a arco-seno ( $\sqrt{p}$ ) para cumplir con los supuestos de normalidad.

Análisis hormonal: Los resultados de los estuches comerciales se analizaron conforme lo indica y recomienda el fabricante para las dos hormonas. Se calculó el promedio y el error estándar para la P4 por grupo. No así con el E2 debido a que no resultaron confiables las concentraciones obtenidas.

Correlaciones: Se calculó una correlación intraclase entre la celularidad superficial y el color de la mucosa vulvar.

Se correlacionó la celularidad vaginal y concentraciones hormonales (P4)

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Morfología uterina

Se revisó la estructura macroscópica e histológica un útero recuperado de un zacatuche hembra que murió en cautiverio. En términos generales, se observó el mismo tipo de distribución anatómico (macroscópico) (figura 5) y el mismo tipo de epitelios uterino y vaginal (figura 6) que refiere

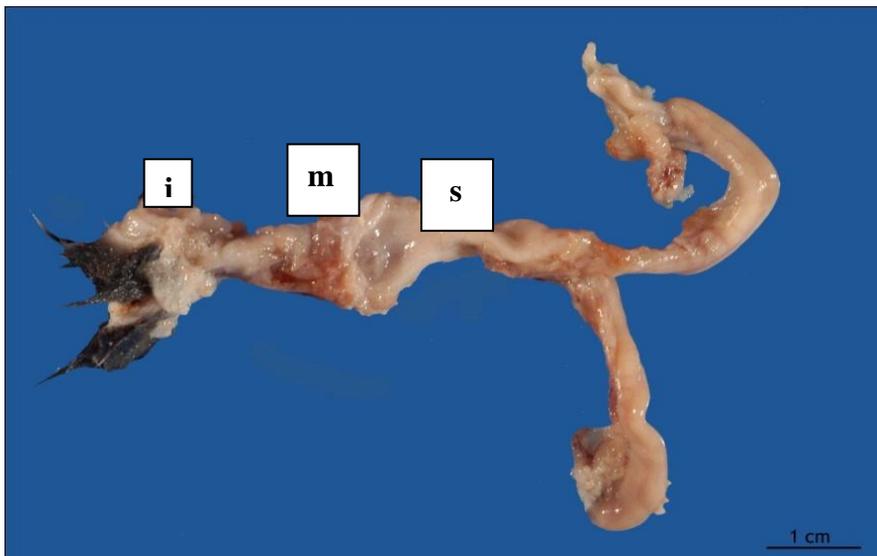


Figura 5 Fotografía. Aspecto macroscópico de un útero de, Zacatuche hembra adulta. s= tercio superior, m= tercio medio, i= tercio inferior.

Oh et al 2003 para la coneja doméstica (*Oryctolagus cuniculus*). En la zacatuche, el primer tercio de la vagina (superior) se observó un epitelio columnar simple con presencia abundante de músculo liso. En el segundo tercio vaginal (intermedio), se observó un epitelio columnar simple. En el tercer tercio vaginal (inferior), se observó un epitelio escamoso estratificado no queratinizado, que es el lugar donde se obtiene la muestra para citología vaginal (ver referencia punto 1.10).

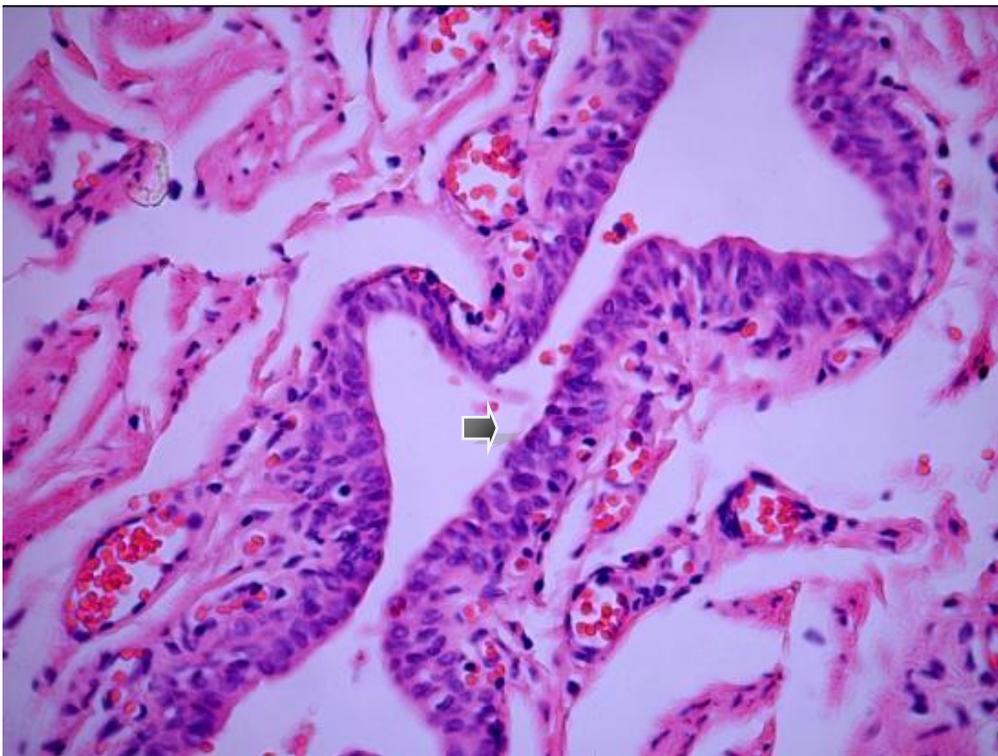


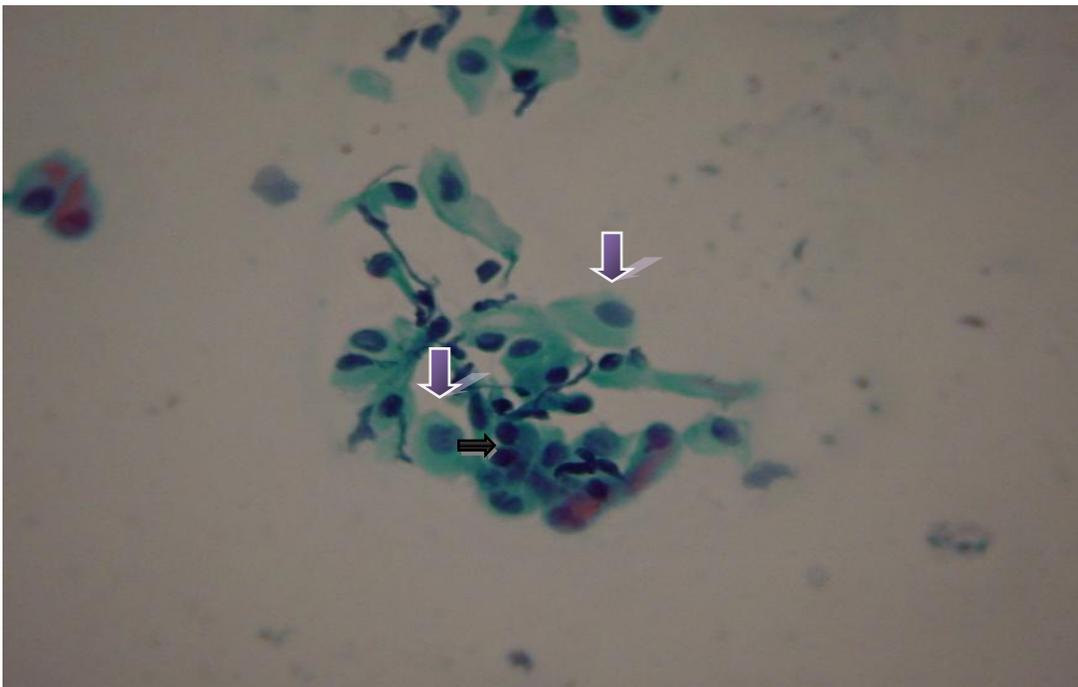
Figura 6 Fotomicrografía de tercio inferior de la vagina de un zacatuche H&E 40X. Se observa epitelio estratificado plano no queratinizado (flecha).

## 5.2 Citología vaginal

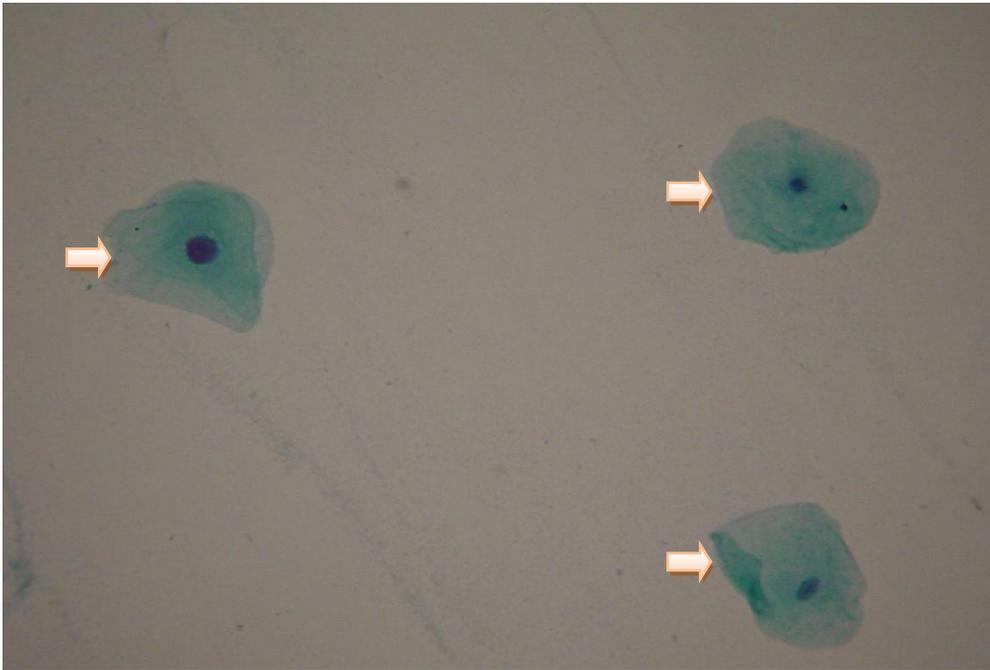
Se realizó el conteo celular de las citologías vaginales de cada una de las hembras, tanto del grupo A como del grupo B mediante el índice de maduración (manifestado por porcentaje de sus constituyentes): células basales-parabasales (Pb), intermedias (I) y superficiales (S), también es común la utilización del índice de Frost, muy parecido al índice de maduración, sólo que en éste se realizan conteos por porcentaje de células basales/intermedias/superficiales (Bibbo y Wied 1991, de Buen 2001). Aparte, en los cuadros se muestra el porcentaje celular constituyente por células inflamatorias polimorfonucleares (PMN) en los casos en que se encontraron presentes en las citologías. Los resultados de los conteos celulares se muestran en los cuadros 3 y 4 tanto para el grupo A como para el grupo B (ANEXOS). Los gráficos de estos conteos (figuras 11 a 20) muestran por hembra los porcentajes de células epiteliales y sus reflejos hormonales durante todo el periodo del muestreo; con flechas se marca la celularidad superficial presente a partir del 50 % considerándose como mayoría celular superficial con influencia estrogénica. En el mismo sentido, en los cuadros 5 Y 6 (ANEXOS) se encuentran los porcentajes que corresponden a los conteos celulares que manifiestan exclusivamente la mayoría de células superficiales que indicarían influencia estrogénica predominante para todas las hembras sometidas a este estudio; para facilitar la visualización de estos conteos superficiales, en estos cuadros se eliminaron los porcentajes menores al 50% además de las células intermedias (influencia progestacional) y parabasales. Ver fotomicrografías de citologías vaginales de las zacatuches (figuras 7 a 10).

Para las **células intermedias**, las cuales reflejan una influencia progestacional, presentes también en muchas hembras por arriba del 50%, tampoco presentan una sincronía periódica (influencia progestacional) y se describen por hembra y los días donde se presenta esta mayoría celular (ver figuras 7 a 16): **Hembra 1** días 1, 2, 11, 12, 14, 16, 17, 18, 21, 24, 25, 26, 31, 32, 35, 39, 41, 45, 54, 56, 57 y 59. **Hembra 2** días 1, 2, 4, 19, 25, 27, 42, 44, 45, 49, 50 y 51. **Hembra 3** días 2, 10, 11,

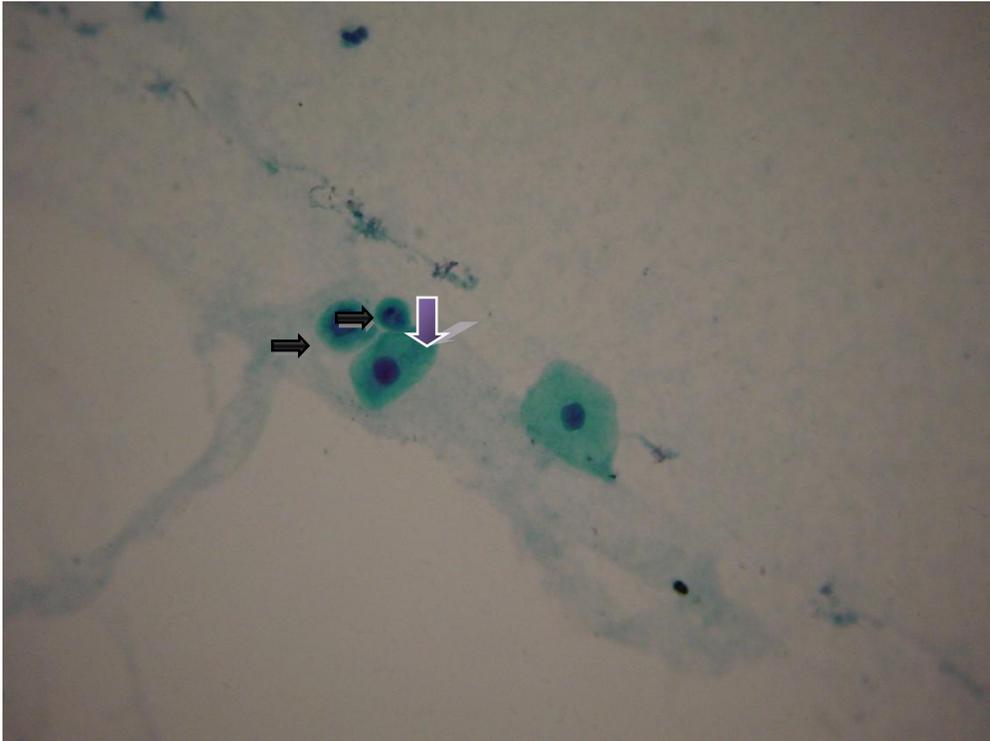
14, 19, 21, 27, 39, 63, 51, 54, 55, y 56. **Hembra 4** días 17, 21, 22, 31, 39, 49, 51, 52 y 56. **Hembra 5** días 1, 9, 14, 17, 19, 20, 24, 27, 31 y 59. **Hembra 6** día 11. **Hembra 7** día 6, 14, 16 y 59. **Hembra 8** días 1 y 44. **Hembra 9** días 1, y 16. **Hembra 10** días 1, 9, 26, 29, 36, 39, 41, 44, 46, 51, 54 56). La presencia de **células parabasales** en algunas zacatuches con predominio de las mismas es esporádica (ver figuras 7 a 16): **Hembra 3** días 1 y 29. **Hembra 4** día 4. **Hembra 5** días 4, 16 y 37. **Hembra 7** día 1. **Hembra 8** día 6, 11 y 16.



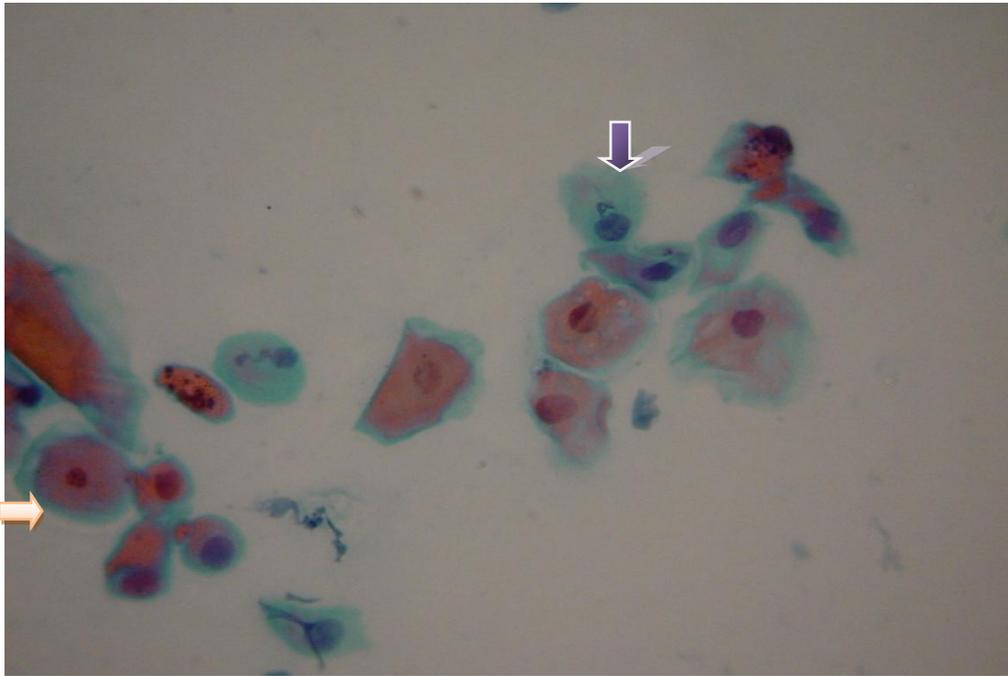
**Figura 7.** Fotomicrografía 40X. Papanicolaou. Citología vaginal. Zacatuche. Hembra 1, día 1 del muestreo. Células parabasales Pb ⇒ e intermedias I ↓



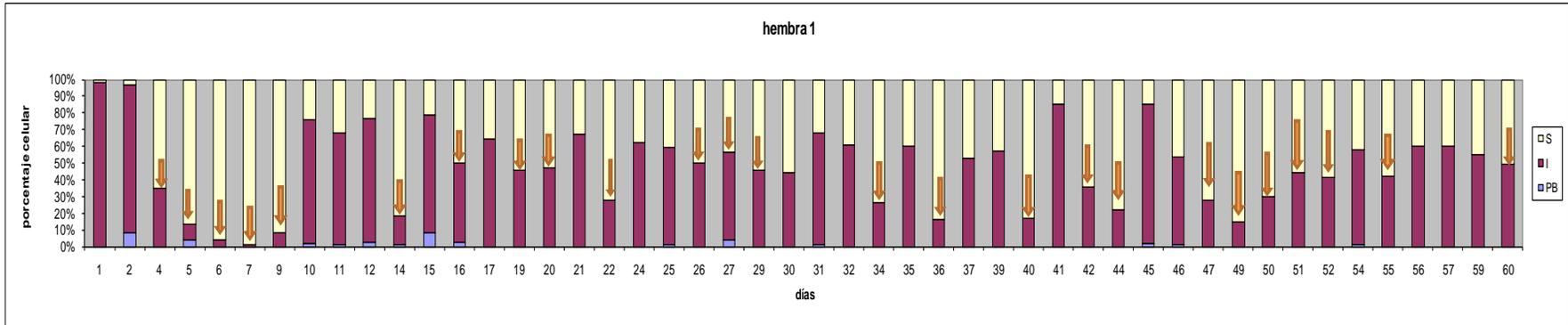
**Figura 8.** Fotomicrografía 40 X. Papanicolaou. Citología vaginal. Zacatuche. Hembra 1 día 6. Células superficiales →



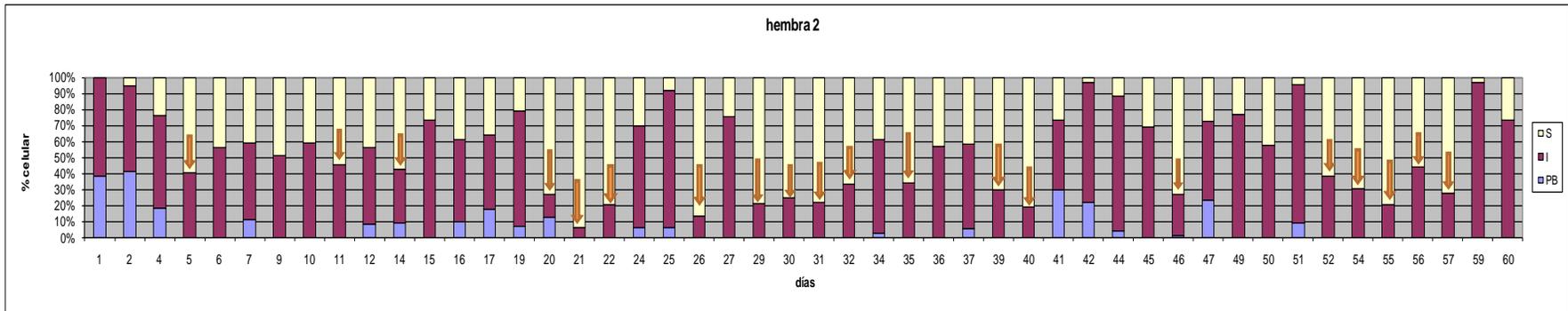
**Figura 9.** Fotomicrografía 40X. Papanicolaou. Citología vaginal. Zacatuche. Hembra 1 día 7 del muestreo. Células parabasales ⇨ e intermedias ↓



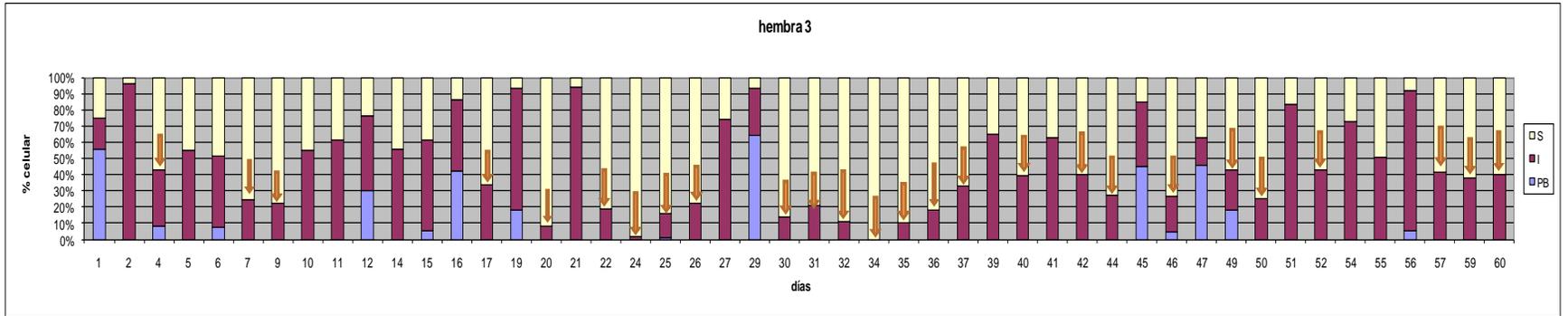
**Figura 10.** Fotomicrografía 40X. Papanicolaou. Citología vaginal. Zacatuche. Hembra 1 día 15 del muestreo.  
Células intermedias ↓ y Superficiales →



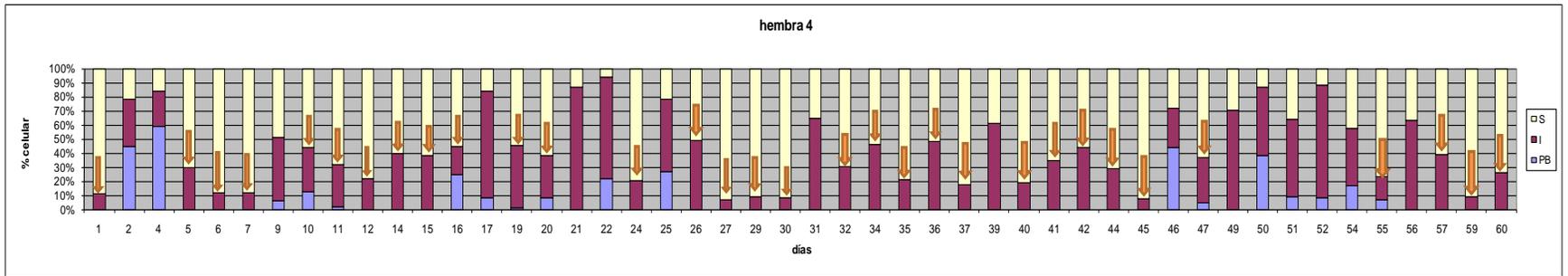
**Figura 11. Hembra 1 grupo A.** Composición porcentual de la celularidad vaginal. Pb: parabasaes, I: intermedias, S: superficiales. Flechas indican predominio de células superficiales (porcentaje a partir de 50%).



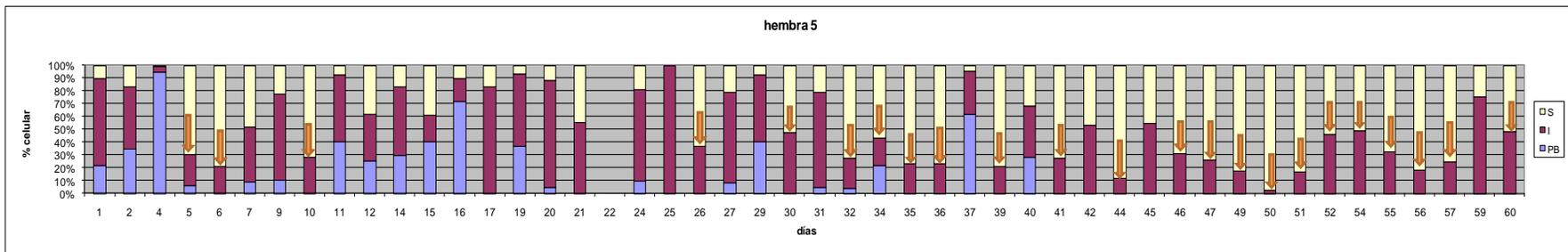
**Figura 12. Hembra 2, grupo A.** Composición porcentual de la celularidad vaginal. Pb: parabasaes, I: intermedias, S: superficiales. Flechas indican predominio de células superficiales (porcentaje a partir de 50%).



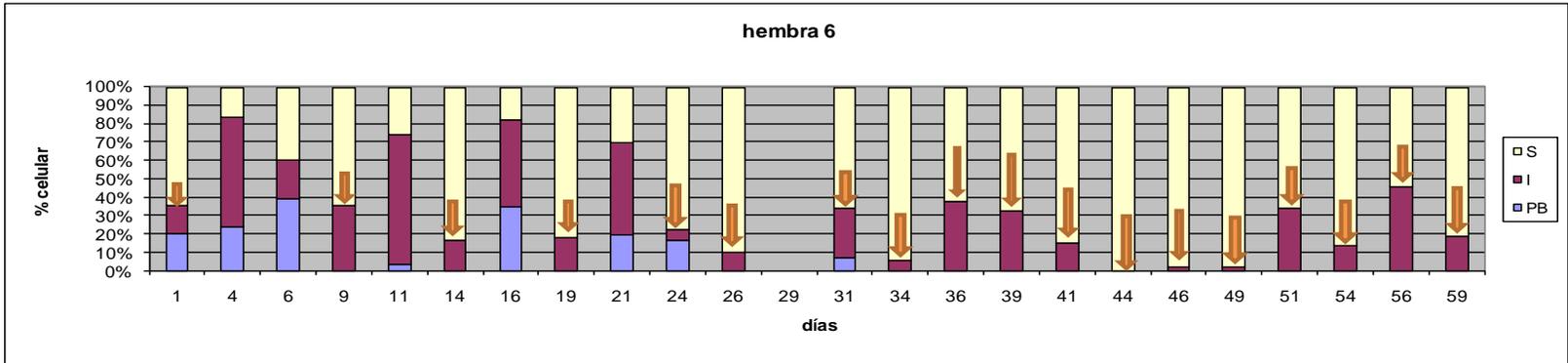
**Figura 13. Hembra 3, grupo A.** Composición porcentual de la celularidad vaginal. Pb: parabasaes, I: intermedias, S: superficiales. Flechas indican predominio de células superficiales (porcentaje a partir de 50%).



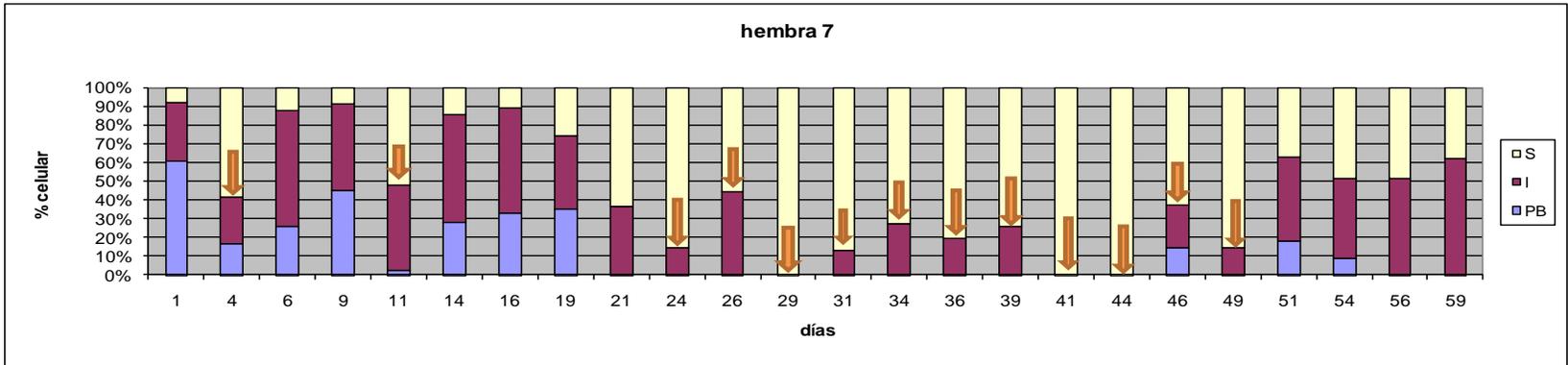
**Figura 14. Hembra 4, grupo A.** Composición porcentual de la celularidad vaginal. Pb: parabasaes, I: intermedias, S: superficiales. Flechas indican predominio de células superficiales (porcentaje a partir de 50%).



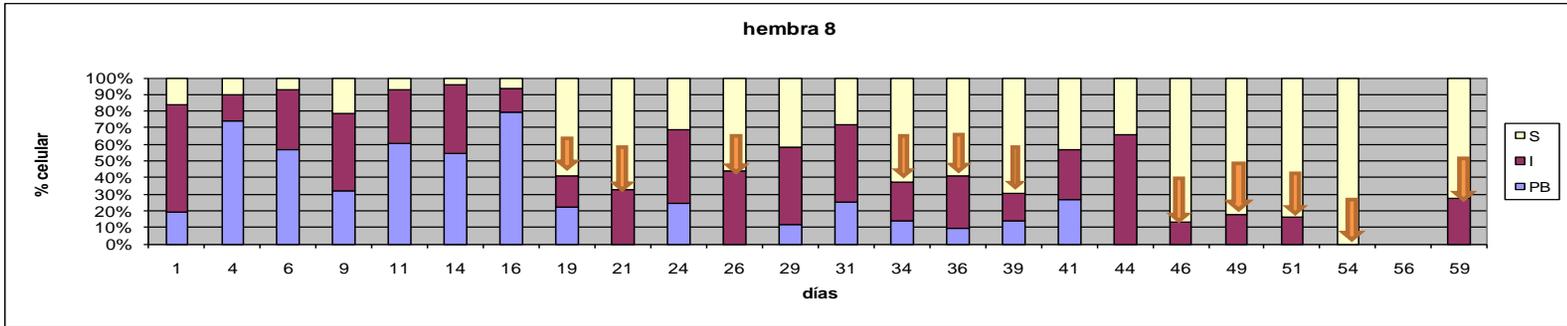
**Figura 15. Hembra 5, grupo A.** Composición porcentual de la celularidad vaginal. Pb: parabasaes, I: intermedias, S: superficiales. Flechas indican predominio de células superficiales (porcentaje a partir de 50%).



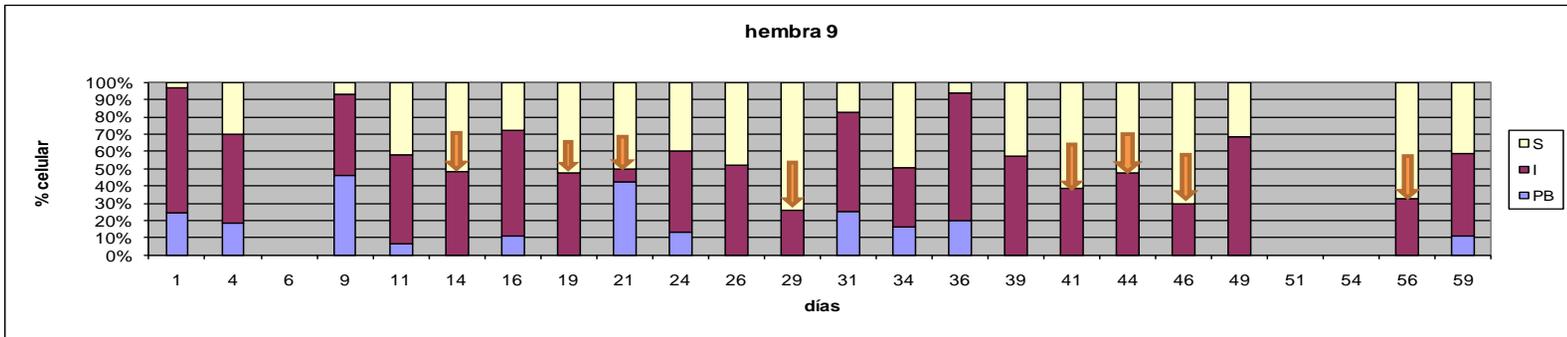
**Figura 16. Hembra 6, grupo B.** Composición porcentual de la celularidad vaginal. Pb: parabasales, I: intermedias, S: superficiales. Flechas indican predominio de células superficiales (porcentaje a partir de 50%).



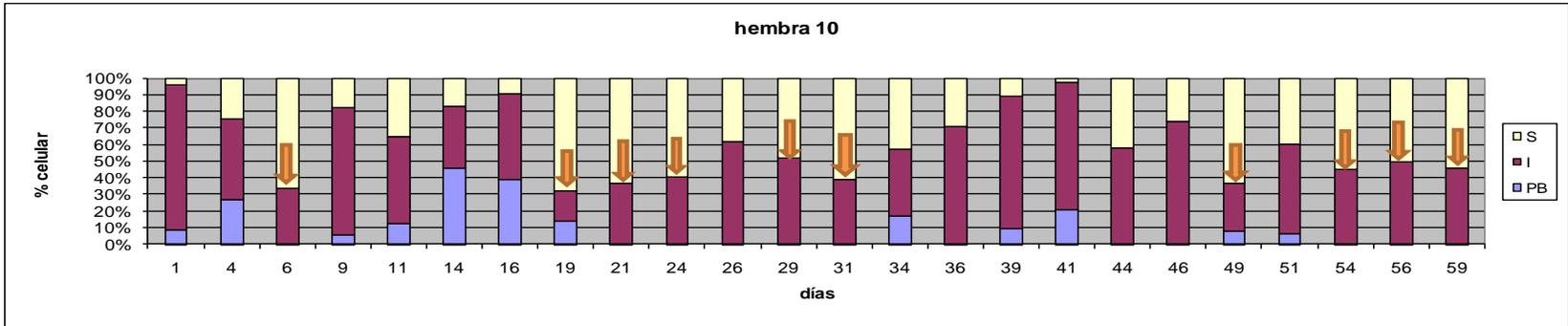
**Figura 17. Hembra 7. Grupo B.** Composición porcentual de la celularidad vaginal. Pb: parabasales, I: intermedias, S: superficiales. Flechas indican predominio de células superficiales (porcentaje a partir de 50%).



**Figura 18. Hembra 8, grupo B** Composición porcentual de la celularidad vaginal. Pb: parabasaes, I: intermedias, S: superficiales. Flechas indican predominio de células superficiales (porcentaje a partir de 50%).



**Figura 19. Hembra 9, grupo B.** Composición porcentual de la celularidad vaginal. Pb: parabasaes, I: intermedias, S: superficiales. Flechas indican predominio de células superficiales (porcentaje a partir de 50%).



**Figura 20. Hembra 10, grupo B.** Composición porcentual de la celularidad vaginal. Pb: parabasaes, I: intermedias, S: superficiales. Flechas indican predominio de células superficiales (porcentaje a partir de 50%).

### **5.3 Coloración de la mucosa vulvar**

A partir del día 41 del muestreo (último mes), se evaluó tanto del grupo A como del grupo B, la coloración de la mucosa vulvar. En los cuadros 10 Y 11 (ANEXO) se observan los cambios en la coloración vulvar contra los conteos celulares (por hembra y por día). El porcentaje promedio por grupo de células superficiales respecto a color de mucosa vulvar fue: grupo A: 45.7% de células superficiales presentes para el color blanco, 54.1% para el color rosa, 49.5% para el color rojo y 25% para el color púrpura. El porcentaje promedio por grupo de células superficiales respecto a color de mucosa vulvar para el grupo B fué: 58% de células superficiales presentes para el color blanco, 71.8% para el color rosa, 56.2% para el color rojo y no se observó en este grupo el color púrpura. Se encontró una correlación intraclase de 26% (color: células superficiales).

#### **5.4 Radio Inmuno Análisis**

Se realizaron los extractos de las muestras de heces mediante el método seco, como se describe en la sección de material y métodos. De los resultados para evaluación del porcentaje de recuperación para ambas hormonas, el método de extracción recuperó 67.4% para P4 y 63.7% para E2.

Para las evaluaciones hormonales, los resultados de las concentraciones de P4 son descritos en el cuadro II, también se muestran promedios de dichas concentraciones por hembra durante todos los días evaluados (días 41 a 60).

Los resultados de las concentraciones de E2 fueron superiores a las que estima confiablemente la curva estándar del estuche comercial (hasta 5.0 ng/ml). Estos resultados sugieren que existen problemas con el anticuerpo que contiene el estuche comercial, por lo tanto, antes de trabajar con diluciones mayores es necesario aclarar los problemas técnicos (ver discusión). A pesar de esto, se mencionan enseguida los promedios generales obtenidos por grupo (A y C) únicamente como referencia al lector. Grupo A  $14.26 \pm 6.67$  ng/ml. Grupo C  $7.28 \pm 6.64$  ng/ml.

Cuadro II. Resultados de la concentración hormonal para P4 por hembra por día, además de promedios por hembra.

días	Grupo A					Grupo C				
	H1 P4	H2 P4	H3 P4	H4 P4	H5 P4	H11 P4	H12 P4	H13 P4	H14 P4	H15 P4
41	124.2	161.7	82.7	118.4	57	26.15	36.7	28.2	24.6	56.2
45	76.2	53.4	89.9	72.6	60.5	14	18.4	31.9	30.8	48.1
46	158.9	114.7	132.4	112	46.4	24.6	14.9	22.5	25.6	61.1
50	90.4	75.8	81.5	60.8	60.6	27.9	20.5	36.3	23	35.5
51	45.1	92.7	117.6	67.4	45.9	22.3	25.6	26.2	22.4	33.7
55	110.6	140.6	171.5	98.6	114.4	25	37	55.8	30.4	42.7
56	178.8	113.8	153.3	115.5	86.9	16.8	29	48.1	33.7	37
60	152.9	232.8	188.3	131.1	58	313.7	38	69.8	34.5	27.8
<b>promedios</b>	117.1375 ±45.5	123.1875 ±56.06	127.15 ±41.3	97.05 ±26.6	66.2125 ±23.2	58.80625 ±103.1	27.5125 ±9.1	39.85 ±16.5	28.125 ±4.8	42.7625 ±11.5

Progesterona para (P4) P4 en ng/ml. H1:5, H11:15 corresponde al número de hembra.

El promedio de la concentración hormonal en el grupo A fué de 106.14±25.14ng/ml y para el grupo C de 39.41±12.81ng/ml, con diferencia significativa entre los grupos A y C  $p < 0.0007$ .

## **5.5 Resultados estadísticos**

### **5.5.1 Citologías**

En el cuadro 12 (sección anexos) se encuentra el cuadro con los promedios de cada tipo celular vaginal por hembra. El promedio general para cada tipo celular por grupo fue:

Grupo A: células superficiales  $0.5\pm 0.03$  (50%), células intermedias  $0.42\pm 0.03$  (42%) y células parabasales  $0.06\pm 0.01$  (6%).

Grupo B. células superficiales  $0.51\pm 0.05$  (51%), células intermedias  $0.36\pm 0.05$  (36%) y células parabasales  $0.11\pm 0.03$  (11%).

Los promedios de cada tipo celular vaginal arrojaron diferencias significativas por día  $p < 0.05$ , sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para los valores obtenidos entre los dos grupos evaluados, es decir, su comportamiento en la dinámica entre el grupo A y el grupo B son similares.

Se encontró diferencia significativa entre los grupos celulares durante los días de estudio para la celularidad superficial ( $p < 0.001$ ), para la celularidad intermedia  $p = 0.05$  y  $p < 0.0001$  para la celularidad compuesta por células parabasales. Sin embargo, para la celularidad del epitelio vaginal evaluada entre grupos, no se encontró diferencia significativa, donde para células superficiales  $p = 0.8770$ , para la celularidad intermedia es  $p = 0.3910$  y para la celularidad compuesta por parabasales es  $p = 0.2616$ .

Se obtuvo la correlación intraclase entre la celularidad superficial y el color de la mucosa vulvar la cual fue de 26%.

### **5.5.2 Hormonales**

En el cuadro II en la sección de resultados (punto 5.4) se describen las concentraciones hormonales (P4) por hembra y sus promedios (ambos grupos, A y C). Se realizó correlación hormonal (P4) con la celularidad Superficial, Intermedia y Parabasal (promedios) de las hembras del grupo A, donde 0.2 fue el valor de correlación para la P4:células superficiales, 0.4 para la correlación P4: células intermedias y -0.7 para la correlación P4: células parabasales (cuadro III).

Cuadro III Correlación entre la celularidad vaginal y la concentración hormonal (P4)

<b>Intermedias y Parabasales (grupo A)</b>			
<b>Células</b>			
	<b>Superficiales</b>	<b>Intermedias</b>	<b>Parabasales</b>
<b>P4</b>	0.208925388	0.41452586	-0.731980456
<b>P4: Progesterona</b>			

## 6. DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados de los estudios realizados a las hembras de zacatuche, se encontraron evidencias de que no existe, al igual que en la coneja doméstica, un ciclo estral definido por fases (proestro, estro, diestro y anestro) en comparación con otras especies como por ejemplo la perra (Feldman 2007). Los resultados observados en la citología vaginal de esta investigación, ofrecen un buen panorama respecto al “ciclo estral” de la hembra del zacatuche. Las evaluaciones celulares muestran que, aunque existe cierta ciclicidad por la presencia de incrementos en la celularidad superficial (influencia estrogénica con conteos por arriba del 50%) no manifiestan una dinámica periódica y definida; lo mismo sucede con la evaluación de células intermedias y parabasales, las que manifestarían influencia progestacional y anestro respectivamente (Feldman 2007; Ola y Oyegbade 2008). Se aprecia sin embargo un comportamiento citológico entre grupos semejante; esto no quiere decir que se observe sincronía o periodicidad. La evaluación por día mostró una diferencia estadística para dichos cambios celulares por hembra ( $p < 0.05$ ).

El incremento de células superficiales (influencia estrogénica) en cada observación citológica, pudo ser provocado mecánicamente debido al hisopado al momento de la toma de la muestra; existen datos en coneja doméstica, donde el estímulo cervico-vaginal provocado de manera mecánica (artificialmente) puede inducir ovulación, aunque con resultados aleatorios (Rossel 2000), pudiendo ser una razón de la presencia citológica de superficiales de manera recurrente aunque sin manifestación de ciclos periódicos y ser una evidencia importante de ovulación inducida, lo que podría explicar el hallazgo respecto a la dinámica celular observada en las zacatuches. Como ya se ha referido, las hembras de este estudio permanecieron en jaulas individuales,

aisladas físicamente de hembras y machos, sin embargo, haciendo referencia al estudio de Ola y Oyegbade (2008) quienes realizaron citologías vaginales en grupos de conejas *Oryctolagus cuniculis* expuestas a diferentes bioestímulos (visual, olfativo y auditivo), obtuvieron resultados similares (sin un patrón específico) a los registrados en la presente investigación. En el citado estudio, los autores concluyeron que la coneja doméstica no presenta evidencia alguna de ciclo citológico y que son de ovulación inducida, esta última información es referida también por otros autores (Tiligianni 2004, Rossell 2000). Las hembras *Romerolagus*, aunque aisladas físicamente, mantuvieron en todo momento contacto sensorial con machos y hembras del albergue (olfativo y auditivo principalmente), lo cual pudo también influir en los cambios en los conteos celulares ya descritos y que este tipo de bioestímulos podrían ser importantes en esta especie. En algunas especies domésticas como la cabra se requiere de mayor contacto para que esta bioestimulación tenga efecto (Álvarez y Zarco 2000). En felinos silvestres, mismos que presentan una ovulación inducida, se ha evidenciado que luego de la etapa de estro y sin haber tenido estimulación coital, ocurre una pseudogestación que dura aproximadamente un 70% del periodo normal de la gestación, seguida por un anestro caracterizado por la ausencia de actividad o ciclicidad ovárica, la progesterona y el estradiol en esta etapa están en niveles basales durante esta fase y la hembra se encuentra sexualmente inactiva. En ovuladoras inducidas, la liberación de LH es un factor clave para la ovulación y esta liberación generalmente es inducida por un estímulo físico, generalmente el coito. Es importante comentar que existen registros de altas concentraciones de P4 sérica o de progestágenos fecales en presencia de CL en hembras de félidos que no tuvieron contacto físico con un macho. Estos resultados muestran que hembras de determinadas especies pueden algunas veces ovular espontáneamente o por una respuesta diferente a un estímulo que no es el coito y que los folículos pueden sufrir luteinización como es el caso del *Leopardus wiedii* (Moreira 2007).

En las *Romerolagus* y refiriendo al día uno del muestreo vaginal en donde las hembras no habían sido manipuladas, se esperaba celularidad manifiesta de anestro (parabasales en su mayoría), sin embargo los hallazgos celulares fueron: células

intermedias, predominantes en el 60% de las hembras (lo cual manifiesta una influencia progestacional, lo cual indica actividad ovárica y folicular), el 20% mostraron mayoría para células superficiales (influencia estrogénica) y el restante (20%) presencia de células parabasales. Estas observaciones podrían evidenciar, que para promover su reproducción continua a lo largo del año son importantes los efectos producidos por los ya citados bioestímulos por parte de hembras y machos de la especie.

Es recomendable que, en futuros estudios llevados a cabo con citología vaginal en zacatuches, se considere aislar totalmente a un grupo de hembras para evaluar el comportamiento citológico de manera longitudinal y eliminar los efectos de los bioestímulos anteriormente descritos. No hay que olvidar que los zacatuches son de naturaleza gregaria y se reproducen durante todo el año (Fa y Bell 1990, Romero y Cervantes 2005, Matsuzaki et al 1996), aunque se ha considerado que en vida libre, el *Romerolagus* podría seguir un patrón reproductivo determinado por la disponibilidad de alimento (Matsuzaki et al 1996). Los bioestímulos referidos, podrían prepararlos para reproducirse continuamente. Los registros de nacimientos durante el 2009 en el zoológico de Chapultepec se produjeron durante todo el año, siendo los meses de marzo y abril en los que se registró un mayor número (29 y 36 individuos nacidos respectivamente) y octubre y febrero con el menor registro (8 y 12 individuos nacidos respectivamente). De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se considera que esta especie presenta una ovulación inducida, lo que permitiría mantener una constante receptividad al macho; este aspecto podría traducirse en una mayor eficiencia en la reproducción de la especie (a pesar de que el número de gazapos por parto sea bajo) y pudiera ser un factor de su resistencia a la total extinción pues cabe recordar que los factores a los cuales se encuentran expuestos (naturales y antropogénicos) son muy complejos (ver puntos 1.3 a 1.6 para mayor referencia). En este estudio, no se contempló la medición de algún parámetro relacionado con el bienestar de estos individuos para evaluar si el estrés por el manejo al momento de la toma de la citología vaginal hubiera tenido un efecto reflejo en los resultados hormonales y citológicos y su respuesta a la manipulación pudiese haber sido afectada debido al estrés; a pesar de esto se considera que el estrés tendría que tender a la

cronicidad existiendo entonces interferencia entre los dos ejes regulados por parte del hipotálamo, el que conecta a la hipófisis con las adrenales y el que lo hace con las gónadas. La secreción de hormonas hipotalámicas e hipofisiarias que promueven la reacción de estrés afectan la ritmicidad de las que regulan los ciclos reproductivos (Valdespino et al 2007). La exposición continua de un animal a condiciones que le provoquen estrés, puede entonces aumentar sus niveles de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y esteroides corticales, al igual que la prolactina, estas hormonas tienen la capacidad de bloquear la ovulación mediante la inhibición de GnRH, LH y Estradiol (Alvarez y Zarco 2001, Welch et al 1999). Por otro lado, existen datos de que cuando se trata de individuos dominantes y el estrés es constante, ocurren mecanismos que contrarrestan la inhibición a la reproducción y ésta continúa (Li et al 1999). Sin embargo en las hembras de zacatuche estudiadas, fue notorio que se encontraban más relajadas al momento de la contención física a partir del segundo mes del muestreo ya que la sujeción era momentánea (menos de 30 segundos por toma de muestra); frecuentemente, la muestra citológica se contaminaba con orina producida por las hembras al momento del muestreo, situación que prácticamente se eliminó conforme avanzaba el tiempo del mismo), tampoco se observó modificación alguna en la dinámica celular vaginal, ni tampoco en las concentraciones de P4 durante el periodo de muestra, por lo que se considera que las hembras toleraron el manejo y se habituaron al mismo a partir del segundo mes. El mantenimiento de estas 15 hembras (todas nacidas en cautiverio) se consideró exitoso y tanto el encierro como el manejo fueron bien tolerados (de abril a agosto de 2009). La mayoría de las hembras incrementaron su peso al final del tiempo del muestreo (ver medidas morfométricas, sección anexos) y no se tuvo ningún deceso.

Algunos estudios donde se evaluaron concentraciones de esteroides en coneja doméstica con el fin de comparar concentraciones de P4 y E2 en hembras gestantes y pseudogestantes (Browning et al 1980) presentan los siguientes resultados: 8ng/ml de P4 en hembras pseudogestantes (suero sanguíneo) 12 días post apareamiento y <8ng/ml en conejas evaluadas al mismo tiempo post apareamiento pero tratándose de hembras gestantes. Para el E2, los mismos autores refieren concentraciones <3pg/ml

en hembras pseudogestantes y  $>4\text{pg/ml}$  en hembras gestantes hacia los días 4 a 6 post apareamiento (Browning et al 1980). En otro estudio donde se evalúan niveles circulantes de estrógenos en conejos con el fin de evaluar las alteraciones en el flujo sanguíneo en estructuras vaginales se encontró que en el grupo control el cual no fue sometido a ningún tratamiento, la concentración de E2 fue de  $38.5\pm 7.6\text{ng/ml}$ ; en este caso, la hormona fue medida con un estuche comercial para radioinmuno análisis (Park et al 2001) similar al utilizado con las zacatuches en el presente estudio. Para las *Romerolagus* las concentraciones de E2 se obtuvieron por arriba de la curva estándar del estuche comercial (Cis Bio®) la cual va de 20 a 5000pg/ml, estos resultados arrojan concentraciones superiores a las que estima confiablemente la curva estándar del estuche comercial. Estas concentraciones sugieren que existen problemas con el anticuerpo que contiene el estuche comercial, por lo tanto, antes de realizar pruebas con diluciones mayores por ejemplo, es necesario aclarar los problemas técnicos para la medición en heces de estradiol. Se considera conveniente realizar pruebas con hembras prepúberes y adultas con el fin de establecer los niveles basales de esta hormona. A pesar de esto, es bien sabido ya, que la concentración de metabolitos en heces, generalmente es de 2 a 4 órdenes de magnitud mayor que la de los esteroides sanguíneos; pero a pesar de esperar este incremento, las concentraciones obtenidas sobrepasan la capacidad de dicho estuche comercial.

En el estudio de Korndörfer et al (1998), donde evalúan la metodología más práctica para extracción de P4 en heces y comparando sus perfiles plasmáticos, encontraron concentraciones en excretas de esta hormona en rangos que van desde 48.5 a 146.3ng/ml. En las *Romerolagus*, el promedio de las concentraciones de P4, son de 106.1ng/ml para el grupo A y de 39.4 ng/ml para el grupo C.

La metodología para el procesamiento de muestras de heces, ha sido investigada ampliamente desde hace décadas. La mayoría de los anticuerpos disponibles comercialmente usados en inmunoensayos han sido desarrollados para cuantificar hormonas esteroides sanguíneas y son muy específicas para la forma circulante del esteroide. Consecuentemente, esto lo hace poco cuantificable para la forma del esteroide o de sus metabolitos en heces u orina (Graham 2004)

Se han discutido aspectos del efecto de material vegetal proveniente de la ingesta que puede interferir con los resultados en las concentraciones hormonales y de la imposibilidad de medir algunos esteroides en excretas de algunas especies como en ratones ya que su mayor eliminación ocurre a través de la orina; otro punto importante que se ha investigado, son las diferencias de escala en las concentraciones de esteroides en diferentes especies. La adopción directa de estas técnicas a estudios de animales en estado silvestre o en cautiverio, han encontrado algunos problemas en la medición de algunas de estas hormonas, la tasa de excreción de estas hormonas varía de acuerdo a la fisiología de cada especie (Valdespino et al 2007). Justo esta ruta fisiológica es la que permite determinar el funcionamiento gonadal y adrenal de un organismo por métodos no invasivos, obteniendo excretas de los organismos de interés y evaluando en ellas las concentraciones de esteroides metabolitos que permite el conocimiento de un organismo sin necesidad de capturarlo (Valdespino et al 2007). La comprensión de la biología reproductiva en especies silvestres es fundamental para su conservación. El estudio de las concentraciones de las hormonas sexuales nos permite entender patrones endocrinos asociados a eventos reproductivos, sin embargo debido a las diferencias entre especies, técnicas de monitoreo no invasivo, deben desarrollarse y validarse para cada especie por separado.

Para los resultados hormonales entre grupos (A y C), se observó una diferencia significativa para las concentraciones de Progesterona con una  $p < 0.0007$ . El promedio presente para el grupo A (donde se tomaron muestras vaginales y hubo por consecuencia manipulación cérvico-vaginal) fue de  $106.14 \pm 25.1$  ng/ml, mientras que para el grupo C (control, sin manipulación cérvico-vaginal), fue de  $39.41 \pm 12.8$  ng/ml. La diferencia entre los resultados pudieron deberse a la manipulación mecánica y cíclica en el grupo A, lo que hace pensar que, el estímulo provocado mecánicamente o naturalmente el producido en el apareamiento, provoca ovulación, desencadenando la producción de P4 post ovulación, siendo posiblemente ésta la razón de los incrementos sutiles del grupo C contra los del grupo A donde fueron mucho más marcados. La correlación realizada entre la celularidad vaginal y la concentración hormonal (P4) no es significativa; a pesar de esto, la correlación más fuerte se encuentra con las células

intermedias como era de esperarse (0.41), manifestando una influencia progestacional aunque se esperaría una correlación más marcada, esto puede reafirmar que, no es importante el reflejo hormonal en la celularidad del epitelio vaginal de las zacatuches que manifieste el momento ideal para el apareamiento.

La evaluación reproductiva de una especie en riesgo, genera un conocimiento acerca de su estatus endocrino; en este sentido, las poblaciones ex situ ofrecen oportunidades increíbles para lograr el entendimiento de la endocrinología de una especie y de su interrelación con el medio ambiente natural. Ahondando con este tipo de estudios, pueden detectarse las razones por las cuales las especies fallan al reproducirse (sin tomar en cuenta los riesgos ambientales del lugar donde habitan y que en el caso del zacatuche, es la causa principal de su riesgo a la extinción). En muchos casos, el punto culminante al éxito reproductivo de especies silvestres en cautiverio y que se encuentran en peligro de extinción, es sin lugar a dudas la reintroducción de individuos en su hábitat natural. Cualquiera que sea la técnica de laboratorio que nos acerque al conocimiento reproductivo de alguna especie, da como resultado el acercamiento al conocimiento de su fisiología reproductiva y en consecuencia la posibilidad de su manipulación en beneficio de un mayor éxito reproductivo. La citología vaginal, el monitoreo no invasivo y la evaluación de metabolitos hormonales fecales son herramientas invaluable para profundizar en el desarrollo de este tipo de conocimiento; este aporte de información, facilita la toma de decisiones acerca de eventos relacionados a la reproducción y que a final, repercutan en el éxito reproductivo de esta especie y en consecuencia de su conservación.

## **7. CONCLUSIONES**

- De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, al igual que en la coneja doméstica, no existen evidencias de que las hembras de zacatuche presenten un ciclo estral definido por fases (proestro, estro, diestro y anestro) como en otras especies como la perra o los felinos domésticos y silvestres.

- No hay manifestación de una dinámica celular periódica y definida (células vaginales superficiales, intermedias y parabasales).
- El cambio celular en las citologías realizadas pudo haber sido provocado mecánicamente debido al hisopado vaginal lo que en consecuencia pudo provocar la ovulación.
- Los bioestímulos en esta especie pueden jugar un papel importante en la reproducción y receptividad durante todo el año de la hembra del zacatuche.
- La citología vaginal es una herramienta diagnóstica práctica, económica e importante para detectar la influencia de esteroides sexuales (Progesterona y Estrógenos) pues suele existir una correlación positiva entre ellas, sin embargo, es complicado pensar en estudios longitudinales in situ en especies como el zacatuche.
- El estrés provocado por la corta sujeción al momento del muestreo pudo haber sido factor de disminución de la capacidad ovulatoria, sin embargo no hay diferencias significativas entre la dinámica celular manifiesta en el grupo A (4 citologías semanales) contra el grupo B (2 citologías semanales), además las hembras se encontraban menos estresadas al final del tiempo del muestreo, la mayoría incrementó su peso y no se registró ningún deceso.
- Las concentraciones de P4 manifiestan diferencia significativa entre el grupo A al cual se le tomó citología vaginal contra el grupo C (al que no) siendo de 106.1ng/ml y de 39.4 ng/ml respectivamente, se puede atribuir esta elevación a la manipulación cérvico-vaginal al momento de tomar la muestra citológica, pudiendo ser una evidencia de maduración folicular.
- El estuche comercial para RIA <sup>125</sup>I no fue eficiente para medir las concentraciones de estradiol en heces y es necesario aclarar los problemas técnicos para su medición en esta especie.
- La correlación hormonal con la celularidad vaginal no es significativa, teniendo una correlación positiva débil (0.4) de la P4 con las células intermedias lo que pudiera manifestar que existe cierta relación, aunque no de importancia entre la secreción hormonal de P4 y su reflejo manifestado en la celularidad vaginal.

- El uso en la investigación de individuos de especies silvestres mantenidas en cautiverio, es fundamental para el estudio de diversos aspectos en los que la metodología sería prácticamente imposible de realizar en poblaciones en vida libre.
- El monitoreo no invasivo y la citología vaginal, son herramientas invaluable para profundizar en el desarrollo de la fisiología reproductiva de las especies silvestres lo cual facilita la toma de decisiones acerca de eventos relacionados a la reproducción para que al final repercuta en el éxito reproductivo y en consecuencia en la conservación de la especies.

## **8. PERSPECTIVAS DE ESTUDIO**

Para futuras investigaciones, es recomendable tener dos grupos a los cuales se midan concentraciones hormonales en las excretas, con la diferencia de que uno sea sometido a la toma de muestra vaginal y al otro se aplique un tratamiento similar con el fin de que se provoque el mismo tipo de “estrés” con un hisopado no vaginal y comparar los resultados de estos grupos, con el fin de apreciar si las concentraciones hormonales manifiestan algún tipo de diferencia que tenga que ver con la inducción a la ovulación y con el efecto a un mismo tipo de estímulo estresante.

Otro factor a considerar en estudios futuros es indagar niveles basales de estradiol y progesterona utilizando hembras prepúberes y hembras adultas y comparar entonces las concentraciones entre los dos grupos.

Debido a que al parecer existió algún tipo de interferencia de alguna sustancia en las mediciones del Estradiol, para posteriores estudios, deben hacerse más ensayos para obtener resultados confiables en el zacatuche. Otros elementos presentes en los extractos, pudieron haber provocado alteración en los resultados (material vegetal, fitoestrógenos, etc.)

## 9. LITERATURA CITADA

Álvarez, L; Zarco, L.A. Los fenómenos de bioestimulación sexual en ovejas y cabras. Vet Mex 32 (2) 2001 Pp. 117-129

Alvariño, M. Control de la reproducción en el conejo. Ed. Mundi prensa. 1993

AMCELA. Taller Internacional para la Conservación de los Lagomorfos Mexicanos en Peligro de Extinción. Enero 1996. UAM Iztapalapa, México, D.F. UNAM, Wildlife Preservation Trust International, St Louis Zoo, CONABIO, SEMARNAP. Disponible en: [www.ibiologia.unam.mx/amcela/Lagomorfos.html](http://www.ibiologia.unam.mx/amcela/Lagomorfos.html) (Consultado: abril 2010)

Antunes, E; Nichi, M; Guimarães, M. Comparison of two commercial kits and two extraction methods for fecal glucocorticoid analysis in ocelots (*Leopardus pardalis*) submitted to ACTH challenge Pesq. Vet. Bras. 28(7):329-334, julho 2008

Arriaga, L. Deforestación y fragmentación de ecosistemas ¿Qué tan grave es el problema en México? Biodiversitas. Año 5 num 30, mayo 2000.

Barberini, F; Correr, S; De Santis, F; Motta, PM. The epithelium of the rabbit vagina: a micropographical study by light, transmission and scanning electron microscopy. Arch Histol Cytol. 1991 Oct;54(4):365-78. Abstract

Bibbo y Wied. Hormonal Cytology, en Bibbo Marluce. Comprehensive Cytopathology. W.B Saunders Company, 1991. Pp. 85-113

Bradley C.A; Altizer, S. Urbanization and ecology of wildlife diseases. Trands in ecology and evolution Vol 22 no. 2, nov 2006

Brown, J Endocrine Manual for Hormonal Assessment of Wildlife Species. Conservation And Research Center; National Zoological Park 1500 Remount road, front Royal, VA, 2008 CR Endocrine Research Laboratory.

Brown, J & Wildt, D Assessing reproductive status in wild felids by noninvasive faecal steroid monitoring. *Int. Zoo Yh.* (1997) 35: 173-191

Browning, J; Landis K P; Wolf R. Comparison of Serum Progesterone, 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone and Estradiol-17 $\beta$  in Pregnant and Pseudopregnant Rabbits: Evidence for Postimplantation Recognition of Pregnancy. *Biology of Reproduction* 23, 1014-1019 (1980).

Campos-Morales, R., Ramos-Magaña, R., Gual-Sill, F. y Sánchez-Medina, A. 2001. Determinación de parámetros morfológicos externos en el teporingo (*Romerolagus diazi*) en el Zoológico de Chapultepec. En: "3er Encuentro Nacional de UMAS, XVIII Simposio sobre fauna Silvestre "Gral. MV Manuel Cabrera Valtierra", XVII Congreso AZCARM", en Metepec, Estado de México, del 7 al 10 de noviembre de 2001.

Campos, 2009. Efecto de la Suplementación de *Saccharomyces cerevisiae* sobre el desarrollo, la digestibilidad y la salud del conejo zacatucho (*Romerolagus diazi*) en cautiverio. Tesis. Maestría en Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, 2009.

Ceballos, G. Especies Raras, El conocimiento de la diversidad biológica y la Conservación. *Biodiversitas* Año 6 num 38 septiembre 2001

Ceballos, G. Áreas prioritarias para la conservación de los mamíferos de México. *Biodiversitas Boletín bimestral de la Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad.* Año 5 núm 27, noviembre 1999

Ceballos, G. Áreas prioritarias para la conservación de los mamíferos de México. Biodiversitas, CONABIO Año 6, núm 38, sep 2001).

Ceballos, G. Especies Raras, El conocimiento de la diversidad biológica y la Conservación. Biodiversitas Año 6 Núm 38 Septiembre de 2001.

Cervantes, F; Lorenzo, C; Yates. T Genic Variation in Populations of Mexican Lagomorphs *Journal of Mammalogy*, Vol. 83, No. 4. (Nov., 2002), pp. 1077-1086.

Chilton, B; Gels, L Steroids Receptors in the Developing and the Adult Rabbit Endocervix and in Endocervical Epithelial Cells Isolated by Flow Cytometry *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* Vol. 37, No. 5, pp. 649-659, 1990

CITES página web (<http://www.cites.org/esp/app/appendices.shtml>). Apéndices I, II y III (Consultado: Abril 2011)

Conabio-Conanp-TNC-Pronatura-FCF, UAN L. 2007. *Análisis de vacíos y omisiones en conservación de la biodiversidad terrestre de México: espacios y especies*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, The Nature Conservancy-Programa México, Pronatura, A.C., Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

Dávila Montero, M. Citología vaginal del ciclo estral en la yegua y su relación con el ultrasonido 2002. Tesis

De Buen, N. Citología de mucosas. Vaginal. En: Citología Diagnóstica Veterinaria, Pp. 19-25. El Manual Moderno, 2001.

Del Río Avila Carolina. Uso de microsatélites para la genotipificación no invasiva a partir de muestras fecales del conejo zacatuche *Romerolagus diazi*. Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, FMVZ, UNAM: Tutores: Cervantes, F; Gual, F. 2007

DIGHE, K; HUNTER, W. A Solid-Phase Radioimmunoassay for Plasma Progesterone Biochem. J. (1974) 143, 219-231

Dirección General de Zoológicos de la Ciudad de México. Dirección de bioética, Investigación y Conservación. PICE, Programa Institucional de Conservación por Especie. Conejo de los Volcanes *Romerolagus diazi*. Gobierno del D.F. Secretaría de Medio Ambiente. 2006

Fa JE, Bell DJ. 1990. The volcano rabbit (*Romerolagus diazi*), In: J. A Chapman and J. E. C. Flux editors, 1990. Rabbits, hares, and pikas: status survey and conservation action plan. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources-The World Conservation Union and World Wide Fund for Nature, Gland, Switzerland, 162 p. Pp.143-146.

Fahrig Lenore. Effects of Habitat Fragmentation on Biodiversity. Annu. Rev. Ecol Syst, 2003, 34:487-515.

Feldman, E. Nelson, R. Ed. Endocrinología y Reproducción Canina y Felina. Ed. Intermédica 2007, Pp. 834-858, 1137-1151

González Urdiales, R. Bioestimulación en la coneja reproductora. ¿Alternativa a los tratamientos hormonales? Cunicultura, 2005 [www.avicultura.com/docscu/CU2005Feb7-17.pdf](http://www.avicultura.com/docscu/CU2005Feb7-17.pdf) Consultado en: agosto de 2009

Graham, L. Non Invasive Monitoring of Reproduction in Zoo and Wildlife Species. Annual Review of Biomedical Sciences 2004;6:91-8)

Hamer, A; McDonnell, M. Amphibian Ecology and Conservation in the Urbanising World: A review. *Biological Conservation* 141 (2008) 2432-2449

Herrera, M.R; Luna, M; Romero, C. Obtención de anticuerpos contra progesterona y estradiol, estandarización del radioinmunoanálisis y validación de suero en rumiantes. *Vet Mex* 24 (3) 1993

Hoffman K.L., González-Mariscal G. Relevance of ovarian signaling for the early behavioral transition from estrus to pregnancy in the female rabbit *Hormones and Behavior* 52 (2007) 531–539

Hoth, J; Velázquez, A; Romero, F; León, L; Aranda, M; Bell, D. The volcano rabbit, a shrinking distribution and a threatened habitat. *Oryx*, vol 21 No.2. Pp 85-91. April 1987

Hubscher, CH; Brooks, DL; Johnson JR. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic & Histochemistry* 2005, 80 (2): 79-87

INE. 2001. NOM 059 ecol 01. En:

<http://www.semarnat.gob.mx/leyesynormas/normas/Normas%20Oficiales%20Mexicanas%20Vigentes/NOM%20059%20SEMARNAT%202010%20PROTECCIÓN%20AMBIENT%20AL%20ESPECIES%20NATIVAS%20DE%20MÉXICO%20DOF%2030%20DIC%202010.pdf>

(consultado en febrero de 20011)

INEGI, marco Geoestadístico 2005. disponible en:

<http://cuentame.inegi.gob.mx/impresion/poblacion/densidad.asp> (consultado en junio 2009)

[IUCN] International Union for Conservation of Nature. 1969, 1996, 2008. Volcano rabbit. Sheet 9.59.3.1. In Red Data Book, Vol I. Mammalian, Gland, Switzerland. ([www.iucn.org](http://www.iucn.org)).

Jimenez, K F; Padilla, F.J., Díaz, V. Producción de un antisuero específico contra 17  $\beta$  estradiol en conejo. *Técnica Pecuaria en México*, (ene-abril 1989) vol 27 (1) P 1-6

Keay, J; Singh, J; Gaunt, M; Kaur, T; Fecal Glucocorticoids and their Metabolites as indicators of stress in various Mammalian Species: A Literature Review. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 37(3): 234–244, 2006.

Korndörfer, c; Meirelles, c; Bueno, i; Abdalla, a. Evaluation of extraction methods for progesterone Determination in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) Feces by radioimmunoassay *braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São paulo, v. 35, n. 3, p. 115-119, 1998.*

Larrodera, L; Hawkins, F. Inmunoanálisis, RIA, IRMA técnicas alternativas, bioensayo. De: *Endocrinología Clínica*, Casanueva, F y Vázquez, J editores. Editorial Díaz de Santos. Pp. 23-26. 1995

Li PS. Effect of cortisol on testosterone production by immature pig Leydig cells. *J. Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 38: 205 – 212.

Leyva, H; Munro, C. Comparación del uso de RIA y ELISA en la determinación de progesterona en cabras durante el ciclo estral. *Revista Científica, FCV-LUZ/Vol VIII, No. 1, 63-67, 1998*

Matsuzaki, T; Kamiya, M; Suzuki, H; Nomura, T; Velázquez, A. Reproducción en el laboratorio del conejo zacatuche, de *Ecología y Conservación de Conejo Zacatuche y su Hábitat*. Velázquez, A; Romero, F; López P, J. compiladores. Ediciones científicas universitarias, Texto científico Universitario. UNAM, FCE, México 1996. Pp 51-66

Mayo, P; Guimaraes, D; López-Béjar, M. Metodología diagnóstica de gestación en el pécarí de collar: ecografía transabdominal, palpación abdominal y perfiles hormonales de estradiol y progesterona. Memorias del VI Congreso Internacional sobre Manejo de Fauna Silvestre en la Amazonia y Latinoamérica  
5 – 10 Septiembre 2004, Iquitos – Perú

Mayo, P; Gálvez,H; Guimarães,D; López-Béjar, M Características del estro de la hembra de pécarí de (Tayassu tajacu) del este amazónico. Memorias del VI Congreso Internacional sobre Manejo de Fauna Silvestre en la Amazonia y Latinoamérica  
5 – 10 Septiembre 2004, Iquitos – Perú

Mc Donald, L. E. Endocrinología Veterinaria y Reproducción. Patrones de Reproducción.4ª. ed, Interamericana McGraw Hill. 1991.

McKinney, M. Urbanization as a major cause of biotic homogen. Biological conservation 127 (2006) 247-260

Meredith, A. Manual of Rabbit Medicine and Surgery, 2<sup>nd</sup> ed. Meredith, A and Flecknell, P, editors. (BSAVA), British Small Animal Veterinary Association. 2006

Millsbaugh J., Washburn,B. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation General and Comparative Endocrinology 138 (2004) 189–199 Minireview

Montes-Pérez, R. Las técnicas de unión para medir hormonas. Rev Biomed 1995; 6:33-46.

Montes- Pérez, R; Murcia, C; Salas, A; Zarco, L. Establecimiento de un enzimoimmunoanálisis para la determinación de concentraciones de Progesterona. Veterinaria México, Vol 27, Núm. 1, 1996.

Montes- Pérez, R; Pech-Martínez, V. Estimación del costo de producción de dos técnicas de radioinmunoanálisis en fase líquida para medir progesterona en plasma sanguíneo. Comunicación breve. Rev Biomed 1998; 9:103-107

Moreira, N. Reprodução e estresse em felídeos silvestres. Rev Bras Reprod anim, Belo Horizonte, v. 31, n.3. p.333-338, jul/set, 2007.

Morato R.; Bueno M.; Malmheister P.; Verreschi I.; Barnabe R. Changes in the fecal concentrations of cortisol and androgen metabolites in captive male jaguars (*Panthera onca*) in response to stress Short Communication Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2004) 37: 1903-1907

Morales, M. Comparación del Método de Citología vaginal exfoliativa y biopsia vaginal para la determinación de las etapas del ciclo estral en cerdas de reemplazo. 2006. Tesis

Moreira, N; Brown, J. Moraes, W.; Swanson, W; Monteiro-Filho, E. RESEARCH ARTICLE Effect of Housing and Environmental Enrichment on Adrenocortical Activity, Behavior and Reproductive Cyclicity in the Female Tigrina (*Leopardus tigrinus*) and Margay (*Leopardus wiedii*) Zoo Biology 26:441–460 (2007)

Möstl, E; Palme, R. Hormones as indicators of stress Domestic Animal Endocrinology 23 (2002) 67–74.

Oh, S-J; Hong, SK; Kim, SW; Paick, J-S. Histological and functional aspects of different regions of the rabbit vagina. *International Journal of Impotence Research* (2003) 15, 142-150

Ola, S, Oyegbade, M. Influence of Different Contact Levels UIT Male on the Vaginal Cytology in Rabbits Under the Tropical Humid Condition 9th World Rabbit Congress- June 10-13, 2008, Verona, Italia 2008

Park, K ;Ahn, K ;Lee, S; Ryu, S; Park, Y and Azadzoj, KM. Decreased circulating levels of estrogen alter vaginal and clitoral blood flow and structure in the rabbit. *International Journal of Impotence Research* (2001) 13, 116±124

Putranto H.D., Kusuda S., Mori Y., Inagaki K., Doi O.. Assessment of ovarian cycle by fecal progesterone and estradiol-17  $\beta$  in exotic cat. *Proceedings of AZWMP 2006 Chulalongkorn Uni. Fac. of Vet. Sc., Bangkok, Thailand, 26-29 Oct 2006*

Rangel- Negrin, A; Alfaro, J; Valdez, R; Romano, M; Serio-Silva, J. Stress in Yucatan spider monkeys: effects of environmental conditions on fecal cortisol levels in wild and captive populations. *Animal Conservation* **12** (2009) 496–502 \_c 2009

Rebollar P.G., Milanés A., Pereda N., Millán P., Cano P, Esquifino A.I; Villarroel M., Silván G., Lorenzo P.L. Oestrus synchronisation of rabbit does at early post-partum by doe–litter separation or ECG injection: Reproductive parameters and endocrine profiles *Animal Reproduction Science* 93 (2006) 218–230

Rodríguez, H, C. Determinación del ciclo estral en borregas cimarrón mediante observaciones conductuales y determinación de progesterona en heces, 2007. Tesis de Licenciatura, FMVZ, UNAM.

Romero F, Cervantes F. Conejo Zacatuche. En: Ceballos G, Oliva G, coordinadores. Los Mamíferos Silvestres de México. D.F. CONABIO, Fondo de Cultura Económica; 2005: 832-837

Romero, F.J. y Velázquez, A.: El conejo zacatuche tan lejos de Dios y tan cerca de la Ciudad de México, 1ª ed. México: Instituto Nacional de Ecología-Consejo Nacional de la Fauna, Ed. Desarrollo Gráfico, 1994.

Rosell, J.M Coord. Enfermedades del Conejo, Tomo I. Generalidades. Ediciones Mundi Prensa, España, 2000.

Sánchez V. Deforestation and Extant distribution of mexican endangered mammals. Biological conservation 126 2005, 465-473)

Surve, A; Bacso, I; Brinckerhoff, J; Kirsch, Sh. Plasma levels of Progesterona in Pseudopregnant Rabbits Actively Immunized with a Progesterone-Protein Conjugate. Biology of Reproduction 15, 343-349. 1976

Swanson, W; Johnson, W; Cambre, C; Citino, S; Quigley, K; Brousset, D; Morais, R; Moreira, N; O'Brien, S; Wildt, D. Reproductive Status of Endemic Felid Species in Latin American Zoos and Implications for Ex Situ Conservation Zoo Biology 22:421–441 (2003)

Touma C; Palm, R. Measuring Fecal Glucocorticoid Metabolites in Mammals and Birds: The Importance of Validation Ann. N.Y. Acad. Sci. 1046: 54–74 (2005).

Tsiligianni, Th; Saratsi, A; Besenfelder, U; Anastasiadis, A; Vainas, E. Saratsis, PH; Brem, G. The use of cytological examination of vaginal smears (CEVS) in the selection of rabbits for superovulation. Theriogenology 61 (2004) 989-995.

Ugaz, C. Efecto de la Suplementación Nutricional Sobre la Calidad Seminal de Ocelotes *Leopardos pardales* en cautiverio. Tesis de Maestría en Ciencias de la Prod y de la Salud Animal, FMVZ, UNAM

Valdespino, C; Martínez-Mota, R.García-Reria, L; Martínez-Romero, L. Evaluación de eventos reproductivos y estrés fisiológico en vertebrados silvestres a partir de sus excretas: Evaluación de una metodología no invasiva  
*Acta zoológica mexicana (n.s.)* 23(3): 151-180 (2007)

Van der Loo W, De Poorter M. 1981. Report on the breeding and behaviour of the volcano rabbit at Antwerp Zoo. En: Myers K, Macinnes K. (comps). C.D. World Lagomorph Conference. Universidad de Guelph, Guelph, Ontario, 983 p.

Velázquez, A. Capítulo X. Síntesis de estudios sobre el zacatuche y su hábitat, disponible en:

<http://www.ciga.unam.mx/investigadores/zacatuche/PDF/613Capitulos%20en%20Libros/6131Nacionales/6131-7.pdf> (consultado en: noviembre 2008)

Villa C B. Diagnóstico temprano de la gestación en bovinos por medio de la cuantificación de progesterona en suero por radioinmunoanálisis y sus aplicaciones en vacas repetidoras. 1977 Tesis de Maestría. FMVZ UNAM.

Wasser, S; Hunt, K; Brown, J; Cooper, K; Crockett, C; Bechert, U; Millspaugh, J; Larson, S; Montfort, S. A Generalized Fecal Glucocorticoid Assay for Use in a Diverse Array of Nondomestic Mammalian and Avian Species. *General and Comparative Endocrinology* 120, 260–275 (2000)

doi:10.1006/gcen.2000.7557, available online at <http://www.idealibrary.com>

Welch TH, Kemper-Green CN, Livingston KN. Stress and reproduction. In:

Knobill E, Neill JD, editors. Encyclopaedia of Reproduction. Academic Press, San Diego 1999; 662 – 674.

Wildt, D; Pukazhenthil, B; Brown, J; Monfort, S; Howard, J; Roth, T: Spermatology for understanding, managing and conserving rare species *Reproduction, Fertility and Development* 7(4) 811 - 824 1995

Young K; Walker S; Lanthier, W; Waddell, W; Monfort, S. Brown, J , Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses *General and Comparative Endocrinology* 137 (2004) 148–165

Ypsilantis P., Tsiligianni Th., Karagiannidis A. 1996. The use of cytological examination of vaginal smears for the determination of domestic rabbit's oestrus cycle. *Bull. Hellenic Vet. Med. Soc.*, 47, 186–190.

Young , K.M; Brown, J.L; Goodrowe, K.L Characterization of reproductive cycles and adrenal activity in the black-footed ferret (*Mustela nigripes*) by fecal hormone analysis *zoo biology* Volume 20 Issue 6, Pages 517 – 536, 2002. Abstract.

Zambrano, F; Díaz, V, editores. El radioinmunoanálisis y su control de calidad Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, Organismo Internacional de Energía Atómica. México, 1996

## 10. ANEXOS

**Cuadro 1.** Medidas morfométricas de las hembras de zacatuche *Romerolagus diazi*

ZACATUCHES												
MEDIDAS mm												
Zacatuche #	AVID #	Ancho cabeza	Largo cabeza	Altura cabeza	Oreja izquierda	Longitud corporal	Cola	Pata izq	Mano izq	Peso g (1)	Peso g (2)	Peso g (3)
<b>grupo A</b>												
1	016*353*292	29	62	29	40	322	4	44	22	698	692	746
2	015*260*374	29	66	39	32 (mutilada)	354	5	43	19	783	772	796
3	021*089*778	30	62	31	35 (mutilada)	360	9	43	13	836	748	718
4	068*062*102	29	61	28	35 (mutilada)	348	15	47	14	824*	676	724
5	016*870*036	27	64	33	33 (mutilada)	370	11	46	15	654	586	662
<b>grupo B</b>												
6	017*536*378	29	68	36	36 (mutilada)	380	7	45	15	754	638	688
7	017*837*364	30	67	36	42	390	9	52	9	818	810	932
8	021*551*023	30	60	30	34	340	6	45	14	920	860	942
9	021*790*118	29	61	34	33 (mutilada)	345	8	38	10	768	656	704
10	017*600*031	28	59	35	36 (mutilada)	348	6	42	9	630	598	622
<b>grupo C</b>												
11	021*524*061	27	58	34	29 (mutilada)	332	5	38	13	604	584	600
12	016*314*045	27	60	35	37 (mutilada)	310	11	39	14	582	586	618
13	021*783*817	30	68	39	41 (mutilada)	376	8	47	14	744	752	792
14	021*287*370	28	68	38	36 (mutilada)	360	20	50	9	802	798	852
15	014*532*081	29	65	30	38 (mutilada)	350	7	54	20	584	744	800

(1) peso al inicio del muestreo, (2) peso a la mitad del muestreo, (3) peso al final del muestreo

Medidas morfométricas de las hembras de zacatuche utilizadas en esta investigación. AVID # indica el número de identificación de sus microchips.

**Cuadro 2.** Calendario mensual para el primer mes de muestreo citológico y de heces

JUNIO 2009															
DÍAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
GRUPO A		H	H	H	H	H			H	H	H	H	H		
		CX	CX			CX			CX	CX		CX	CX		
GRUPO B		H	H	H	H	H			H	H	H	H	H		
		CX				CX			CX			CX			
GRUPO C		H	H	H	H	H			H	H	H	H	H		
DÍAS	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
GRUPO A		H	H	H	H	H			H	H	H	H	H		
		CX	CX			CX			CX	CX		CX	CX		
GRUPO B		H	H	H	H	H			H	H	H	H	H		
		CX				CX			CX			CX			
GRUPO C		H	H	H	H	H			H	H	H	H	H		

H: Recolección de heces. CX: Toma de citología vaginal

**Cuadro 3.** Conteos celulares vaginales. Grupo A. PB=células parabasales, I= células intermedias, S=células superficiales, PMN= polimorfonucleares. Sección a: (días 1 a 30).

		día																								
HEMBRA		1	2	4	5	6	7	9	10	11	12	14	15	16	17	19	20	21	22	24	25	26	27	29	30	
hembra 1	PB	0	8	0	4	0	0	0	2.12	1.07	2.5	1	8	2.2	0	0	0	0	0	0	1	0	4.3	0	0	
	I	98	89	35	9	4.2	1	8.6	73.4	66.6	74	17.5	71	47.7	64	45.4	47	67.3	28	62	58	50	52.1	45.8	44	
	S	2	3	65	87	95.7	98.9	91.3	24.4	32.2	23	81.4	21	50	35.9	54.5	53	32.6	72	38	41	50	43.4	54.1	56	
	PMN	0	0	0	67	5	4	42	6	7	22	3	0	12	11	12	0	5	0	0	0	0	54	4	0	
HEMBRA		1	2	4	5	6	7	9	10	11	12	14	15	16	17	19	20	21	22	24	25	26	27	29	30	
hembra 2	PB	38	41.3	18.4	0	0	11.1	0	0	0	8.4	8.8	0	9.7	17.2	7	12.5	0	0	6	5.8	0	0	0	0	
	I	62	52.8	57.6	40.4	55.9	47.6	51.1	58.8	45.4	47.4	33.8	73.3	51.2	46.55	72	14.5	6.06	20.6	63.6	86	13.3	75.2	20.7	24.6	
	S	0	5.7	23.9	59.5	44	41.2	48.8	41.1	54.5	44	57.3	26.6	39	36.2	21	72.9	93.9	79.3	30.3	8.1	86.6	24.7	79.2	75.3	
	PMN	0	13	8	58	41	37	14	32	12	41	32	55	59	42	0	52	1	13	34	14	10	15	18	19	
HEMBRA		1	2	4	5	6	7	9	10	11	12	14	15	16	17	19	20	21	22	24	25	26	27	29	30	
hembra 3	PB	56	0	8	0	7.3	0	0	0	0	30	0	5.6	42	0	18	0	0	0	0	1	0	0	64	0	
	I	19	96.3	35	54.6	43.9	24.6	22.6	54.9	61.29	46	55.7	55.6	44	33.6	75	8.4	93.6	18.8	2	14.7	22	73.9	29	14	
	S	25	3.6	57	45.3	48.7	75.3	77.3	45	38.7	24	44.2	38.6	14	66.3	7	91.5	6.3	81.1	97.9	84.2	78	26	7	86	
	PMN	0	17	0	14	18	23	25	9	7	0	5	12	0	2	0	5	6	15	1	5	0	4	0	0	
HEMBRA		1	2	4	5	6	7	9	10	11	12	14	15	16	17	19	20	21	22	24	25	26	27	29	30	
hembra 4	PB	0	45	58.9	0	0	0	6	12.6	2	0	0	0	25	8	1	8	0	22	0	26.8	0	0	0	0	
	I	11.1	33	25.2	29.3	11.7	11.7	45	31.5	30	22	40	38.1	20	76	44	30	87	72	20.2	51.6	49	7	9	8.2	
	S	88.8	22	15.7	70.6	88.2	88.2	49	55.7	68	78	60	61.8	55	16	54.8	62	13	6	79.7	21.5	51	93	91	91.7	
	PMN	19	0	5	8	6	15	0	5	0	0	15	3	0	0	7	0	0	0	11	7	0	0	0	3	
HEMBRA		1	2	4	5	6	7	9	10	11	12	14	15	16	17	19	20	21	22	24	25	26	27	29	30	
hembra 5	PB	22	35	95	6.3	0	8.7	10.5	0	40.2	25.6	30	40.2	72	0	37	4.6	0		9.5	0	0	8.3	40	0	
	I	68	48	4	24	21.4	42.8	67	28	51.9	35.8	53	20.6	18	83.3	56.1	83.7	48.8		71.2	100	36.4	70.2	52.2	47.4	
	S	10	17	1	69.6	78.5	48.3	22.3	71.9	7.7	38.4	17	39.1	10	16.6	6.7	11.6	39.7		19.1	0	63.5	21.4	7.7	52.56	
	PMN	0	0	0	21	16	9	15	43	23	22	0	8	0	10	11	14	12		27	53	15	16	10	22	

**Cuadro 3. Sección b: días 31 a 60.**

HEMBRA		31	32	34	35	36	37	39	40	41	42	44	45	46	47	49	50	51	52	54	55	56	57	59	60	
hembra 1	PB	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1.1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	I	67	60.9	26	60	16	52.7	56.8	16.9	85.1	35.8	22	83	52.2	27.8	14.43	30	44.4	41.2	56.5	42	60	60	55	49	
	S	32	39	73	40	84	47.27	43.1	83	14.8	64.13	78	15	46.6	72.5	85.5	70	55.5	58.7	42.4	58	40	40	45	51	
	color vulv																									
	PMN	0	13	0	0	0	45	5	29	6	8	0	0	10	21	3	10	10	20	1	0	0	0	0	0	0
HEMBRA		31	32	34	35	36	37	39	40	41	42	44	45	46	47	49	50	51	52	54	55	56	57	59	60	
hembra 2	PB	0	0	2.3	0	0	5.3	0	0	29.7	21.97	4.2	0	1.1	23.4	0	0	9.19	0	0	0	0	0	0	0	
	I	21.6	32.9	58.8	33.7	56.8	53.1	29.8	18.6	43.6	74.7	84.2	68.9	25.8	48.9	77	57.7	86.2	38.4	30.5	20.2	43.8	27.5	96.8	73.1	
	S	78.3	67	38.8	66.2	43.1	41.4	70.1	81.3	26.59	3.29	11.5	31	73	27.6	23	42.2	4.5	61.5	68.4	79.7	56.1	72.4	3.1	26.8	
	color vulv																									
	PMN	17	6	15	14	12	6	3	9	6	9	5	13	11	6	0	3	13	87	41	16	11	71	37	33	
HEMBRA		31	32	34	35	36	37	39	40	41	42	44	45	46	47	49	50	51	52	54	55	56	57	59	60	
hembra 3	PB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	45	4.8	46	18	0	0	0	0	0	5.2	0	0	0	
	I	21	11.1	0	10	18.4	33	65	40.8	63	40	27	40	21.9	17	25	25	83	42.7	72.7	51	86.4	41.4	38.2	40.2	
	S	79	88.8	100	90	81.5	67	35	63	37	60	73	15	73.1	37	57	75	17	57.2	27.2	49	8.3	58.5	61.7	59.7	
	color vulv																									
	PMN	0	10	0	0	8	0	0	2	0	0	0	0	18	0	0	0	0	4	1	0	4	1	11	18	
HEMBRA		31	32	34	35	36	37	39	40	41	42	44	45	46	47	49	50	51	52	54	55	56	57	59	60	
hembra 4	PB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	44.2	4.3	0	38.1	8.7	8	16.8	6.8	0	0	0	0	
	I	65	30.6	46.3	21	48	17.8	61	19	35	44	29.1	7.5	27.3	32.2	70.5	48.4	54.9	80	40.4	16.4	63	39	8.6	26.1	
	S	35	69.3	53.6	78.8	52	82.1	39	81	65	56	70.8	92.4	28.4	63.4	29.4	13.4	36.2	12	42.6	76.7	36.9	61	91.3	73.8	
	color vulv																									
	PMN	0	12	3	5	0	5	0	0	0	0	4	7	5	7	5	3	9	0	11	27	16	0	8	16	
HEMBRA		31	32	34	35	36	37	39	40	41	42	44	45	46	47	49	50	51	52	54	55	56	57	59	60	
hembra 5	PB	5	3.8	21.5	0	0	61.5	0	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	I	74	23.3	21.5	22.9	23.1	34	20.9	40	27.3	53	12	56	31.2	25.8	17.2	2.2	17.1	46.2	48.8	32.7	18.3	24.7	75	48	
	S	21	72.7	56.9	77	76.8	4.3	79	32	72.6	46.9	87.9	46.1	68.7	74.1	82.7	97.7	82.8	53.7	51.1	67.2	81.6	75.2	24.7	52	
	color vulv																									
	PMN	0	23	21	52	18	9	19	0	16	51	42	18	4	38	19	56	36	20	16	42	13	7	11	75	

**Cuadro 4.** Conteos celulares vaginales. Grupo B, porcentajes de los conteos celulares vaginales, grupo B. PB=células parabasales, I= células intermedias, S=células superficiales, PMN= polimorfonucleares.

		días																							
HEMBRA		1	4	6	9	11	14	16	19	21	24	26	29	31	34	36	39	41	44	46	49	51	54	56	59
hembra 6	PB	20.2	23.8	39	0	3.5	0	35	0	19.7	17	0	0	7.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	I	15.1	59.7	20.9	35.5	70.2	16.6	47	18	50	5.6	10.1	0	26.9	5.6	38	32.9	15.6	0	2	2	34.4	13.6	46	18.9
	S	64.5	16.4	39.5	64.4	26.1	83.3	18	82	30.2	77.2	89.8	0	65.3	94.3	61.9	67	84.3	100	98	98	65.5	86.3	54	81
	PMN	21	33	19	55	16	10	0	0	14	12	41	15	48	11	37	9	4	4	0	0	7	12	0	5
HEMBRA		1	4	6	9	11	14	16	19	21	24	26	29	31	34	36	39	41	44	46	49	51	54	56	59
hembra 7	PB	60.4	16.4	25.5	45	2	38	33	35.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	18	8.4	0	0
	I	31.3	24.7	61.7	46	46	80	56	38.6	36.5	14	44.3	0	12.6	27.2	19.3	25.6	0	0	23	14.5	45	43.1	51	62
	S	8.1	58.7	12.7	9	52	20	11	26.1	63.4	86	55.6	100	87.3	72.7	80.6	74.3	100	100	63	85.4	37	48.4	48.9	38
	PMN	14	3	6	0	0	0	0	12	18	0	12	29	5	12	7	18	22	0	0	4	0	5	6	0
HEMBRA		1	4	6	9	11	14	16	19	21	24	26	29	31	34	36	39	41	44	46	49	51	54	56	59
hembra 8	PB	19	74	56.7	31.8	60.8	54.6	79.3	22	0	24.7	0	11.5	25	14.1	9.1	14.1	26.7	0	0	0	0	0	0	0
	I	65	16	36	46.3	31.9	41.3	14.13	19.1	32.9	44	44.2	46.3	47	22.8	32.1	16.6	30.2	66	13	17.7	16.2	0	27.1	
	S	16	10	7.2	21.7	7.2	4	6.5	58.8	67	31.1	55.7	42	28	63	58.6	69.2	43	34	86.6	82.2	83.8	100	72.8	
	PMN	0	50	3	31	3	25	8	32	21	7	39	31	0	8	13	22	14	0	10	21	7	7	8	
HEMBRA		1	4	6	9	11	14	16	19	21	24	26	29	31	34	36	39	41	44	46	49	51	54	56	59
hembra 9	PB	24	18		45.8	6.4	0	10.7	0	41.8	13	0	0	25.2	16	20	0	0	0	0	0			0	11
	I	73	51.3		47	51.6	48.3	61.2	47.2	8.1	47	51.8	25.3	56.8	34.6	74	57.3	38.2	47.47	29.2	68.3			32.6	47.5
	S	3	30.5		7	41.9	51.6	27.9	52.8	50	40	48.1	74.6	17.9	49.3	6	42.6	61.7	52.52	69.6	31.7	0	0	67.4	41.5
	PMN	0	28		15	7	38	7	11	14	0	17	29	5	25	0	25	6	1	11	18			5	18
HEMBRA		1	4	6	9	11	14	16	19	21	24	26	29	31	34	36	39	41	44	46	49	51	54	56	59
hembra 10	PB	9	27	0	6	12.9	46	39.4	14	0	0	0	0	0	17	0	10	21	0	0	8	7	0	0	0
	I	87	48.2	33.7	76	51.6	37	51	18	37	41	61.6	52	39	40	71	79	76	58	74	29	53	45	50	46
	S	4	24.8	66.3	18	35.5	17	9.6	68	63	59	38.4	48	61	43	29	11	3	42	26	63	40	55	50	54
	PMN	0	15	11	0	7	0	6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Cuadro 5. Grupo A.** La mayoría de **células superficiales** (influencia estrogénica, a partir del 50% en el conteo celular). Obsérvese los “movimientos” en los incrementos de células superficiales de manera consecutiva desde el día 1 hasta el día 60 del muestreo en cada hembra. Compárense la mayoría de la celularidad superficial (influencia estrogénica) entre hembras, no se observa sincronidad entre ellas. Para fines de esta descripción y obtener mayor evidencia, se eliminaron todos los conteos de células superficiales menores a 50%.

	1	2	4	5	6	7	9	10	11	12	14	15	16	17	19	20	21	22	24	25	26	27	29	30	31	32	34	35	36	37	39	40	41	42	44	45	46	47	49	50	51	52	54	55	56	57	59	60	
<b>h1</b>			65	87	96	99	91			81		50			55	53		72		50		54	56			73	84			83		64	78		47	73	86	70	56	59		58							
<b>h2</b>				60					55	57						73	94	79		87		79	75	78	67		66			70	81					73	28		42		62	69	80	56	72				
<b>h3</b>			57			75	77								66		92		81	98	84	78			86	79	89	100	90	82	67		63		60	73		73		57	75		57			59	62	60	
<b>h4</b>	89			71	88	88		56	68	78	60	62	55		55	62			80		51	93	91	92		69	54	79	52	82		81	65	56	71	92		63					77		61	91	74		
<b>h5</b>				70	79			72														64			53		73	57	77	77		79		73		88		69	74	83	98	83	54	51	67	82	75	52	

**Cuadro 6 Grupo B.** La mayoría de **células superficiales** (influencia estrogénica, a partir del 50% en el conteo celular). Obsérvese los “movimientos” en los incrementos de células superficiales de manera consecutiva desde el día 1 hasta el día 60 del muestreo en cada hembra. Compárense la mayoría de la celularidad superficial (influencia estrogénica) entre hembras, no se observa sincronidad entre ellas. Para fines de esta descripción y obtener mayor evidencia, se eliminaron todos los conteos de células superficiales menores a 50%.

	1	4	6	9	11	14	16	19	21	24	26	29	31	34	36	39	41	44	46	49	51	54	56	59	
<b>h6</b>	65				64		83		82		77	90		65	94	62	67	84	100	98	98	66	86	54	81
<b>h7</b>		59			52				63	86	56	100	87	73	81	74	100	100	63	85					
<b>h8</b>								59	67		56			63	59	69			87	82	84	100		73	
<b>h9</b>					52		53	50				75					62	53	70					67	
<b>h10</b>			66					68	63	59			61							63		55	50	54	

**Cuadro 7** Grupo A, días 41 al 60. Los espacios marcados con color y nombre: blanco , rosa , rojo  y púrpura  corresponden a la coloración de la mucosa vulvar. Observaciones del último tercio del muestreo.

		día																	
HEMBRA		40	41	42	44	45	46	47	49	50	51	52	54	55	56	57	59	60	
hembra 1	PB	0	0	0	0	2	1.1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
	I	16.9	85.1	35.8	22	83	52.2	27.8	14.43	30	44.4	41.2	56.5	42	60	60	55	49	
	S	83	14.8	64.13	78	15	46.6	72.5	85.5	70	55.5	58.7	42.4	58	40	40	45	51	
	color vulv		blanco	blanco	blanco	blanco	rosa	rosa	rosa		rojo	rojo	rosa	rosa	rojo	rojo	blanco	blanco	
	PMN	29	6	8	0	0	10	21	3	10	10	20	1	0	0	0	0	0	
HEMBRA		40	41	42	44	45	46	47	49	50	51	52	54	55	56	57	59	60	
hembra 2	PB	0	29.7	21.97	4.2	0	1.1	23.4	0	0	9.19	0	0	0	0	0	0	0	
	I	18.6	43.6	74.7	84.2	68.9	25.8	48.9	77	57.7	86.2	38.4	30.5	20.2	43.8	27.5	96.8	73.1	
	S	81.3	26.59	3.29	11.5	31	73	27.6	23	42.2	4.5	61.5	69.4	79.7	56.1	72.4	3.1	26.8	
	color vulv		rojo	púrpura	blanco	blanco	rosa	rosa	rojo		rojo	rosa	rosa	rosa	rosa	rojo	rojo	rosa	
	PMN	9	6	9	5	13	11	6	0	3	13	87	41	16	11	71	37	33	
HEMBRA		40	41	42	44	45	46	47	49	50	51	52	54	55	56	57	59	60	
hembra 3	PB	0	0	0	0	45	4.8	46	18	0	0	0	0	0	5.2	0	0	0	
	I	40.8	63	40	27	40	21.9	17	25	25	83	42.7	72.7	51	86.4	41.4	38.2	40.2	
	S	63	37	60	73	15	73.1	37	57	75	17	57.2	27.2	49	8.3	58.5	61.7	59.7	
	color vulv		blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	blanco	rosa		rosa	rojo	blanco	rosa	rosa	blanco	rojo	rosa	
	PMN	2	0	0	0	0	18	0	0	0	0	0	4	1	0	4	1	11	
HEMBRA		40	41	42	44	45	46	47	49	50	51	52	54	55	56	57	59	60	
hembra 4	PB	0	0	0	0	0	44.2	4.3	0	38.1	8.7	8	16.8	6.8	0	0	0	0	
	I	19	35	44	29.1	7.5	27.3	32.2	70.5	48.4	54.9	80	40.4	16.4	63	39	8.6	26.1	
	S	81	65	56	70.8	92.4	28.4	63.4	29.4	13.4	36.2	12	42.6	76.7	36.9	61	91.3	73.8	
	color vulv		blanco	blanco	blanco	blanco	rosa	blanco	rojo		rosa	rosa	rojo	rosa	rojo	rojo	rojo	rosa	
	PMN	0	0	0	4	7	5	7	5	3	9	0	11	27	16	0	8	16	
HEMBRA		40	41	42	44	45	46	47	49	50	51	52	54	55	56	57	59	60	
hembra 5	PB	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	I	40	27.3	53	12	56	31.2	25.8	17.2	2.2	17.1	46.2	48.8	32.7	18.3	24.7	75	48	
	S	32	72.6	46.9	87.9	46.1	68.7	74.1	82.7	97.7	82.8	53.7	51.1	67.2	81.6	75.2	24.7	52	
	color vulv		rosa	púrpura	rosa	roja	rosa	rosa	rojo		rosa	rojo	rosa	rojo	rojo	rojo	rojo	rosa	
	PMN	0	16	51	42	18	4	38	19	56	36	20	16	42	13	7	11	75	

**Cuadro 8.** Grupo B, días 41-60. Los espacios marcados con color: blanco  rosa  rojo  purpura  y corresponden a la coloración de la mucosa vulvar, observaciones del último tercio del muestreo.

<b>HEMBRA</b>		<b>41</b>	<b>44</b>	<b>46</b>	<b>49</b>	<b>51</b>	<b>54</b>	<b>56</b>	<b>59</b>
hembra 6	PB	0	0	0	0	0	0	0	0
	I	15.6	0	2	2	34.4	13.6	46	18.9
	S	84.3	100	98	98	65.5	86.3	54	81
	color vulv	blanco	blanco	rosa	rosa	rosa	rosa	blanco	blanco
	PMN	4	4	0	0	7	12	0	5
<b>HEMBRA</b>		<b>41</b>	<b>44</b>	<b>46</b>	<b>49</b>	<b>51</b>	<b>54</b>	<b>56</b>	<b>59</b>
hembra 7	PB	0	0	14	0	18	8.4	0	0
	I	0	0	23	14.5	45	43.1	51	62
	S	100	100	63	85.4	37	48.4	48.9	38
	color vulv	rosa	blanco	blanco	rosa	rojo	rosa	rojo	blanco
	PMN	22	0	0	4	0	5	6	0
<b>HEMBRA</b>		<b>41</b>	<b>44</b>	<b>46</b>	<b>49</b>	<b>51</b>	<b>54</b>	<b>56</b>	<b>59</b>
hembra 8	PB	26.7	0	0	0	0	0		0
	I	30.2	66	13	17.7	16.2	0		27.1
	S	43	34	86.6	82.2	83.8	100		72.8
	color vulv	rosa	blanco	rojo	rosa	rosa	rosa		blanco
	PMN	14	0	10	21	7	7		8
<b>HEMBRA</b>		<b>41</b>	<b>44</b>	<b>46</b>	<b>49</b>	<b>51</b>	<b>54</b>	<b>56</b>	<b>59</b>
hembra 9	PB	0	0	0	0			0	11
	I	38.2	47.47	29.2	68.3			32.6	47.5
	S	61.7	52.52	69.6	31.7			67.4	41.5
	color vulv	blanco	blanco	rosa	blanco			blanco	rojo
	PMN	6	1	11	18			5	18
<b>HEMBRA</b>		<b>41</b>	<b>44</b>	<b>46</b>	<b>49</b>	<b>51</b>	<b>54</b>	<b>56</b>	<b>59</b>
hembra 10	PB	21	0	0	8	7	0	0	0
	I	76	58	74	29	53	45	50	46
	S	3	42	26	63	40	55	50	54
	color vulv	blanco	blanco	blanco	blanco	rosa	rosa	blanco	rojo
	PMN	0	0	0	0	0	0	0	0

**Cuadro 9:** Prueba de paralelismo. Resultados de las diluciones seriadas expresadas como porcentaje de unión entre las muestras de heces de 3 hembras (M37, M38 y M82 que corresponden a la hembra 2 día 60, hembra 3 día 60 y una hembra gestante respectivamente) para P4

	♀2 d60 M37	♀3 d60 m38	♀4g d1
1:2	10.6374479	11.9557153	13.6163899
1 : 5	16.8464304	16.1559094	24.2138903
1 : 10	25.2125778	24.9728928	37.5335274
1 : 20	41.8022028	41.585345	54.4370256
1 : 40	59.6530274	61.4449581	75.7290418
1 : 80	75.5350111	77.4581978	94.3388689

**Cuadro 10.** Prueba de paralelismo. Resultados de las diluciones seriadas expresado como porcentaje de unión entre las muestras de heces de dos hembras (muestras 37 y 38) para Estradiol E2

E2	% unión	
	m37	m38
1:2	11.8238994	51.1404612
1:5	14.8385744	68.6415094
1:10	20.4696017	88.9350105
1:20	36.951782	102.582809
1:40	57.1194969	124.989518
1:80	82.3689727	130.926625

**Cuadro 11.** Prueba de paralelismo. Resultados de las diluciones seriadas expresado como porcentaje de unión entre las muestras de heces de una hembra para Estradiol E2, con solución amortiguadora “buffer” y estándar 0 del kit.

<b>% Union</b>	<b>BRD</b>	<b>STD 0</b>
<b>1:2</b>	<b>25.12368973</b>	<b>26.5408805</b>
<b>1:5</b>	<b>33.71069182</b>	<b>56.360587</b>
<b>1:10</b>	<b>58.60796646</b>	
<b>1:20</b>	<b>88.4360587</b>	<b>96.97274633</b>
<b>1:40</b>	<b>113.9454927</b>	<b>99.62264151</b>
<b>1:80</b>	<b>131.8574423</b>	<b>103.4968553</b>

**Cuadro 12.** Citología vaginal, promedios de los conteos celulares por hembra.

	<b>Células del epitelio vaginal</b>					
<b>Grupo A</b>	<b>Superficiales</b>		<b>Intermedias</b>		<b>Parabasales</b>	
<b>h1</b>	51.74	±23.72	47.36	±23.105	0.81	±1.82
<b>h2</b>	45.64	±25.83	48.39	±22.155	5.86	±25.83
<b>h3</b>	52.87	±27.68	39.83	±24.232	7.31	±27.68
<b>h4</b>	56.68	±25.71	36.11	±20.84	7.12	±25.71
<b>h5</b>	45.83	±28.85	41	±22.665	12.86	±28.85
<b>Grupo B</b>						
<b>h6</b>	68.43	±25.92	24.35	±19.77	6.9	±25.92
<b>h7</b>	55.75	±30.41	33.43	±21.17	12.32	±30.41
<b>h8</b>	45.58	±29.8	31.55	±16.78	22.75	±29.8
<b>h9</b>	41.31	±20.47	47.51	±15.9	11.04	±20.47
<b>h10</b>	38.69	±20.75	52.25	±17.55	9.05	±20.75