

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CORTISOL EN SUERO, SALIVA Y
PELO DE TRES ELEFANTES ASIÁTICOS MANTENIDOS EN CAUTIVERIO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

QUETZALLI HERNÁNDEZ NAVA

Asesores:

Dra. Marcela del Rosario González de la Vara
MVZ Gerardo Enrique Martínez del Castillo
Dra. Marta Catalina Romano Pardo

México, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi Nico, mi papá, mi maestro, mi mejor amigo, por darme las armas necesarias para enfrentarme con entereza y tenacidad a cada reto de la vida y por iluminar mi camino día con día; donde quiera que estés, mi eterna gratitud y admiración.

A mi Mami, mi guía, mi confidente, mi consejera; por apoyarme a recorrer este largo camino, por su fortaleza ante cualquier obstáculo y por su cuidado cuando más lo he necesitado. Por siempre, gracias.

A mi Bisto, mi tía, mi enfermera, mi compañera de sueños siempre alcanzables, por su ayuda y amor incomparables.

A Chen, mi hermano, por inculcarme el amor por los animales y por enseñarme las cosas mágicas que esos hermosos individuos poseen.

A mi Chochis y Oso, por ser los abuelos que me brindaron cariño, cuidado y paciencia, por haber sido un ejemplo de unión familiar, de trabajo y fortaleza ante la enfermedad.

A mis Abues paternos, igualmente por enseñarme que con esfuerzo y responsabilidad, se llega a la meta.

A Sinué David, por tu cariño y por ser mi cómplice en muchas locuras y desafíos.

A Dux, mi fiel compañero, peludo, orejón y travieso, por su nobleza y protección.

A Ramus, Honey e India, por alegrarme mis días, mis tardes y mis noches, por permitir ser los individuos para realizar esta investigación.

A mis tíos y primos; los Nava y los Hernández, por su confianza.

A Alí, Aline, Dulce, Lizbeth y Fadua, mis amigas de toda la vida, por apoyarme en momentos difíciles y compartir tantas alegrías.

A mi Honorable ENP No. 2 “Erasmus Castellanos Quinto” y a mis estimados profesores por formarme desde “Iniciación Universitaria” y apoyar mis ideales para lograr lo que soy.

AGRADECIMIENTOS

A Dra. Marcela González de la Vara, mi asesora principal, por apoyarme desde que inicié la carrera, por su entrega a la gran labor que hace, por su generosidad y por todo lo aportado para la realización de esta investigación.

A Gerardo Martínez del Castillo, mi asesor y jefe, por su confianza y paciencia para enseñarme el maravilloso mundo de los elefantes y demás especies silvestres; mi más humilde admiración.

A Dra. Marta Romano, mi asesora, por su tiempo y por abrirme las puertas de su laboratorio en el CINVESTAV-IPN, para poder tener lo necesario y realizar mi trabajo experimental. Y **A Ricardo Valdez**, por su apoyo en el laboratorio.

A Dra Susana, por su apoyo y permitirme entrar a su laboratorio para realizar mis pruebas en el Depto. de Reproducción de la FMVZ.

A Dra Ana Rodríguez por brindarme su tiempo para revisar mi proyecto.

A Dra Ale Hernández por su apoyo en mi investigación y a **Africam Safari**, a sus guardanimales, demás MVZ's, administrativos; por su hospitalidad y por hacerme parte de su tribu.

A MVZ Raúl Ocadiz Tapia, MVZ Agustín Bobadilla mis maestros, por su calidez humana y por sus enseñanzas.

A Dra Anne Sisto y Dra Dulce Brousset, por su orientación y apoyo siempre que lo necesité.

A Tillín, por su apoyo y cariño.

A mi tía Chon-Marilú, la mejor bióloga que he conocido, por su enseñanza y ayuda durante mi formación como estudiante.

A mi Chino, mi Coco, mi Gallo y Bety por su apoyo incondicional y cariño.

A Memo, Gelos, Jime, Tillita y todos los de “Tipo,” por su cariño y fidelidad.

A mi Compayita, Anagaby, Mayin, Clau, Iván y Anita, por su afecto y apoyo inmejorable.

A Arturo Aragón, Carlos León, David Ramos, Roberto Villegas, Iván Quintero, Mar Corona, Mariana Ramírez, Karla Almeida, Mariela Hernández, Eva Gómez, Ana Duarte, Renata Martínez, por su ayuda en cada momento y por sus ánimos desde el inicio hasta la recta final de este trabajo. Inmensas gracias.

A la FMVZ-UNAM y mis profesores MVZ's, por darme las bases necesarias para desenvolverme en el ámbito profesional.

A México, por dejarme cumplir mis sueños, dentro y fuera de él.

A la vida, por permitirme estar aquí para conseguir siempre lo que deseo.

CONTENIDO

	Página
Resumen.....	1
Introducción.....	2
— Situación actual del elefante asiático (<i>Elephas maximus</i>).....	2
— Comercio del marfil.....	2
— Biología de la especie.....	2
— Piel.....	3
— Pelo.....	3
— Glándula temporal.....	3
— Organización social.....	4
— Comportamiento reproductivo.....	4
— Estrés y niveles de cortisol.....	5
Hipótesis.....	7
Objetivo principal.....	7
Objetivos específicos.....	7
Material y Métodos.....	8
— Lugar.....	8
— Animales.....	8
— Manejo rutinario.....	8
— Alojamiento.....	9
— Alimentación.....	10
— Toma de muestras.....	10
○ Muestras de sangre.....	10
○ Muestras de saliva.....	10
○ Muestras de pelo.....	11
— Determinación de Cortisol.....	12
—Determinación de cortisol por RIA.....	12
—Determinación de cortisol por ELISA.....	12
—Análisis estadístico.....	13
Resultados.....	14

— Concentración de cortisol en suero, saliva y pelo de Ramus.....	14
— Concentración de cortisol en suero, saliva y pelo de Honey.....	15
— Concentración de cortisol en suero, saliva y pelo de India.....	16
Discusión.....	17
Conclusiones.....	21
Referencias.....	22
 ANEXOS	
Anexo 1. Fotografías del exhibidor y entrenamiento de elefantes.....	28
— Imagen 1. Elefantes asiáticos (Ramus, Honey, India).....	28
— Imagen 2. Ejercicio de cepillado en entrenamiento.....	28
— Imagen 3. Ejercicio de limpieza de manos.....	28
— Imagen 4. Exhibidor de Elefantes asiáticos.....	28
Anexo 2. Cuadro de rutina diaria, alimentación y croquis de instalaciones.....	29
— Cuadro 1. Rutina diaria de ejercicios para elefantes asiáticos.....	29
— Imagen 5. Croquis de Instalaciones de elefantes asiáticos.....	30
— Cuadro 2. Dieta diaria por elefante asiático.....	30
— Cuadro 3. Soluciones Buffer para ELISA.....	31
Anexo 3. Fotografías de toma de muestras, procesamiento de muestras y cambios fisiológicos del Musth en el macho.....	32
— Imagen 6. Toma de muestra de pelo con tijeras del lomo del elefante...32	
— Imagen 7. Muestra de pelo en bolsa de ziploc.....	32

— Imagen 8. Ramus-Musth: secreción de glándula temporal, extendida hasta las mejillas.....	32
— Imagen 9. Secreción de glándula temporal, extendida hasta la barbilla.	32
— Imagen 10. Manchas de orina afectando la parte interna de las piernas.....	32
— Imagen 11. Honey y Ramus (Musth).....	32

RESUMEN

HERNÁNDEZ NAVA QUETZALLI. Determinación de los niveles de Cortisol en suero, saliva y pelo de tres elefantes asiáticos (*Elephas maximus*) mantenidos en cautiverio (bajo la dirección de: Dra Marcela del Rosario González de la Vara, MVZ Gerardo Enrique Martínez del Castillo y Dra Marta Catalina Romano Pardo).

El objetivo de este trabajo fue estudiar los niveles de cortisol en suero, saliva y pelo de tres elefantes asiáticos durante la época de Musth y no Musth. Los animales están ubicados en el Parque de Conservación de Vida Silvestre "African Safari", en Puebla-México. Todas las muestras se tomaron semanalmente durante seis meses. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena auricular y la vena safena, de las dos hembras y el macho, respectivamente, la saliva se obtuvo de la trompa de cada elefante y el pelo fue obtenido del lomo de los tres individuos durante el entrenamiento diario. Las concentraciones de cortisol en suero y pelo fueron medidas por Radioinmunoanálisis (RIA) y en la saliva por Enzimoimmunoanálisis (EIA). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de cortisol en suero, saliva y pelo, entre individuos ni entre períodos de Musth y no Musth ($P > 0.05$; U de Man Whitney y Kruskal Wallis). Los niveles de cortisol en suero variaron de 7.2-147.3 ng/mL, en saliva de 0.09-0.42 pg/mL y en pelo 2.5-10 ng/g. En este estudio por primera vez se miden los niveles de cortisol en pelo en elefantes asiáticos en cautiverio. Esta puede ser una herramienta importante para medir estrés crónico en estos animales con una técnica no invasiva y práctica que no causa dolor y da una medida retrospectiva de las respuestas fisiológicas de estrés.

1. Introducción

1.1 Situación actual del Elefante Asiático (*Elephas maximus*)

El Elefante Asiático (*Elephas maximus*), es el mamífero terrestre más grande que existe actualmente¹. Habita en India y al Sureste de Asia, con tres subespecies: *E. m. indicus* en el continente asiático, *E. m. maximo* de Sri Lanka, y *E. m. sumatranus* en la isla Indonesia de Sumatra.¹ Desde 1986 el Elefante Asiático (*Elephas maximus*), se ha considerado en peligro de extinción¹.

1.1.1 Comercio del Marfil

Los elefantes no son muy susceptibles a la depredación de forma natural, pero son susceptibles a depredación furtiva causada por el ser humano debido a la importancia económica. Desde hace siglos, el marfil se ha utilizado en la producción de diversas esculturas pequeñas, objetos de lujo, siendo parte de las culturas orientales y grandes imperios². En la actualidad en el mundo se trafica con este preciado material, lo cual equivale a miles de muertes para obtener dicho recurso³. Algunos no comparten la opinión que la población de elefantes ha disminuido y argumentan que sólo es cuestión de regularlo en el CITES (Comercio Internacional de Especies en Peligro de Extinción), para permitir su venta legal; mientras que otros han mostrado que en un 50% se ha reducido la población en ambas especies (*Elephas maximus* y *Loxodonta africana*) por la cacería furtiva y por la destrucción de su hábitat, la población estimada de elefantes asiáticos va de 40,000-50,000 individuos⁴.

1. 2 Biología de la Especie

Los elefantes asiáticos son una especie de mamífero proboscídeo de la familia *Elephantidae*, poseen una altura de 255cm a 305cm, el peso promedio según la subespecie en las hembras varía entre los 3000 a 4000kg y los machos de 3000kg y mayor de 5000kg⁵.

1.2.1 Piel

Su piel no tiene el mismo grosor en todas las partes del cuerpo. Es más delgada cerca de la oreja, alrededor de la boca y el ano, aproximadamente de 1.8mm. Es más gruesa en la cabeza, espalda y nalgas de 2.5-3.5cm la piel es el órgano más sensible y posee una gran inervación; su color es variado y puede presentar áreas menos pigmentadas en algunas zonas (orejas, frente y trompa). Normalmente la piel está cubierta con lodo para protegerse de las picaduras de los insectos, de la radiación ultravioleta y para evitar perder humedad⁶.

1.2.2 Pelo

El pelo puede encontrarse a lo largo del cuerpo en las crías y jóvenes elefantes, especialmente en la cabeza y el lomo. Los elefantes adultos lo poseen en menor cantidad. El pelo generalmente se concentra alrededor de los ojos, la boca, la barbilla, en la apertura de oídos y al final de la cola. El color del pelo varía desde tonalidades café rojizo, café, negro, blanco o grisáceo⁶. Se ha reportado que el crecimiento de pelo en elefantes adultos africanos es de 0.55 ± 0.11 mm/día en hembras y 0.81 ± 0.13 mm/día en machos, asimismo el pelo en la cola crece de 0.4-1.1 mm/ día, teniendo en cuenta diferencias individuales, donde el pelo de la cola puede medir hasta 50cm⁷.

1.2.3 Glándula Temporal

Las glándulas temporales están cubiertas por piel, donde esta es 2cm o más gruesa. Las glándulas producen sustancias químicas importantes en la reproducción del elefante, son una adaptación de la glándula sebácea localizada en medio del temporal, entre el ojo y la oreja en ambos lados de la cabeza, este se identifica como un orificio que puede apreciarse a simple vista⁸.

1.3 Organización Social

Los Elefantes forman grupos matriarcales complejos, dirigidos por una hembra adulta dominante, generalmente la de mayor edad dentro de la familia. La familia se compone de tres o cuatro generaciones de hembras y crías, las cuales pasan su vida entera juntas, no todas se encuentran emparentadas, pero no por ello, se les excluye de los beneficios de la sociedad⁹. Los machos, abandonan el grupo cuando han alcanzado la pubertad, de los 15 a 20 años de edad⁹, aunque se tienen reportes que puede ser desde los 10 años^{6,10}. Los machos, pueden vivir solitarios a kilómetros de otro elefante o grupo; a veces llegan a unirse 2 o más machos, pero jamás establecen relaciones permanentes. La madurez sexual en las hembras se presenta desde los 12-14 años¹⁰. La gestación dura 22 meses y al nacer, las crías de 1-6 meses, aprenden a discernir su alimento correctamente y permanecen con su madre de 2-5 años hasta que son destetadas^{6, 10}.

1.4 Comportamiento Reproductivo

Las hembras son poliéstricas no estacionales, su ciclo estral dura en promedio de 13 a 18 semanas y consta de dos fases, folicular y lútea ¹¹. La fase folicular (4-6 semanas) a su vez presenta dos picos de producción hormonal de LH (1.7 ng/mL); estos son precedidos por un aumento de estrógenos (135 ng/mL), cada uno dura 19-22 días, el primer pico de LH (fase anovulatoria) se acompaña de bajos niveles de FSH (1.5 ng/mL), en el segundo pico de LH (fase ovulatoria), inicia el incremento de inhibina (1.4 ng/mL), en esta última es donde la hembra será más receptiva al macho¹⁰. Posteriormente en la fase lútea (6-12 semanas) continúa el incremento de inhibina (1.6 ng/mL) y comienza el aumento de progesterona (1.3 ng/mL) para mantenerse uniforme junto con un nuevo incremento de FSH (3 ng/mL) en la semana 5 de dicha fase¹².

El Musth es el periodo reproductivo propio del elefante macho sexualmente maduro, que se acompaña de cambios conductuales y hormonales que coinci-

den con el incremento de las concentraciones de testosterona desde 3-150 ng/mL (40-60 veces mayor). La duración de este periodo es variable, pudiendo ser de hasta 5 meses. Algunos de los cambios incluyen la apertura de la glándula temporal y secreción oleosa de la misma compuesta por testosterona, androstenediona, dihidrotestosterona y en menor cantidad fenoles y cetonas. Durante el Musth el elefante muestra erección frecuente del pene y orina con mayor frecuencia, el olor es muy penetrante, incluso llega a lacerar la parte interna de sus miembros posteriores^{8,13,14}. La concentración de cortisol durante las épocas reproductivas de los elefantes, tanto en machos como en hembras, es elevada por diversos cambios fisiológicos y conductuales que presentan, sin embargo la relación del ciclo estral de la hembra con el Musth y los niveles de cortisol en cada una de estas etapas no han sido descritos con exactitud¹⁵.

1.5 Estrés y niveles de cortisol

Las respuestas fisiológicas de estrés, involucran principalmente al eje hipotálamo-hipófisis-corteza adrenal (H-H-A), ocupado como el método estándar para medir el bienestar animal¹⁶.

El factor liberador de la corticotropina (CRH) es producido en el hipotálamo por las células del núcleo paraventricular y llega a la hipófisis aumentando la secreción de ACTH. Esta tiene como función activar la corteza adrenal para que se produzcan glucocorticoides (especialmente cortisol y corticosterona) y se lleve a cabo la gluconeogénesis y otros cambios metabólicos. Estas hormonas influyen o participan en el aumento del catabolismo proteico, disminución de los ácidos grasos, aumento de glucosa en sangre, atrofia de los órganos linfáticos, disminución de las células leucocitarias y anticuerpos. Además en disminución de la capacidad reproductiva, infestaciones parasitarias oportunistas, así como, pueden presentarse úlceras gástricas y duodenales, etc^{17,18}. Finalmente, a largo plazo, la producción de esta hormona puede afectar negativamente la función inmunológica y la regeneración celular en diferentes órganos y tejidos^{18,19}.

El cortisol es un biomarcador para estrés, es generalmente pulsátil, sigue ritmos diurnos, en general, el pico de esta hormona, se produce hacia el final del periodo de oscuridad en animales diurnos, mientras que en especies nocturnas, hay un pico hacia el final del periodo de luz, ya que el llamado reloj biológico que regula el ritmo circadiano. En los mamíferos se localiza principalmente en el Núcleo supraquiasmático (NSQ), la actividad es modulada por la variación de luz, esta información se transporta a la glándula pineal para secretar melatonina, esta última es inhibida por la luz y estimulada por la oscuridad, induciendo la actividad en animales nocturnos y generando sueño en los diurnos^{16,20}.

El cortisol está influenciado por el estado fisiológico, la edad y el consumo de alimento y los factores ambientales, como la temperatura, humedad, edad y estado fisiológico, sólo para citar las principales fuentes de variación que deben ser tomadas en consideración. Se ha medido en varias matrices biológicas como en suero, saliva, orina, heces y pelo, en el ser humano y otras especies animales^{16,21}. Los episodios de liberación de los glucocorticoides generalmente son irregulares, especialmente cuando se miden por largos periodos de tiempo^{22,23}; sin embargo en el pelo estos niveles no se ven afectados por los ritmos circadianos²⁴ y pueden mantenerse estables por mucho tiempo. La deposición de cortisol en pelo está dada por difusión pasiva de sangre en el folículo piloso, la concentración del analito en el pelo, refleja la cantidad de cortisol en sangre durante el periodo de crecimiento de este¹⁸. Asimismo, los niveles de cortisol acumulados en el pelo nos pueden mostrar diferentes situaciones de estrés, teniendo como ventajas que las muestras de pelo son fáciles de coleccionar y almacenar, además, es una técnica no invasiva que no causa dolor ni estrés a los animales^{25,26,27}.

En Elefantes Asiáticos, se han medido los niveles de cortisol en suero y saliva principalmente, como indicadores de bienestar¹⁵. Dichos niveles son muy variables, van desde 11.13-51.6 ng/mL, hasta 4.6-98.7 ng/mL en suero^{28,29}. Res-

pecto a la saliva, se reportan valores desde 1.55 ± 0.67 nmol/L (0.56 ± 0.24 ng/mL) a 4.93 ± 1.97 nmol/L (1.7 ± 0.71 ng/mL)³⁰, hasta 31.8 nmol/L (11.52 ng/mL)³¹, una tercera fuente sólo menciona que están por debajo de 0.1 µg/dL (1 ng/mL)³². A la fecha no se encontraron estudios donde se evalúan concentraciones de cortisol en pelo de elefantes asiáticos, sólo se tiene la referencia en elefantes africanos (*Loxodonta africana*), que poseen valores desde 4.73-34.95 ng/g³³. Es sabido que los niveles de cortisol se incrementan en la fase reproductiva de algunas especies^{34,35}. Sin embargo, no se encontraron reportes donde se hayan medido los niveles de cortisol en el pelo de elefantes asiáticos ni su relación con las hembras y las fases reproductivas de los machos (No-Musth y Musth). Por esto, en el presente estudio se pretende comparar estas etapas porque se asume que el incremento de cortisol es necesario en estos individuos.

2. Hipótesis

El cortisol estará presente en el suero, así como en la saliva y pelo de los elefantes asiáticos en cantidades detectables, mediante Radioinmunoanálisis y presentarán valores elevados en el Musth, en comparación con el no Musth en los tres ejemplares.

3. Objetivo principal

Estudiar los niveles de cortisol en suero, saliva y pelo de los tres elefantes asiáticos.

3.1 Objetivos específicos

3.1.1 Determinación del cortisol en suero, saliva y pelo de dos hembras y un macho.

3.1.2 Determinación de cortisol sérico en dos hembras y un macho durante y después del periodo de Musth del macho, para obtener datos preliminares indicativos de estrés en diferentes épocas reproductivas.

4. Material y Métodos

4.1 Lugar

Se realizó en el Parque de Conservación de Vida Silvestre, Africam Safari, situado en Km16.5 Blvd. Cap. Carlos Camacho (antes Carr. a Valsequillo), Puebla, Pue. México, se encuentra a 2100 msnm, localizado geográficamente entre los 19°00'94 N y 86°20'91 E. Presenta un clima templado seco, vegetación de selva baja caducifolia con matorral xerófilo, con una temperatura media anual entre los 12 y 18°C con poca oscilación; la temperatura del mes más cálido varía de 5 a 32°C y el mes más frío de -3 a 18°C. La precipitación media estatal es de 1270mm anuales^{36,37}.

4.2 Animales

Se trabajó con tres elefantes asiáticos (*Elephas maximus*) adultos, una hembra de 3789 Kg llamada Honey, otra hembra con el nombre de India de 4381 Kg y un macho llamado Ramus de 5028 Kg. La edad de los tres ejemplares está estimada entre 40-50 años, respectivamente; a los cuáles se les ha venido entrenando desde su llegada al Parque para la obtención de muestras sanguíneas, entre otros manejos de rutina. (Anexo 1, Imagen 1)

4.3 Manejo Rutinario

A los tres elefantes se les condiciona diariamente por medio de contacto protegido y refuerzo positivo para diferentes manejos, donde realizan un esfuerzo físico y mental, y se cuenta con un calendario diferente en cada uno de los días de la semana. Los ejercicios se realizan para habituar a los elefantes a diferentes manejos clínicos, como la toma de sangre, introducción de sonda de plásti-

co de 2cm de diámetro en la trompa en caso de realizar un estudio a futuro que involucre el uso de un objeto similar. Además se monitorea tuberculosis cada seis meses por medio de instrucciones al elefante de aspiración y expulsión de SSF al 0.9% (solución salina fisiológica) a través de la trompa en un recipiente cilíndrico, se hace palpación rectal o vaginal para realizar ultrasonidos o también se efectúa el cuidado corporal como limpieza de las cuatro extremidades y colocación de brazaletes, etc. Estos ejercicios son identificados por simples palabras para fines de identificación en el calendario, estos mismos involucran diferentes órdenes que el elefante identifica a la perfección realizando el ejercicio sin problema alguno. (Anexo 1, Imágenes 2 y 3), (Anexo 2, Cuadro 1).

4.4 Alojamiento

Los Elefantes cuentan con un exhibidor de 1666.52 m² de superficie, donde pasan 8 horas del día aproximadamente, cuenta con pasto kikuyo, el cual no es dañino para los individuos e igualmente les sirve para consumo. Posee una sombra al centro del exhibidor en forma triangular de 7 m x 7 m, a una altura de 10 m del piso, abundante tierra de tepetate calizo, lo cual permite que los elefantes puedan bañarse cuando deseen, las paredes son rocosas para que estos puedan rascarse (Anexo 1, Imagen 4). Dicho recinto está delimitado por un foso que se encuentra a su alrededor y cuenta con sistema de cerco eléctrico. Se les resguarda en sus cuartos de noche o dormitorios de 17:30-7:00, donde tienen camas de tepetate y arena. Cuando no es época de lluvias, se les permite permanecer en el exhibidor toda la noche para que su encierro no sea tan prolongado, sus dormitorios poseen las siguientes medidas: (Anexo 2, Imagen 5)

- El Dormitorio 2: 780 cm x 670 cm x 400 cm
- El Dormitorio 3: 660 cm x 681 cm x 370 cm
- El Dormitorio 4: 660 cm x 520 cm x 370 cm

4.5 Alimentación

A los tres elefantes se les proporciona una dieta establecida por el Departamento de Nutrición del Parque, basada en “Elephant Husbandry Resource Guide-Maintenance”³⁸; la dieta es la misma para los tres elefantes, la cual está racionada y cumple los requerimientos estimados para la especie. (Anexo 1, Cuadro 2).

4.6 Toma de muestras

4.6.1 Muestras de sangre

Las muestras de sangre se tomaron por individuo cada 15 días, a las 7:30 am durante el entrenamiento por nueve meses, (n=53). Fueron tomadas de la vena auricular izquierda y de la vena safena izquierda, en las hembras y el macho. Las muestras se obtuvieron con “Mariposa Vacutainer”® múltiple Safety Lok, estéril, calibre 23G x 3/4” x 12” y se colectaron en tubos de plástico para serología Vacutainer® sin anticoagulante, con gel separador-activador de coágulo de 8.5mL, de 16x100mm³⁹. Cada muestra de sangre se etiquetó con nombre del elefante, fecha y hora de la colección. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm por 15 min, para obtener el suero y colocarlo en tubos Eppendorf de 2 mL de capacidad; se guardó en un congelador a -15°C hasta su procesamiento.

4.6.2 Muestras de saliva

Se tomaron cinco muestras de saliva a cada individuo, a las 7:30 am, una por cada mes (tres meses correspondientes al no Musth y 2 meses que involucraron al Musth (n=15). Se obtuvieron de la trompa del elefante con un recipiente estéril de plástico. La colecta se realizó durante el entrenamiento. Las muestras de saliva se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad e inmediatamente se congelaron a -15°C.

4.6.3 Muestras de pelo

Se tomaron 2 muestras de pelo de los 3 elefantes a las 7:30 am, la 1^a que correspondiera a algún mes previo al Musth y la 2^a correspondiente al periodo de Musth (n=6). Las muestras fueron tomadas del lomo (aproximadamente 1g) con tijeras que fueron limpiadas con etanol antes y después de tomar cada muestra. El pelo se colocó en bolsas de plástico ziploc® etiquetadas con el nombre del elefante, la región de donde se obtuvo y fecha de colecta, posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente. La técnica utilizada se tomó de González-de-la-Vara *et al.* (2011)²⁵ basada en Cirimele V *et. al* (2000)⁴⁰. Las muestras fueron limpiadas con alcohol, cortadas con tijeras aproximadamente 1 mm de longitud, se almacenaron nuevamente en papel aluminio y bolsas de plástico ziploc®. En el laboratorio, 300mg de pelo se incubaron en viales de borosilicato de 20mL (Wheaton®/Disposable Scintillation Vial) a temperatura ambiente con 15mL de metanol (EMD® Chemicals INC Darmstadt Germany) de alta pureza (99.8%) durante una hora, posteriormente se colocaron en el agitador Multitube-Vortexer a 3000 rpm durante dos horas, se fueron alternando periodos de agitación e incubación hasta cumplir 38 horas en total; esto se hizo para facilitar la capacidad de penetración del metanol al pelo. (Anexo 3, Imágenes 6 y 7)

Una vez terminado el periodo, se vertieron las muestras en viales cónicos de borosilicato de 15mL (Corvex®) durante una hora y media. El sobrenadante se vertió en viales de borosilicato, se secó totalmente con gas nitrógeno de alta pureza y se refrigeró a 4°C.

4.7 Determinación de Cortisol

4.7.1 Determinación de cortisol por RIA

En el laboratorio del Depto de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV-IPN, para medir el cortisol en el suero y pelo, se utilizaron dos kits de radioinmunoensayo "CORT-CT2" de Cisbio®.

El principio del ensayo se basa en la competencia entre el antígeno del estándar o muestra y el antígeno marcado para un número fijo y limitado por los sitios de unión del anticuerpo, unidos a la fase sólida (tubos recubiertos). Después de la incubación, el trazador no unido se elimina fácilmente por una etapa de separación de las moléculas de yodo que no se adhirieron a los tubos. La cantidad de cortisol marcado unido al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de cortisol no marcado presente inicialmente en la muestra⁴¹.

Se utilizó una curva estándar de 0, 5, 10, 20, 75, 250, 500, 1000 y 2000 nmol/L, el estándar interno usado fue de 75 nmol/L y el control de calidad interno, establecido como ensayo previo para determinar su concentración. Las muestras de suero y pelo fueron analizadas por duplicado.

Las concentraciones de cortisol en suero y pelo fueron medidas con un contador de rayos gamma marca Cobra II Auto Gamma Counting System Packard Instruments. Camberra Company®.

4.7.2 Determinación de cortisol por ELISA

La técnica de ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes marcados con una enzima e inmovilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente), la reacción antígeno-anticuerpo, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico y al actuar la enzima, producirá un color observable a sim-

ple vista y cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro^{42,43}.

En el laboratorio de Reproducción de la FMVZ-UNAM, el cortisol de la saliva fue medido por un ELISA competitivo, se utilizó una placa Nunc maxisorp®, recubierta con antisuero cortisol (R4866 C.Munro, University of California, Davis). La curva estándar fue preparada a partir de un estándar en etanol (0.0025-0.5 ng/mL). Se adicionaron a los pozos designados de la placa 50 ul de estándar o muestra para cada una y 50 ul de conjugado de cortisol unido a peroxidasa de rábano picante (HRP). Se utilizó como sustrato ABTS y se detuvo la reacción con ácido hidrofúrico. (Anexo 2, Cuadro 3)

La reacción es dependiente de parámetros fisiológicos como pH 7.2, molaridad 0.15M, temperatura 37°C, equilibrio 1-3 horas. La absorbancia fue medida a 410 nm sobre un espectrofotómetro (Dynatech Laboratories MRX®). La sensibilidad del ensayo fue de 0.005 ng/mL, con un coeficiente de variación intraensayo de 6.78%. Todo el proceso, se realizó siguiendo el protocolo del ensayo de Munro, C. y Stabenfeldt, G (1985)⁴². Los resultados se calcularon en pg/mL.

4.8 Análisis Estadístico

Los datos de las concentraciones de cortisol en suero, saliva y pelo, no presentaron una distribución normal, fueron analizados por las pruebas estadísticas Kolgomorov-Smirnof y Sesgo y Curtosis. Para hacer la comparación de medias se utilizó la prueba de Fisher. Se empleó la prueba no paramétrica de U de Mann Whitney para comparar dos grupos independientes, en este caso los periodos de Musth y No Musth, donde $P < 0.05$ indicaba significancia estadística. Para comparar los valores de cortisol en saliva, suero y pelo de los tres elefantes entre sí, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para comparación de tres o más grupos independientes. Todas las pruebas fueron analizadas con el programa estadístico Stat Graphics Centurion®.

5. Resultados

5.1.1 Concentración de cortisol en suero, saliva y pelo de Ramus♂

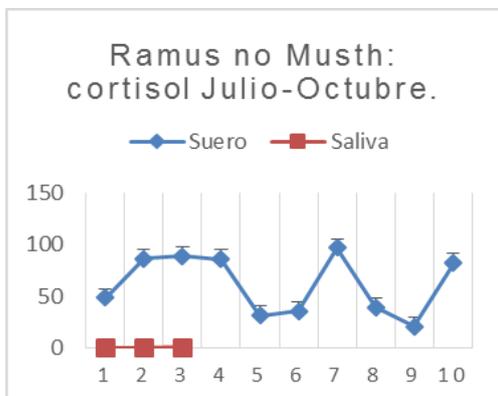
A continuación se muestran los valores de cortisol en suero, saliva y pelo de Ramus, tomando en cuenta las etapas no Musth y Musth sin encontrar diferencias significativas, donde $P > 0.05$ en suero ($P = 0.68$) saliva ($P = 0.41$). (Cuadros 4 y 5) (Gráficas 1 y 2).

Cuadro 4. Ramus cortisol no Musth

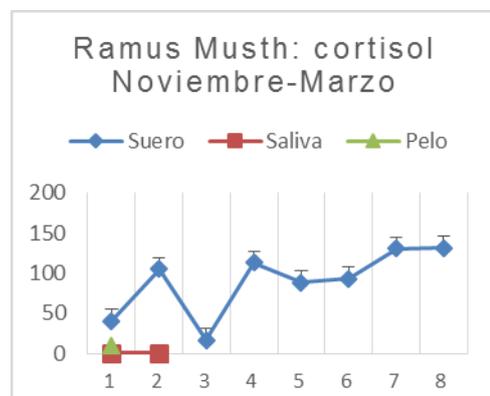
Muestra	Suero ng/mL	Saliva pg/mL
1	48.2	0.12
2	86.4	0.13
3	89.2	0.31
4	86.1	
5	31.3	
6	35.3	
7	96.7	
8	39.1	
9	20.2	
10	82.1	

Cuadro 5. Ramus cortisol Musth

Muestra	Suero ng/mL	Saliva pg/mL	Pelo ng/g
1	40.3	0.42	10
2	104.7	0.21	
3	16.5		
4	112.7		
5	88.1		
6	93.3		
7	130.3		
8	131.5		



Gráfica 1. Valores de cortisol de suero (ng/mL), saliva (pg/mL). Los valores de saliva equivalen a 0.01 ng/mL. El pelo no fue detectable.



Gráfica 2. Valores de cortisol de suero (ng/mL), saliva (pg/mL) y pelo (ng/g). Los valores de saliva equivalen a 0.02 ng/mL.

5.1.2 Concentración de cortisol en suero, saliva y pelo de Honey♀

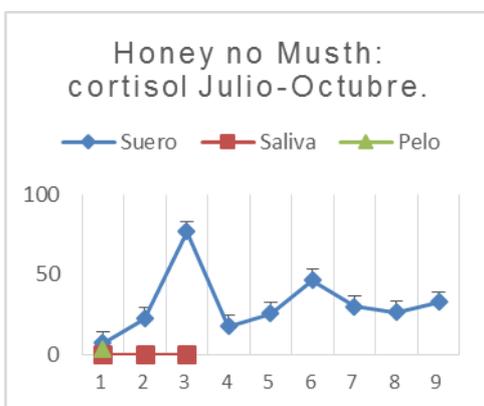
A continuación se muestran los valores de cortisol en suero, saliva y pelo de Honey, tomando en cuenta las etapas no Musth y Musth sin encontrar diferencias significativas, donde $P > 0.05$ en suero ($P = 0.09$) y saliva ($P = 0.12$). (Cuadros 6 y 7) (Gráficas 3 y 4).

Cuadro 6. Honey cortisol No Musth

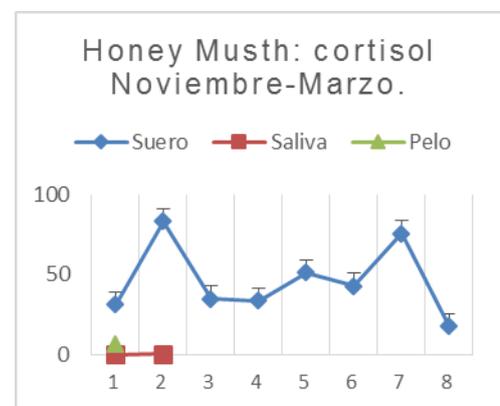
Muestra	Suero (ng/mL)	Saliva (pg/mL)	Pelo (ng/g)
1	7.2	0	3
2	22.4	0.13	
3	76.5	0.17	
4	17.5		
5	25.6		
6	46.3		
7	30		
8	26.4		
9	32.6		

Cuadro 7. Honey cortisol Musth

Muestra	Suero (ng/mL)	Saliva (pg/mL)	Pelo (ng/g)
1	31.3	0.34	7
2	83.1	0.5	
3	35		
4	33.9		
5	51.4		
6	43		
7	75.7		
8	17.8		



Gráfica 3. Valores de cortisol de suero (ng/mL), saliva (pg/mL) y pelo (ng/g). Los valores de saliva equivalen a 0.01 ng/mL.



Gráfica 4. Valores de cortisol de suero (ng/mL), saliva (pg/mL) y pelo (ng/g). Los valores de saliva equivalen a 0.02 ng/mL.

5.1.3 Concentración de cortisol en suero, saliva y pelo de India♀

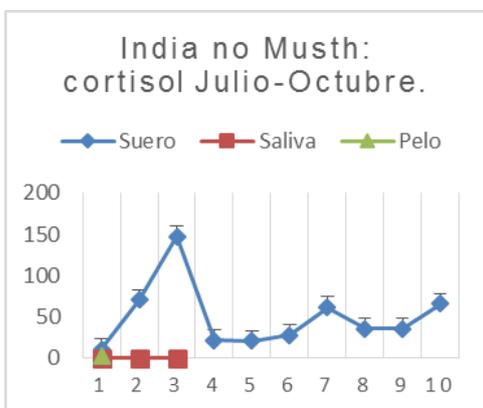
A continuación se muestran los valores de cortisol en suero, saliva y pelo de India, tomando en cuenta las etapas no Musth y Musth sin encontrar diferencias significativas, donde $P > 0.05$ en suero ($P = 0.39$) y saliva ($P = 0.76$). (Cuadros 8 y 9) (Gráficas 5 y 6).

Cuadro 8. India: cortisol no Musth

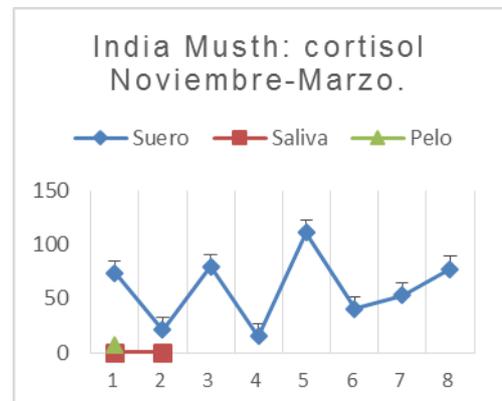
Muestra	Suero (ng/mL)	Saliva (pg/mL)	Pelo (ng/g)
1	10.9	0.13	2.5
2	70.6	0	
3	147.3	0.09	
4	21.9		
5	21.2		
6	27.8		
7	61.5		
8	35.6		
9	35.5		
10	65.9		

Cuadro 9. India: cortisol Musth

Muestra	Suero (ng/mL)	Saliva (pg/mL)	Pelo (ng/g)
1	73.4	0.11	7.3
2	20.8	0.49	
3	79.6		
4	15.3		
5	111.2		
6	40.5		
7	53		
8	77.3		



Gráfica 5. Valores de cortisol de suero ng/mL, saliva (pg/mL) y pelo (ng/g). Los valores de saliva equivalen a 0.01 ng/mL.



Gráfica 6. Valores de cortisol de suero ng/mL, saliva (pg/mL) y pelo (ng/g). Los valores de saliva equivalen a 0.02 ng/mL.

6. Discusión

Son pocos los estudios realizados para mediciones de cortisol en elefantes, respecto a otras especies. Yon L, *et. al.* (2007), realizaron un estudio con prueba de desafío a la ACTH durante la etapa de Musth en cuatro elefantes machos en cautiverio de 15-43 años de edad, encontrando un aumento en cortisol, sin embargo los niveles basales fueron de 27-140 ng/mL, previos a la administración de ACTH⁴⁴, lo que se asemeja a los valores obtenidos por el estudio antes mencionado. El análisis estadístico entre los niveles de cortisol en suero entre las etapas de no Musth (16.5 ng/mL) y Musth (131.5 ng/mL), no muestra diferencia estadística significativa entre ellas ($P > 0.05$) donde $P = 0.68$, lo cual hace pensar que el Musth no es considerada como una etapa estresante. Este es el primer estudio que demuestra niveles comparables de cortisol en Musth y no Musth en el macho.

En las hembras tampoco se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de cortisol, tampoco existe evidencia de diferencia con relación al macho, $P > 0.05$, (Honey, $P = 0.09$ e India, $P = 0.39$). No obstante, existen estudios donde al comparar las concentraciones de cortisol en elefantes asiáticas y africanas en los periodos de Musth y no Musth del macho, en estos estudios Brown JL, *et al.* (1995), Duer C, *et. al.* (2007) y Oliveira, *et al.* (2008), mencionan que los niveles de cortisol en el suero de las hembras aumentan durante la fase lútea (97.4 ng/mL) debido al periodo del Musth en el macho e incluso los niveles se encuentran más elevados que durante el parto (3.6-34.9 ng/mL) ^{45,46,47}. Sin embargo, en el presente estudio el número de muestras de suero para la determinación de cortisol en machos y en hembras fue limitado debido a protocolos de manejo en el parque ($n = 3$).

Los niveles de cortisol en saliva en el presente estudio se compararon en las mismas dos etapas y demostraron en los individuos estudiados niveles entre 0.0276-0.0552 nmol/L (0.01-0.02 ng/mL), estos resultados tampoco mostraron

diferencia estadística significativa entre la etapa de no Musth y Musth (Ramus, $P=0.41$) (Honey, $P=0.12$) (India, $P=0.76$), sin embargo, se encontraron valores de cortisol mucho más bajos que los reportados por otros autores.

La concentración de cortisol salival ha sido reportada como variable en diversos estudios. Dathe HH, *et al.* (1992) reportaron valores de 6.6-31.8 nmol/L³², en mediciones realizadas durante el proceso de habituación a una nueva compañera. En tanto Swilley A, *et al.* (2008), reportaron niveles de 0.01 µg/dL (2.76 nmol/L) mencionando que los niveles de cortisol en elefantas son generalmente tan bajos que resulta difícil detectarlos mediante el RIA, aunque esto depende también de la sensibilidad de la prueba³³. De igual manera Menargues MA, *et al.* (2008), reportaron niveles de 1.96-4.26 nmol/L⁴⁸, en hembras en cautiverio de distintas edades, que se fueron integrando poco a poco a un nuevo grupo social, el mismo autor 4 años después reporta niveles muy similares en el mismo grupo de hembras (1.55-4.93 nmol/L)³⁰. No obstante los tres ejemplares estudiados se encuentran juntos en el parque, desde hace 6 a 9 años, y ya se encuentran totalmente adaptados como grupo social. Los niveles de cortisol en saliva, no se habían utilizado para examinar dicha hormona en cambios de respuesta a eventos de Musth, tampoco se han usado para ciclo estral y/o gestación, como en el suero. Sin embargo, el medir cortisol en saliva, no es una herramienta tan recomendable para determinar cortisol en elefantes, su medición puede ser afectada por el horario de la toma de muestra, contaminación de esta con otros fluidos, restos de alimento, entre otros³². Tanto en el presente estudio, como en los previos, los valores de cortisol son muy variables y bajos, lo que impide tener un amplio rango para evaluar alguna diferencia significativa entre épocas (no Musth y Musth) y evaluar estrés en elefantes. No obstante, en la presente investigación hubiera sido recomendable coleccionar más muestras y a lo largo del día.

Los niveles de cortisol en suero y saliva, así como en otras muestras biológicas han resultado ser muy valiosos¹⁹, ya que se han detectado concentraciones

significativas en elefantes, también se han obtenido en el pelo de elefantes africanos (*Loxodonta africana*), con valores de 2.68-34.95 ng/g, desde la primera toma hasta la 2ª transcurriendo 98 días³⁴; aunado a esto, es una buena técnica y no invasiva, en muchas ocasiones, se tienen entrenados a los animales siendo parte de su rutina diaria, para poder obtenerlo sin causarles dolor, como en los ejemplares de estudio. Está entendido que, las concentraciones de cortisol fluctuarán sobre una base continua a corto o mediano plazo, estas mediciones en el pelo, tienen el potencial para reflejar o integrar la concentración de cortisol en sangre durante el periodo del crecimiento del mismo, así pues, el muestreo podría reflejar semanas o meses de actividad del HHA (eje hipotálamo-hipófisis-adrenal) dependiendo de la longitud del pelo analizado^{34,49}. En esta investigación, se determinaron valores de cortisol en pelo, en un rango de 2.5-10 ng/g sin obtener diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre individuos y entre épocas de Musth y no Musth. Hay que tomar en cuenta que en este trabajo las muestras de pelo fueron obtenidas de la misma zona, del lomo de los elefantes y no de las manos como Berkvens CN, (2012) menciona en su estudio, además los elefantes de nuestro estudio son Asiáticos y no Africanos como en el estudio mencionado³⁴. Los niveles de cortisol entre ambos estudios difieren mucho, posiblemente se deba al comportamiento y a las condiciones anatómicas, fisiológicas entre individuos y del hábitat (vegetación-alimentación).

El periodo de Musth en los elefantes generalmente se encuentra asociado con cambios hormonales y de conducta⁵⁰. En esta etapa los niveles de testosterona en los machos aumentan hasta en un 60% en comparación con el periodo en el que no lo presentan (no Musth) y se muestran más agresivos debido probablemente al incremento de testosterona^{9,51}. Se tienen descritos que las hembras de elefantes africanos en estro, se les ha observado más en cercanía de los machos en Musth, que los que no se encuentran en Musth, inclusive, no está bien estudiado, pero las hembras prefieren a machos viejos en Musth (más de 35 años), que a los jóvenes en la misma situación, aunque obviamente

muestran comportamiento de apareamiento y lo hacen con éxito^{52,53}. Se ha observado que la época de Musth está relacionada con la época de lluvias, durante este periodo los machos frotan el área de la glándula temporal contra los árboles como marcaje⁸. Poole JH, (1982) y Poole JH (1989), menciona que la duración del Musth en el macho de mayor jerarquía social, está relacionada aparentemente con el Musth de los machos cercanos a él y con los que presentan simultáneamente esta condición. Durante esta época los elefantes disminuyen su condición corporal ya que también la ingesta de alimento es menor^{9,54}.

Hollister SA, *et. al.* (2007) citan que, el estado de dominancia es un tema recurrente en los análisis de reproducción en los elefantes machos, el cual refleja el hecho de que en muchas especies, el acceso a hembras reproductoras es fuertemente influenciado por la competencia entre ellos, sin embargo los machos alcanzan su estatus de dominancia de diferentes maneras y el tamaño es uno de los más importantes indicios de dominancia en elefantes ^{9,52}. El periodo de Musth del macho en estudio, dura de 4-5 meses que corresponden de Noviembre al mes de Marzo o Abril, probablemente existen muchos factores que afectan dicho evento como, el cautiverio, el clima, la altitud, la alimentación, la presencia de las hembras, etc. Poole JH, (1982), cita 4 etapas del Musth; la primera que está dada por la apertura de la glándula temporal, pérdida del apetito y de atención hacia sus manejadores, la segunda es cuando se muestra el exudado oleoso de la glándula temporal en ambas mejillas y se observan erecciones frecuentes (llamada como Musth superior), la tercera etapa está dada por la descarga de la orina (denominada como Musth menor), por último, la cuarta etapa; en la que incrementa la descarga de orina, observándose las piernas manchadas y el olor es extremadamente penetrante^{9,54}. (Anexo 3, Imágenes 8,9 y10) El macho en estudio, presenta como tal la evolución del Musth, sin embargo la duración es mayor y nunca perdió condición corporal ni apetito, probablemente debido a que es el único macho con las dos hembras y no tiene

competencia ni influencia de la cercanía de otros machos. (Anexo 3, Imagen 11).

De igual manera Hollister SA, *et. al.* (2007), mencionan que los machos entran varias veces en Musth, a lo largo de su vida, ya sea con alta o baja jerarquía social⁵². Weilgart L, *et. al.* (1996) y Bates, *et al.* (2010) citan que este estado no está relacionado con el estro de las hembras^{55,56}.

7. Conclusiones

Se determinaron valores de cortisol en suero, saliva y pelo de los tres elefantes en ambas épocas del macho. No se encontraron diferencias significativas dentro de las pruebas estadísticas, con respecto a las dos etapas (no Musth y Musth) en los tres tipos de muestras, sin embargo, no se descarta la hipótesis de encontrar el cortisol elevado en la época de Musth, respecto a las hembras y el macho.

En este estudio por primera vez se miden los niveles de cortisol en pelo en elefantes asiáticos (*Elephas maximus*) comparando las etapas de Musth y no Musth en cautiverio. Esta puede ser una herramienta importante para medir estrés crónico en estos animales con una técnica no invasiva y práctica que no causa dolor y ofrece una medida retrospectiva de las respuestas fisiológicas de estrés.

Referencias:

1. Choudhury, A. et al. *Elephas maximus* , In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species.
2. IFAW. International Fund for Animal Welfare. Ending the Ivory trade. USA. 2015. Revisión 2015. <http://www.ifaw.org/international/our-work/elephants/ending-ivory-trade>.
3. Wasser S, Poole JH, Lee P, Lindsay K, Dobson A, Hart J, et. al, Elephants, Ivory and Trade. Science- AAS. 2010 Mar [citado 2010 Mar 12]; 327. Disponible en: www.sciencemag.org
4. Wasser S, Nowak K, Poole JH, Hart J, Beyers R, Lee P, et. al, Elephants, Ivory and Trade. Science- AAS. 2010 Mar [citado 2010 Jun 25]; 328. Disponible en: www.sciencemag.org
5. Schutle, B.A. Social Structure and Helping Behavior in Captive Elephants. Zoo Biology. 2000.19:447-459.
6. Smithsonian National Zoological Park. Smithsonian Conservation Biology Institute. Elephant Reproduction Project. The Estrous Cycle of Elephants. Revisión 2011. Dirección URL:<http://nationalzoo.si.edu/SCBI/ReproductiveScience/ElephantBreedRepro/EstrousCycle.cfm>
7. Cerling TE, et al, Stable isotopes in elephant hair document migration patterns and diet changes, Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America-Ecology. 2006.103; 371-373.
8. Poole, JH. Musth and Male-Male Competition in the African Elephant (Thesis to the Degree of Doctor of Philosophy). University of Cambridge. 1982.

9. Wemmer C, Christen CA. Elephants and ethics: toward a mortality of co-existence. Johns University Press, USA (470). 2008.
10. AZA Elephant TAG/SSP Elephant Information. Elephant Reproduction. Revisión 2010. Citado 2009 Jun 10. Dirección URL: http://www.elephanttag.org/general/general_elephant_reproduction.html
11. Lueders I, Hildebrandt TB. Female elephant reproduction. In Fowler ME, Miller RE, editors. Zoo and wild animal medicine. Current therapy. Saunders. 2011.7:503-513.
12. Hodges JK, Endocrinology of the ovarian cycle and pregnancy in the Asian (*Elephas maximus*), and African (*Loxodonta africana*) elephant. Animal Reproduction Science. 1998. 53; 3-18. (poner en ciclo)
13. Niemuller C.A., Liptrap R.M. Altered androstenedione to Testosterone ratios and LH concentrations during musth in the captive male Asian elephant (*Elephas maximus*). Journals of Reproduction & Fertility Ltd. Great Britain. 1991. 91:139-146.
14. Rasmussen LE, Schulte BA. Chemical signals in the reproduction of Asian (*Elephas maximus*) and African Elephants (*Loxodonta africana*) elephants. Animal Reproduction Science. USA. 1998. 53:19-34.
15. Ajitkumar G, Abraham D, Cheeran JV, Chandrasekharan K. The Captive Asian Elephant. Conservation, Biology, Diseases, Management, Training.
16. Mormède P, Andanson S, Aupérin B, et al. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. Physiol Behav 2007.92:317–339.
17. Lay DC, Friend TH, Randel RD, Jenkins OC, Nevendorff DA, Kapp GM, et al., Adrenocorticotrophic hormone dose response and some physiolog-

- ical effects of transportation on pregnant Brahman cattle. *Journal of Animal Science*.1996.74: 1806-1811.
18. Mason GJ, Veasey JS. How Should the Psychological Well-Being of Zoo Elephants be Objectively Investigated? *Zoo Biology*. 2010. 29; 237-255.
 19. García GSX, Gijón GE, Prieto GB. *Guía de fisiología médica*. UNAM. 2010
 20. Moberg GP, Mench JA. *The Biology of Animal Stress: Basic principles and implications for animal welfare*. New York.CABI publishing, 2000.1-9,291-295.
 21. González VM, Yabuta AK, Galindo F. Behaviour and adrenal activity of first parturition and multiparous cows under a competitive situation. *Applied Animal Behaviour Science*. 2003.83; 259–266.
 22. Kirschbaum C, Tietze A, Skoluda N, Dettenborn L. Hair as a retrospective calendar of cortisol production-increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy. *Psyneuen* 2008; 34; 7-32
 23. Koren L, Mokady O, Karastov T, Koren G, Geffen E. A novel method using hair for determining hormonal levels in wildlife. *Anim Behav* 2002; 63:403-406.
 24. Van den Hauwe O, Dumoulin F, Elliot C, Van Peteghem C. Detection of synthetic glucocorticoid residues in cattle tissue and hair samples after a single dose administration using LC-MS/MS. *Chromatogr B* 2005. 817; 15–223.
 25. González-de-la-Vara, R.A. Valdez , V. Lemus-Ramírez , J.C. Vázquez-Chagoyán, A. Villa-Godoy and M.C. Romano. 2011. Effects of ACTH challenge and age on hair cortisol concentrations in dairy cattle. *Can J of Vet Res*. 2011. 75:216.
 26. Cirimele V, Kintz P, Dumestre V, Goullé JP, Ludes B. Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography–ionspray mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 2000; 107:381-388.

27. Gratacós-Cubarsí M, Castellari M, Valero A, García-Regueiro JA. Hair analysis for veterinary drug monitoring in livestock production. *J Chromatogr B*. 2006. 834:14–25.
28. Fowler ME, Mikota SE. *Biology, Medicine and Surgery of Elephants*. Iowa. Blackwell publishing. 2006;377-388
29. Brown JL, Walker SL, Moeller T. Comparative Endocrinology of Cycling and Non-cycling Asian (*Elephas maximus*) and African (*Loxodonta africana*) elephants. *General and Comparative Endocrinology*. 2004. 136; 360-370.
30. Menargues MA, Urios V, Limiñana R. Seasonal rhythms of salivary cortisol secretion in captive Asian elephants (*Elephas maximus*). *General and Comparative Endocrinology*. 2012. 176: 259-264.
31. Dathe HH, Kuckelkorn B, Minnermann D. Salivary Cortisol Assessment for detection in the Asian Elephant (*Elephas maximus*): A Pilot Study. *Zoo Biology* .1992. 11:285-289.
32. Swilley A. An examination of salivary cortisol concentrations and behavior in three captive African elephants (*Loxodonta africana*) at Zoo Atlanta. Georgia Institute of Technology. 2008; 98-99.
33. Berkvens CN. Keratin Glucocorticoid Analysis by enzyme Immunoassay in Mammals, Birds and Reptiles (Thesis for degree of Doctor of Veterinary Science in Pathobiology). University of Guelph. Ontario, Canada. 2012
34. Valdespino C. Martínez M. R. García F.L.M., Martínez R. L. E. evaluación de eventos reproductivos y estrés fisiológico en vertebrados silvestres a partir de sus excretas: Evolución de una metodología no invasiva. *Acta Zoológica mexicana*. 2007. 23(3): 151-180.
35. Brown JL, Wemmer CM, Lehnhardt J. Urinary Cortisol Analysis for monitoring Adrenal Activity in Elephants. *Zoo Biology*. 1995. 14; 533-542.
36. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI. México, [consultada en jun 2012]. Disponible en: www.inegi.org.mx

37. García E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). 5ª ed. Offset Larios. México. D.F.
38. Olson D. 2004. Elephant Husbandry Resource Guide-Maintenance. Lawrence Allen Press. USA
39. Catálogo de productos Vacutainer- Becton Dickinson [Homepage on the Internet], <Buenos Aires- Argentina. BD Diagnostic Systems c2004 [consultado jun12, citado 2012 Aug 10]. Disponible en <http://www.sistemasanaliticos.com.ar/pdf/catlogvacutainer2004.pdf>.
40. Cirimele V, Kintz P, Dumestre V, Goullé JP, Ludes B. Identification of ten corticoids in human hair by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. *Foresin Sci Int* .2000; 107; 1381-388.
41. Protocol, CORT-CT2, Cisbio Bioassays-Septiembre 2014, Disponible en URL: <http://www.ria-cis.com/sites/default/files/ressources/02-GB-CORTCT2-Mod20.pdf>
42. Munro, C., Stabenfeldt, G. Development of a cortisol enzyme immunoassay in plasma. *Clinical Chemistry* 31:6, 956
43. Fundamentos y Tipos de Elisa, Protocolos y Técnicas. 2006. Disponible en URL: <http://www.cultek.com/link/link.asp?link=/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-Protocolos.pdf>
44. Yon L, Kanchanapangka S, Chaiyabutr N, Stanczyk F, Meepan S, Lasley B. ACTH stimulation in four Asian bull elephants (*Elephas maximus*): An investigation of androgen sources in bull elephants. *General and Comparative Endocrinology*. 2007. 151; 246-251.
45. Brown JL, Lehnhardt. Serum and urinary hormones during pregnancy and the peri- and postpartum period in an Asian Elephant (*Elephas maximus*). *Zoo Biology*.1995:14;555-594
46. Duer C, Carden M, Tomasi T. Detection of fetal gender differences in maternal serum progesterone concentrations of Asian elephants (*Elephas maximus*). *Animal Reproduction Science*. 2007; 97: 278-283.

47. Oliveira CA, Felipe ECG, Chelini MOM. Serum cortisol and progesterone concentrations in pregnant and non-pregnant Asian Elephants (*Elephas maximus*). *Veterinary Science*. 2008. 84: 361-363.
48. Menargues A, Urios V, Mauri M. Welfare assessment of captive Asian elephants (*Elephas maximus*) and Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) using salivary cortisol measurement. 2008. 17; 305-312.
49. Raul, JS, Cirimele V, Ludes B, Kintz P .Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair. *Clinical Biochemistry*. 2004. 37; 1105-1111.
50. Cooper KA, Harder JD, Clawson DH, Fredrick DL, Lodge GA, Peachey HC, et al. Serum Testosterone and Musth in captive Male African and Asian Elephants. *Zoo Biology*. 1990. 9; 297-306.
51. Jainudeen MR, Katongole CB, Short RV. Plasma Testosterone Levels in Relation to Musth and Sexual Activity in The Male Asiatic Elephant, *Elephas maximus*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1972. 29; 99-103.
52. Hollister SA, Poole JH, Archie EA, Vance EA, Georgiadis N, Moss CJ, et al. Age, musth and paternity success in wild male African elephants, *Loxodonta africana*. *Animal Behaviour*. 2007. 74; 287-296.
53. Meyer JM, Walker SL, Freeman EW, Steinetz BG, Brown JL. Species and fetal gender effects on the endocrinology of pregnancy in elephants. *General and Comparative Endocrinology*. 2004. 138, 263-270.
54. Poole JH, Announcing intent: the aggressive state of musth in African elephants. *Animal Behaviour*. 1989; 37, 140-152.
55. Weilgart L, Whitehead H, Payne K. A colossal convergence: sperm whales and elephants share similar life histories and social structures, which include social females and roving males. *American Scientist*. 1996. 84; 278-287
56. Bates LA, Handford R, Lee PC, Njiraini N, Poole JH, Sayialel K, et al. Why Do African Elephants (*Loxodonta africana*) Simulate Oestrus? An Analysis of Longitudinal Data. *Plos One*. 2010. 5; 1-6.

Anexo 1. Fotografías del exhibidor y entrenamiento de elefantes.



Imagen 1. Elefantes asiáticos (Ramus, Honey, India)



Imagen 2. Ejercicio de cepillado en entrenamiento.



Imagen 3. Ejercicio de limpieza de manos.



Imagen 4. Exhibidor de Elefantes asiáticos.

Anexo 2. Cuadro de rutina diaria, alimentación y croquis de instalaciones.**Cuadro 1****Rutina diaria de ejercicios para elefantes asiáticos; Africam Safari.**

Elefante	L	M	M	J	V	S	D
 Ramus	Palpación. Limpieza. Boca.	Cepillado. Colmillo. Tubo. Sonda. Gotas. Prensa. Brazaletes. Limpieza. Amés. Sangre. Boca. Recoger. Piso.	Palpación. Limpieza. Boca. Piso.	Boca. Reversa. Limpieza. Tina. Encadenado.	Palpación. Limpieza. Boca. Piso.	Rutina Libre	Rutina Libre.
 Honey	Palpación. Cepillado. Oreja. Limpieza. Boca. Piso.	Sangre. Tubo. Sonda. Gotas. Prensa. Limpieza. Brazaletes. Recoger. Amés. Boca.	Palpación. Cepillado. Oreja. Limpieza. Boca. Encerrar.	Oreja. Limpieza. Tina. Boca. Encadenado.	Palpación. Oreja. Limpieza. Boca. Piso.	Rutina Libre.	Rutina Libre.
 India	Cajón. Limpieza. Tina. Boca. Piso.	Cajón. Limpieza. Brazaletes. Recoger. Amés. Sangre. Gotas. Boca.	Cajón. Limpieza. Tina. Boca.	Cajón. Limpieza. Boca. Piso.	Cajón. Limpieza. Tina. Boca.	Rutina Libre	Rutina libre.

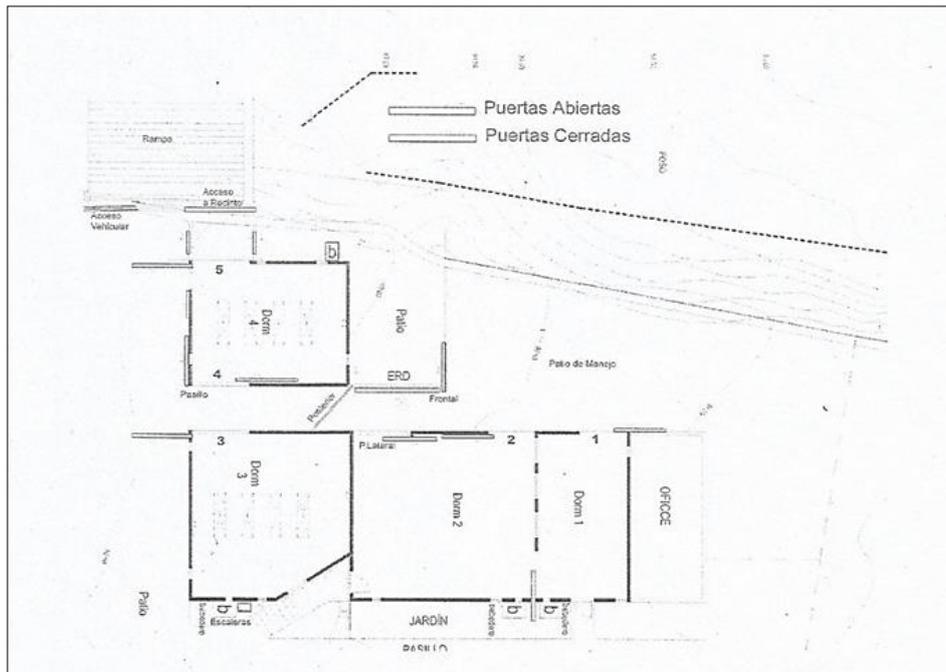


Imagen 5. Croquis de Instalaciones de elefantes asiáticos.

Cuadro 2

Dieta diaria por elefante asiático.

Alimento diario.	Cantidad por Individuo en Kg.
Heno de alfalfa.	35
Heno de Avena.	25
Manzanas enteras.	1.4
Plátanos enteros.	0.6
Melones enteros en trozos.	1.4
Elote blanco.	1.5
Caña de azúcar.	1.72
Purina Omolin 13®	7
Cereal de Avena natural.	2

Cuadro 3**Soluciones Buffer para ELISA**

Buffer	Función
Amortiguador de carbonatos (0.05M, pH9.6).	Adhiere el anticuerpo a la fase sólida.
Amortiguador de fosfato salino (PBS) (0.1M, pH 7)	Amortiguador del ensayo para formación de inmunocomplejos.
Solución de lavado (Tween 20®, Cloruro de Sodio)	Quita lo que no se unió al anticuerpo.
Solución de sustrato para ABTS (se preparan 10mL por placa), a partir de las siguientes soluciones: <ul style="list-style-type: none"> a) Solución de citrato (0.05,pH 0.4) b) Solución de ABTS (40mM, pH 6) c) Solución de agua oxigenada (0.5M (2%)). 	Revela la reacción.
Solución de ácido hidrofúrico al 48%, NAOH 5N, pH4; EDTA 1M.	Detiene la reacción.

Anexo 3. Fotografías de toma de muestras y cambios fisiológicos del Musth en el macho.



Imagen 6. Toma de muestra de pelo con tijeras, del lomo del elefante.



Imagen 7. Muestra de pelo en bolsas ziploc.



Imagen 8. Ramus-Musth: secreción de glándula temporal, extendida hasta las mejillas.

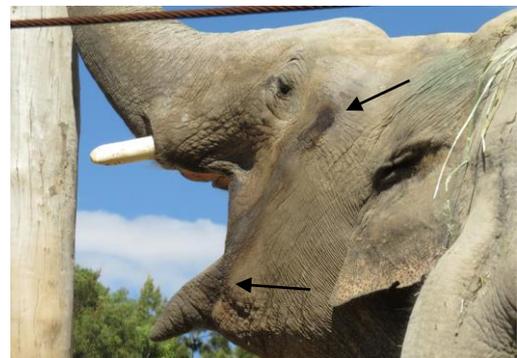


Imagen 9. Secreción de glándula temporal, extendida hasta la barbilla.



Imagen 10. Manchas de orina afectando la parte interna de las piernas.



Imagen 11. Honey y Ramus (Musth).