



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

MAESTRIA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

“CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL DE TESTOSTERONA FECAL EN EL
ZACATUCHE (*Romerolagus diazi*) MANTENIDO EN CAUTIVERIO”

TESIS

(IDONEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS)

QUE PARA OBTENER EN GRADO DE:

Maestro en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

M.V.Z. Alberto Olascoaga Elizarraraz

COMITÉ TUTORAL

Director:

Dr. Alejandro Córdova Izquierdo

Asesor:

MVZ M. en C. Saúl Soto Mendoza

Asesor:

MVZ M. en C. Javier Ojeda Chávez

MÉXICO , D.F. Julio de 2011.

DEDICATORIA

A mi mamá, por todo su apoyo, dedicación, enseñanzas y entregarme su vida sin condiciones y brindarme las herramientas necesarias para mejorar día a día y llegar a ser quien soy.

A mi familia, por estar siempre ahí.

A mi "Sensei", mi más grande amigo, por tus enseñanzas y haberme impulsado de una u otra manera a mejorar y emprender nuevos planes. Mi infinito agradecimiento. Ocupas un lugar muy valioso en mi vida.

A mis amigos, en especial a Lulú, Erika, Gaby, Paulina, Everardo, por su apoyo, por estar a mi lado a todo momento. Son una parte muy importante e irremplazable en mi vida.

A mis compañeros, por su apoyo, dedicación y enseñanzas, es un placer trabajar con ustedes.

A la fauna silvestre, a la que decidí dedicarle mi vida.

Especialmente a ti, sin ti nada sería posible...

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco por la formación académica.

A la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre y a todo su personal por las facilidades otorgadas para la realización del presente estudio.

Al Zoológico de Chapultepec y a todo su personal por el apoyo para la utilización de sus instalaciones y ejemplares durante el desarrollo de la investigación.

A mis asesores el Dr. Alejandro Córdova y los M. en C. Saúl Soto y Javier Ojeda Chávez, gracias por su apoyo, asesoría y consejos, sin ustedes no habría sido posible.

Al Dr. Héctor Castillo por su valiosísimo apoyo para el análisis estadístico.

A los pasantes del Servicio Médico, en especial a Paola, Miryam y Angélica por su invaluable apoyo para el procesamiento de las muestras.

CONTENIDO

1. Introducción	1
- 1.1 El Zacamote.....	1
1.1.1 Taxonomía.....	1
1.1.2 Los Lagomorfos.....	1
1.1.3 Ecología.....	2
1.1.4 Biología.....	3
1.1.5 Conservación.....	5
- 1.2 Endocrinología Reproductiva y Evaluación Reproductiva de Machos..	7
1.2.1 Hormonas Reproductivas.....	7
1.2.2 Testosterona.....	11
- 1.3 Monitoreo Reproductivo.....	13
1.3.1 Medición de Hormonas.....	13
1.3.2 Principios del Inmunoanálisis.....	13
1.3.3 Técnicas de Medición de Hormonas.....	14
- 1.4 Técnicas de Reproducción en Fauna Silvestre.....	15
1.4.1 Monitoreo no Invasivo..	16
2. Justificación	19
3. Objetivos	20
4. Hipótesis	21
5. Material y Métodos	22
5.1 Animales.....	22
5.2 Procesamiento de las Muestras.....	23
5.3 Registro de Nacimientos.....	24
5.4 Análisis Estadístico.....	24
6. Resultados	25
7. Discusión	29
8. Conclusiones	31
9. Referencias	32

ABSTRACT

The Volcano rabbit (*Romerolagus diazi*) is an endemic species of Mexico, restricted to the central part of the Mexican transvolcanic belt and it is considered an endangered species. It remains in constant state of sexual acceptance once it reaches puberty. It has been observed that the mating can occur anytime, as they apparently show induced ovulation. Although they can mate all year long, reproductive activity is more intense during the summer and decrease during the winter. This study describes the pattern of fecal testosterone secretion of eleven volcano rabbits adult males kept in captivity at Chapultepec Zoo. Hormone was quantified by ELISA, during two periods; Fall – Winter (October to February) and Spring – Summer (March to July). The concentration of fecal testosterone of zacatuche during the evaluation period was 111.01 ± 27.31 ng/g of dry feces, showing a higher secretion in the Fall – Winter period ($P < 0.05$). It was observed that testosterone levels are variable throughout the year, but always measurable and greater than zero, so reproduction is not suppressed although it does not show a defined reproductive stage. These findings are consistent with the values found in domestic rabbit's blood. The findings of the present work are the first reported for the species and are an important approach to the understanding of their reproductive physiology. Moreover, it was found that the use of non-invasive methods such as measuring fecal steroids, is a suitable technique for monitoring reproductive activity in the volcano rabbit.

KEY WORDS: Volcano rabbit, Reproduction, Sexual hormones, Fecal steroids, Testosterone, ELISA, Non-invasive techniques.

RESUMEN

El zacatuche (*Romerolagus diazi*) es una especie endémica de México, en peligro de extinción, de distribución restringida al Eje Neovolcánico Transversal. No presenta una etapa reproductiva definida sino que permanece en estado constante de aceptación sexual una vez alcanzando la pubertad. Se observó que los acoplamientos pueden realizarse en cualquier momento, ya que aparentemente la ovulación es inducida. El periodo reproductivo comprende todo el año, aunque es más intenso durante el verano y más leve durante el invierno. El presente estudio describe el patrón de secreción de testosterona fecal de once individuos machos adultos de zacatuche mantenidos en cautiverio en el Zoológico de Chapultepec "Alfonso L. Herrera" cuantificado mediante la prueba de ELISA, durante dos periodos; Otoño – Invierno (octubre a febrero) y Primavera – Verano (marzo a julio). La concentración de testosterona en heces de zacatuche durante el periodo de evaluación fue de 111.01 ± 27.31 ng/g de heces secas, presentando una mayor secreción de la hormona en el periodo de Otoño – Invierno ($P < 0.05$). Se observó que los niveles de testosterona son inconstantes a lo largo del año, pero siempre medibles y superiores a cero, por lo que no se suprime la reproducción y no muestra una etapa reproductiva definida. Estos hallazgos son congruentes con los valores encontrados en sangre en conejos domésticos. Los resultados encontrados en este estudio, son los primeros reportados para la especie y constituyen un importante acercamiento al entendimiento de su fisiología reproductiva. Por otra parte, se comprobó que el uso de metodologías no invasivas como la medición de hormonas esteroidales en heces, es una técnica adecuada para el monitoreo de la actividad reproductiva del zacatuche.

PALABRAS CLAVES: Zacatuche, reproducción, hormonas sexuales, esteroides fecales, testosterona, ELISA, monitoreo no invasivo.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Identificación de los machos en donde se midieron los niveles de testosterona.

Cuadro 2: Concentraciones de testosterona por semana y por individuo para el periodo Otoño – Invierno.

Cuadro 3: Concentraciones de testosterona por semana y por individuo para el periodo Primavera – Verano.

Cuadro 4: Número de crías registradas por mes durante el periodo de estudio.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Concentración de testosterona en heces de Zacatuche en los periodos de Otoño-Invierno (1) y Primavera-Verano (2).

Figura 2: Concentración de testosterona en heces durante el periodo Otoño – Invierno.

Figura 3: Concentración de testosterona en heces durante el periodo Primavera - Verano.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El Zacatucho

El Zacatucho (*Romerolagus diazi*), también conocido como teporingo, tepolito o conejo de los volcanes, es una especie endémica mexicana de una zona pequeña restringida a las montañas centrales del Eje Neovolcánico Transversal.

Es una especie asignada a un género monotípico y considerada primitiva por sus características óseas, debido a esto se ha considerado cercano a las pikas (*Ochotona*). Su apariencia física lo identifica con cualquier otro conejo, sin embargo, los factores cromosómicos y reproductivos lo relacionan más con las liebres (*Lepus*) que con los conejos (Cervantes y González, 1996).

1.1.1 Taxonomía.

Clase: *Mammalia*

Orden: *Lagomorpha*

Familia: *Leporidae*

Género: *Romerolagus*

Especie: *Romerolagus diazi*

1.1.2 Los Lagomorfos

Del total de especies de lagomorfos de nuestro país, el 57% (cinco de conejos y tres de liebres), son endémicos de México. En general, las áreas de distribución de los lepóridos mexicanos son muy restringidas, como es el caso del zacatucho (Cervantes y González, 1996).

El zacatucho pertenece al orden *Lagomorpha* (*lagus*=conejo, *morpha*=forma; forma de conejo), junto con el resto de especies de conejos, liebres y pikas. México es el país más rico del Continente Americano en cuanto a diversidad de lagomorfos ya que posee 14 especies diferentes de conejos y liebres. Cuenta con nueve diferentes especies de conejos, ocho conocidas científicamente como *Sylvilagus* y una más como *Romerolagus*, más cinco especies de liebres del género *Lepus* (Romero y Velázquez, 1994).

1.1.3 Ecología

1.1.3.1 Distribución

El zacatuche es uno de los mamíferos con una distribución más restringida de todos los mamíferos en México. Sus poblaciones se encuentran en las montañas de la parte sur del Valle de México (Cervantes *et al.*, 1990).

Históricamente se había reportado en el volcán Iztaccihuatl y en el Popocatepelt y en elevaciones adyacentes dentro de los estados de México, Puebla y Distrito Federal. A pesar de las recolectas realizadas, a finales de la década de los 1980's, no se sabía con precisión su área total de distribución. Velázquez y colaboradores en 1996 indican que Hoth y colaboradores en 1978, encontraron al zacatuche en tres áreas aisladas dentro de la zona central del Eje Neovolcánico Transversal: La Sierra Nevada, el volcán Tláloc y el volcán Pelado, sin embargo, no lo encontraron en el Nevado de Toluca, donde se había reportado con anterioridad.

Al inicio de la década de los 90's, se encontró en las Sierras Chichinuatzin y Ajusco y en la Sierra Nevada, dentro de las Sierras Chichinuatzin y Ajusco se restringió a los volcanes Pelado y Tláloc, dentro de la Sierra Nevada se encontró en los volcanes Popocatepelt, Papayo e Iztaccihuatl (Velázquez *et al.*, 1996).

Actualmente se considera que se encuentra en un área fragmentada en 16 zonas en los estados de Puebla, México y Distrito Federal: Sierra Chichinuatzin, Ajusco y Sierra Nevada. Dentro del Distrito Federal la zona de distribución es aproximadamente de 140 mil Ha (DGZCM, 2006).

Los conejos y liebres de México tienen una gran importancia ecológica, ya que junto con los roedores representan el alimento de otros animales como coyotes, comadrejas, cacomixtles, lince, halcones, águilas, búhos y algunas serpientes. La alimentación de conejos y liebres incluye pastos, hierbas, arbustos y algunas partes de los árboles, con lo que ocasionan cambios importantes en las plantas permitiendo el control y desarrollo de las poblaciones de éstas. Así mismo, contribuyen a la dispersión de varias especies de plantas porque pueden consumir sus semillas en un lugar y defecarlas en otro sitio diferente (Romero y Velázquez, 1994).

No existe un censo reciente, se calcula que la población actual es de 5000 individuos distribuidos en un área de 386.5 km². Dentro del área de distribución, existen cinco zonas consideradas como Áreas Naturales Protegidas, las cuales en su mayoría carecen de un programa de manejo y de infraestructura necesaria para su conservación (DGZCM, 2006).

1.1.4 Biología

1.1.4.1 Morfología

Tiene un tamaño relativamente pequeño en comparación con los otros miembros de la familia *Leporidae*, sus miembros son cortos; las orejas son pequeñas y redondas; la cola es tan pequeña que casi resulta invisible. El pelaje es bastante corto y denso; de color amarillo mezclado con negro en el dorso y en las áreas laterales. Los lados de la nariz y la región orbital son de color ocre; la base de los oídos de color ocre metálico; debajo de la garganta el color es ocre mezclado con el gris oscuro-plateado. Tiene un cuadro de pelo amarillento en la nuca, entre la base de las orejas. Los valores promedio y rangos de las medidas del cuerpo para los adultos son: longitud total 270-315mm, longitud de cabeza 18-31 mm, longitud de pata trasera 42-55 mm, longitud de la oreja 40-45 mm y peso 380-600 g (Cervantes y Martínez, 1996).

1.1.4.2 Hábitos

La actividad del zacatuche es principalmente diurna y crepuscular, así como durante todo el día en los días nublados. Mientras está activo se mueve a lo largo de caminos específicos o túneles entre el zacatón (gramíneas amacolladas). Permanecen en estos túneles, aunque habitan también en túneles subterráneos abandonados por otros mamíferos, útiles refugios para protegerse de los depredadores en zonas expuestas (Matsusaki *et al.*, 1996).

Se establece y vive en grupos de dos a cinco individuos como una forma de organización social bien definida, presenta conductas de agresión como morder y expulsar a otros individuos en defensa del territorio o de los compañeros. Tienen un ámbito hogareño no mayor a 2500 m² (DGZCM, 2006).

El zacatuche utiliza frecuentemente vocalizaciones agudas y fuertes, las que muy posiblemente tienen como objetivo informar a otros individuos sobre la presencia de depredadores. Los zacatuches y las pikas son los únicos lepóridos del mundo con capacidad de vocalizar, dichas vocalizaciones tienen como objetivo el informar de alertas y además como parte normal de sus interacciones sociales (Romero y Velázquez, 1994).

1.1.4.3 Alimentación

Cervantes y Martínez (1992), mencionan que el zacatuche consume 22 especies de plantas diferentes, principalmente de las familias *Poaceae*, *Betulaceae*, *Loganiaceae sp*, *Lamiaceae sp* y *Geraniaceae sp*. Los más consumidos son *Muhlenbergia sp*, *Stipa sp* y *Festuca sp*. Se alimentan principalmente de gramíneas amacolladas (pastos), denominados localmente macollas o zacatonos. Habitualmente consumen las partes

cercanas a la base de las hojas o las partes bajas del zacatón. Además de los pastos, consumen hierbas, hojas jóvenes de hierbas espinosas, semillas y corteza de árboles de aile (*Alnus sp.*), también se alimentan en campos de cultivo y comúnmente consumen el follaje de las plantas jóvenes del maíz (*Zea mays*) y avena (*Avena sativa*) (Romero y Velázquez, 1994).

1.1.4.4 Reproducción

1.1.4.4.1 Dimorfismo Sexual

Aunque estadísticamente Cervantes (1992), no encontró diferencia significativa entre ambos sexos en relación al tamaño. Se ha visto que en los lagomorfos adultos existe dimorfismo sexual, generalmente las hembras son más grandes que los machos. En el zacatuche, se nota a simple vista éste fenómeno. Las hembras en promedio miden 285.1 mm y pesan en promedio 535.9 g, a diferencia de los machos con una longitud de 268.3 mm y un peso de 417.4 g (Cervantes, 1992).

1.1.4.4.2 Pubertad y Madurez sexual.

La edad de la pubertad no ha sido determinada claramente. Matsuzaki y colaboradores (1996), encontraron que el peso tanto de hembras como de machos se estabiliza entre los 400-450 g a los cinco meses de edad, lo que fue considerado como criterio para iniciar la reproducción. El primer parto se observó a los siete meses de edad. La primera monta con éxito fue observada a la edad de cinco a seis meses. Así mismo, se observó que los acoplamientos pueden realizarse en cualquier momento, ya que aparentemente la ovulación es inducida.

1.1.4.4.3 Machos Reproductivos

Los zacatuches machos sexualmente activos se caracterizan por la localización de los testículos en el interior del escroto, como en otros conejos, y por el carácter extrusible del glande del pene. Se encontró que en promedio, el testículo derecho tiene 17.6 mm de longitud por 9.7 mm de ancho, mientras que el izquierdo tiene 17.4 mm de longitud y 9.7 mm de ancho. En la mayoría de los lagomorfos adultos, los testículos descienden de la cavidad abdominal al escroto sólo durante la estación reproductiva correspondiente, pero en el zacatuche se encontró que permanecen escrotados todo el año. No se encontró relación alguna entre el tamaño de los testículos y del individuo con la época del año (Cervantes, 1982).

1.1.4.4.4 Época Reproductiva

No presenta una etapa reproductiva definida sino que permanece en estado constante de aceptación sexual una vez en pubertad. Se observó que los acoplamientos pueden realizarse en cualquier momento, ya que aparentemente la ovulación es inducida. El periodo reproductivo comprende todo el año, aunque es más intenso durante el verano y menor durante el invierno (Cervantes y Martínez, 1996). Se ha observado en laboratorio, que se reproduce todos los meses del año, excepto en mayo, sin embargo, los gazapos nacidos en junio son el resultado de acoplamientos realizados en mayo, por lo que el zacatuche al igual que el conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) puede reproducirse todo el año. Lo mismo se ha visto en poblaciones silvestres (Matsuzaki *et al.*, 1996).

1.1.4.4.5 Cortejo y Apareamiento

Durante el proceso de cortejo, la conducta del zacatuche difiere mucho a las pikas y los conejos domésticos. Cuando se encuentran, el macho se aproxima a la hembra para olfatearla, ésta se desplaza varios pasos en dirección contraria, lo cual se repite varias veces. A la mitad de estas aproximaciones, la hembra se toma hacia el macho repentinamente y finge atacar, saltando sobre la cabeza del macho, el cual se torna hacia la hembra y se aproxima para continuar con el cortejo. Finalmente la hembra se detiene, se extiende estirando las extremidades anteriores y adopta una postura de sumisión (lordosis). La cópula se lleva a cabo en segundos y se caracteriza por la caída del macho hacia la parte trasera de la hembra. Es comúnmente observada la pelea o evasión, en donde la hembra puede atacar al macho hasta causarle lesiones graves incluso fatales (Matsuzaki *et al.*, 1996).

1.1.5 Conservación

1.1.5.1 Estatus

El zacatuche se encuentra enlistado en el Apéndice I de la Convención Internacional sobre el Comercio de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), así como en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) como especie en peligro de extinción. En nuestro país se encuentra en la misma categoría, protegido por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001.

El principal problema que enfrenta, es la fragmentación y disminución del hábitat. Velázquez y colaboradores (1996), determinaron que el tipo de hábitat más empleado es el formado por *Pinus sp.* y *Festuca tolucensis*, este se encuentra en una situación bastante difícil, ya que por un lado ha sufrido y sufre alteraciones importantes por las actividades humanas y por el otro no presenta características importantes para ser

considerado dentro de las áreas prioritarias para conservación en los actuales planes nacionales de medio ambiente.

Las principales actividades de perturbación del hábitat son (López-Paniagua *et al.*, 1996);

- a) Desarrollo urbano.
- b) Pastoreo de ganado vacuno y ovino extensivo e intensivo.
- c) Deforestación, controlada e ilegal.
- d) Incendios provocados y naturales.
- e) Extracción de zacatones y tierra.
- f) Empleo de fertilizantes, herbicidas y plaguicidas (problema potencial, no se conocen aún los efectos sobre el zacatucho).
- g) Cacería furtiva.

1.1.5.2 Programas de conservación

La conservación de la biodiversidad presupone el mantenimiento de la variabilidad genética de las especies y los ecosistemas. Cuando se define a una especie como prioritaria para ser conservada, en realidad se está hablando de mantener sus poblaciones en el hábitat natural.

La utilización del zacatucho es de gran importancia para la conservación del hábitat y de una gran cantidad de especies que dependen de éste para su sobrevivencia. Estas áreas son también una zona significativa para el mantenimiento ecológico de los sistemas naturales que rodean a la ciudad de México. Estos bosques son cruciales como zonas de captación de agua, pudiendo ser aprovechados de manera planificada y controlada como un recurso renovable para los habitantes locales. Además, otras situaciones importantes para la conservación del zacatucho son: carencia de un plan de manejo y conservación de la especie y las áreas naturales protegidas a nivel nacional e internacional, falta de educación y conciencia de habitantes locales y regionales, y poca variedad y efectividad de alternativas de desarrollo para los habitantes locales (DGZCM, 2006).

El Grupo Especialista en Lagomorfos de la International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, considera que la conservación y el manejo de lagomorfos a nivel mundial debe de contemplar el manejo del hábitat, programas de reintroducción y la regulación y monitoreo de poblaciones silvestres.

1.2 Endocrinología Reproductiva y Evaluación Reproductiva de Machos

La endocrinología de la reproducción se refiere a la bioquímica, funcionamiento, farmacología y biología molecular de las hormonas y sus receptores. Las hormonas sintetizadas y secretadas por glándulas endocrinas son transportadas en el aparato circulatorio para estimular, inhibir o interactuar con la actividad funcional o el órgano blanco específicos y producir una amplia variedad de respuestas fisiológicas (Hafez, 1996).

1.2.1 Hormonas Reproductivas

Las hormonas reproductivas se derivan principalmente de cuatro sistemas básicos (Hafez, 1996):

- 1) Diversas zonas del hipotálamo.
- 2) Lóbulos anterior y posterior de la hipófisis.
- 3) Gónadas: ovarios y testículos.
- 4) Útero y placenta; así como las glándulas adrenales.

El hipotálamo, que ocupa sólo una porción muy pequeña del encéfalo, consiste en la región del tercer ventrículo, que se extiende desde el quiasma óptico hasta los cuerpos mamilares. Es un centro neuroendocrino importante que libera varias hormonas. El hipotálamo regula diversos procesos automáticos vitales, como apetito, frecuencia cardíaca, temperatura, comportamiento sexual y actividad neuroendocrina. Diversos centros hipotalámicos integran señales fisiológicas en el cuerpo como los mensajes del sistema nervioso central, estado metabólico, actividad funcional de glándulas blanco y ambiente interno. El hipotálamo reacciona entonces produciendo hormonas liberadoras específicas; de esta manera actúa como centro de procesamiento e integración de la información recibida y la traduce en una señal neurohormonal que evoca respuestas fisiológicas. Entre las principales hormonas liberadas por el hipotálamo y que regulan la reproducción se incluyen hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y factor inhibidor de prolactina. Es también fuente de oxitocina y vasopresina, las hormonas almacenadas en el lóbulo posterior de la hipófisis. La función del hipotálamo en la reproducción incluye tanto el efecto desencadenante de hormonas esteroideas sobre el comportamiento sexual, como el control simultáneo de la secreción de gonadotropinas hipofisiarias (Hafez, 1996).

La hipófisis se localiza en la silla turca, una depresión ósea en la base del encéfalo. Esta glándula se subdivide en dos partes anatómicas bien diferenciadas: lóbulo anterior y lóbulo posterior. El lóbulo anterior (llamado también hipófisis anterior o adenohipófisis) tiene cinco tipos celulares distintos que secretan las hormonas somatotropina u hormona del crecimiento (GH), hormona adrenocorticotrópica, prolactina, hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) (Hafez, 1996).

La FSH estimula el crecimiento y maduración del folículo ovárico y en presencia de LH estimula la producción de estrógenos por ovario y testículo. En el macho actúa sobre las células germinales de los túbulos seminíferos, también es la encargada de la espermatogénesis hasta la fase de espermatoцитos secundarios, tras la cual los andrógenos controlan las etapas finales. La LH, actúa conjuntamente a la FSH para inducir la secreción de estrógeno a partir del folículo ovárico, en el macho, actúa sobre las células intersticiales (células de Leydig) donde se produce andrógenos (Hafez, 1996).

1.2.1.2 Hormonas Esteroides Gonadales

Las hormonas esteroides tienen un núcleo básico común, el núcleo de ciclopentanopenhidrofenantreno, consistente en tres anillos fenantreno (de seis miembros) completamente hidrogenado (perhidro), designados *A*, *B* y *C*, además de un anillo ciclopentano (cinco miembros), designado *D* (Hafez, 1996). Todos los esteroides pertenecen a una clase química de sustancias conocidas como terpenoides o terpenos (Norman y Litwack, 1997).

En los mamíferos, existen seis familias de hormonas esteroides que pueden ser clasificadas estructural o biológicamente. Las cuales son los estrógenos (esteroides sexuales femeninas), andrógenos (hormonas esteroides masculinas), progestágenos, mineralocorticoides, glucocorticoides y vitamina D con sus metabolitos. También, los ácidos biliares están estructuralmente relacionados con el colesterol y por lo cual constituyen el séptimo miembro de la familia de los esteroides. Todos los esteroides están biológicamente derivados del colesterol (Norman y Litwack, 1997).

Un esteroide de 18 carbonos tiene actividad de estrógeno, uno de 19 carbonos tiene actividad de andrógeno y uno de 21 carbonos tiene propiedades de progestágeno. El colesterol, un esteroide de 27 carbonos, se transforma en pregnenolona (21 carbonos) cuando se escinde su cadena lateral. La pregnenolona es convertida luego en progesterona, que a su vez se convierte en un andrógeno y un estrógeno (Hafez, 1996).

Las hormonas esteroides causan una gran variedad de respuestas fisiológicas en los tejidos blanco, como división celular, diferenciación tisular, crecimiento, síntesis de proteínas específicas y contracción de músculo liso. Estas respuestas causan diversos procesos reproductivos, como comportamiento sexual, receptividad sexual, etc. (Hafez, 1996).

1.2.1.2.1 Biosíntesis de Colesterol

La mayoría de los organismos tiene la capacidad enzimática para la biosíntesis del colesterol. Los principales sitios de su producción son la piel, hígado y la mucosa intestinal, también se encuentran cantidades medibles de su producción en los pulmones, riñones, glándulas adrenales, músculos, cerebro y tejido adiposo (Norman y Litwack, 1997).

El colesterol de 27 carbonos, es derivado del acetato o acetyl CoA. Los primeros precursores del esteroide son hidrosolubles, después de la producción del escualeno; los precursores del colesterol se hacen marcadamente insolubles en agua. La actividad enzimática microsomal entre el escualeno y el colesterol es estimulada por la adición de proteínas acarreadoras del esteroide (Norman y Litwack, 1997).

1.2.1.2.2 Biosíntesis de esteroides

Los principales sitios para la síntesis de las cinco clásicas hormonas esteroides (estrógenos, progestágenos, glucocorticoides y mineralocorticoides) son la corteza adrenal, ovarios y testículos. Así mismo durante la gestación, la placenta puede servir como recurso de esteroides. Los sitios para la síntesis de la sexta clase de esteroides; la prohormona vitamina D y sus metabolitos, son la piel, el hígado y los riñones. Los ácidos biliares; la séptima clase de esteroides, no tienen actividad hormonal y son principalmente producidos en el hígado (Norman y Litwack, 1997).

Para la producción de esteroides interviene un total de seis enzimas citocromo P450, las cuales son producidas en la corteza adrenal, ovarios y testículos (Norman y Litwack, 1997). Estas enzimas se encuentran dentro de dos clases de proteínas, las citocromos P450 ligadas a proteínas y las hidroxysteroides deshidrogenasas (Payne y Hales, 2004).

1.2.1.2.3 Síntesis de Pregnenolona y Progestágenos

La conversión de colesterol a pregnenolona es llevada a cabo por una enzima divisoria de un lado de la cadena o P450_{scc}. La cual es activada por una proteína transportadora de colesterol conocida como proteína reguladora aguda de esteroides (StAR); la cual es un modulador esencial para este proceso (Norman y Litwack, 1997).

Una vez que es producida la pregnenolona puede sufrir una o dos conversiones; ya sea por una 17 α -hidroxilación en las adrenales para convertirse en cortisol o ser convertida en progesterona; la cual es producida en el cuerpo lúteo y placenta. La progesterona también es un intermediario en la síntesis de aldosterona en la adrenales (Norman y Litwack, 1997).

1.2.1.2.4 Síntesis de andrógenos

Los andrógenos son esteroides de 19 carbonos, en los machos son producidos en los testículos y en las hembras en los ovarios y placenta. Los principales son la 5 α -dihidrotestosterona, testosterona, androstenediona, 4-androsterona-3,17-diona, androsterona y dehidroepiandrosterona (Norman y Litwack, 1997).

Existen dos caminos generales para la formación de testosterona de pregnenolona, que son Δ^5 o Δ^4 . Aunque el principal camino parece ser la combinación de ambos. Por lo cual, de pregnenolona se convierte en 17 α hidroxipregnenolona después a 17 α hidroxiprogesteroa seguida de la androstenediona y finalmente a testosterona. La forma hormonalmente activa en machos es la 5 α -dihidrotestosterona, producida en testículos, piel y glándulas submaxilares pero es formada especialmente en glándulas como la próstata (Norman y Litwack, 1997).

1.2.1.2.5 Síntesis de estrógenos

La conversión de androstenediona o testosterona en estrógenos (18 carbonos) es dada en los ovarios; tanto en el folículo como en el cuerpo lúteo y en la placenta. En machos bajo algunas circunstancias pueden formar cierta cantidad de estrógenos. Tanto en macho como en hembras se forman una pequeña cantidad de estrona en la glándulas adrenales. Los principales esteroides con actividad estrogénica son la estra-3,17 β -diol, estra-3,16 α ,17 β -triol y estrona (Norman y Litwack, 1997).

1.2.1.2.6 Transporte plasmático, metabolismo y excreción de las hormonas esteroides

La concentración en plasma depende de tres factores, la tasa de biosíntesis del esteroide, la tasa de inactivación por catabolismo de estos y la unión de estos a las proteínas acarreadoras, las cuales se encargan del transporte de las hormonas y son específicas para cada una de éstas con excepción de la aldosterona que puede circular

libre en el plasma, éstas proteínas son producidas en el hígado. Aparentemente, el endotelio vascular de los capilares presenta fenestraciones por las que las proteínas transportadoras pueden salir para llevar las hormonas a sus células blanco (Norman y Litwack, 1997).

Las reacciones catabólicas ocurren principalmente en el hígado y son de tipo oxidativo. Un incremento en su solubilidad en agua es efectuado por la conjugación de los esteroides con sulfatos o gluconatos y de esta manera son excretados en grandes cantidades por la orina (Norman y Litwack, 1997).

1.2.2 Testosterona

La testosterona es uno de los esteroides conocidos como andrógenos. En el macho, los andrógenos son producidos por las células intersticiales; conocidas como células de Leydig, las cuales forman parte de los testículos, salvo una pequeña cantidad producida por la corteza suprarrenal. Así mismo, en las células de Sertoli se produce la inhibina. La síntesis de testosterona e inhibina, está regulada tanto por LH como FSH, las cuales se sintetizan y almacenan en la adenohipofisis. La liberación adenohipofisiaria de LH y FSH se regula por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Los neurotransmisores (aminas biogénicas) en el sistema nervioso central controlan la producción de GnRH, secretada y liberada en pulsos. La GnRH busca los receptores proteínicos en la membrana plasmática de células gonadotropas y provoca la secreción episódica normal de LH y de FSH. La LH estimula a las células de Leydig para secretar testosterona. La FSH se fija y activa las células de Sertoli para secretar una hormona polipeptídica, la inhibina, que induce la maduración y crecimiento de las células tubulares y la aromatización de andrógenos en estradiol, también provoca que las células de Sertoli en ratones, cobayos, cerdos, conejos, ratas y ovinos secreten proteína fijadora de andrógenos (ABP). Por fijación a la testosterona presente en el líquido de los túbulos seminales, ABP inhibe su absorción por las células en la pared de los conductos y asegura el aporte de testosterona al epidídimo. Además FSH apoya a las células de Sertoli para la maduración morfológica de espermátides en espermatozoides (Ruckebusch *et al.*, 1994).

El eje hipotalámico-adenohipofisiario-testicular es un sistema de circuito cerrado, esto es, un sistema en el cual el control depende de la producción de hormonas. Tiene un sistema de retroalimentación negativa en el que las hormonas testiculares deprimen la secreción adenohipofisiaria de LH y FSH. La retroalimentación negativa de testosterona en GnRH hipotalámica la hace el primer regulador de la secreción de gonadotropina, mientras que la otra hormona testicular, inhibina, suprimiría principalmente la liberación

de FSH. La testosterona disminuye la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH (Ruckebusch *et al.*, 1994).

La testosterona que no alcanzó a fijarse en los tejidos es rápidamente convertida, principalmente en el hígado, a androstenediona y dehidroandrostenediona y simultáneamente conjugado a glucuronatos o sulfatos para ser excretados dentro del intestino vía bilis o en la orina a través de los riñones (Guyton y Hall, 2006)

Los andrógenos desarrollan y mantienen los caracteres sexuales secundarios en los machos. Son los responsables de la libido (deseo sexual). Las glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales) son dependientes de andrógenos (morfológica y fisiológicamente). Los andrógenos también tienen un papel muy importante en la presentación del comportamiento sexual (Nalbandov, 1976).

La testosterona activa las células blanco libre de 5-alfa-reductasa para inducir efectos androgénos (características masculinas) y anabólicos (promotor del crecimiento). Además de estimular la diferenciación de los conductos de Wolff durante la embriogénesis, la testosterona participa de manera directa en el crecimiento del pene y de las glándulas accesorias y para el inicio y conversión de la espermatogénesis. Otras acciones androgénas que se le atribuyen incluyen agresividad, conducta sexual (libido, erección), presentación de espículas en el pene en felinos o de hueso peneano de caninos, crecimiento de melena (en bisontes, equinos, leones) y crecimiento y diseminación (calcificación) de astas en venados machos. Las acciones anabólicas de la testosterona incluyen proliferación de laringe y riñones así como también masa muscular. La testosterona explica los efectos bioquímicos tales como retención de nitrógeno y anabolismo proteínico, hematopoyesis y supresión de síntesis hepática de proteínas plasmáticas portadoras (por ejemplo, proteína portadora de cortisol, globulina fijadora de esteroides sexuales, globulina fijadora de tiroxina). La producción de feromonas masculinas es estimulada por la testosterona (Ruckebusch *et al.*, 1994).

Con relación a ciertas células blanco, la testosterona no es la forma activa de la hormona, sino prohormona. En estos tejidos blanco la testosterona debe convertirse, mediante una 5-alfa-reductasa, en la más activa dihidrotestosterona, o aromatizada en estradiol. La dihidrotestosterona sirve como el mediador intracelular de la mayor parte de las acciones de la hormona. La potencia androgénica mayor de dihidrotestosterona se explica por su fijación más estrecha a la proteína citoplásmica receptor andrógeno que la testosterona. La dihidrotestosterona interviene durante la vida fetal para la diferenciación del túbulo genital, protuberancias genitales, pliegues genitales y seno urogenital al pene, escroto, uretra peneana y próstata. En la pubertad, induce el crecimiento del escroto y próstata, mientras que estimula la secreción por la próstata en animales adultos machos (Ruckebusch *et al.*, 1994).

1.3 Monitoreo Reproductivo

1.3.1 Medición de hormonas

En los últimos cuarenta años, la evaluación de la función endocrina ha presentado un avance extraordinario. La introducción del radioinmunoensayo y técnicas relacionadas (Enzima inmunoanálisis, Quimioluminiscencia y Electroquimioluminiscencia) han permitido medios altamente específicos y sensitivos para medir hormonas en suero, plasma, leche y otros líquidos corporales. Los inmunoensayos han ayudado a aumentar el conocimiento de eventos endocrinos y metabólicos que ocurren durante el estrés, enfermedades, ciclos reproductivos, crecimiento y desarrollo (Matamoros *et al.*, 2002).

1.3.2 Principios del Inmunoanálisis

Los inmunoanálisis, en general, consisten de una reacción inmunológica en la que un anticuerpo específico (Ac) se une a un antígeno (la hormona, Ag) y un antígeno marcado (Ag*) El Ag, que está en un volumen específico de las soluciones estándar en un grupo de tubos en duplicado o en tubos donde se encuentra la muestra desconocida (también en duplicado) es químicamente idéntica o similar al Ag*, que se encuentra en una cantidad fija. Después de incubar las soluciones, se separa la hormona unida al anticuerpo (tanto la marcada como la no marcada) de la fracción libre y se cuantifica la evidencia del marcaje (por ejemplo, radioactividad, reacción colorimétrica, etc.) en una de las fracciones (usualmente la fracción unida al anticuerpo). En las soluciones estándar y las muestras desconocidas la hormona no marcada compite con la hormona marcada por un número limitado de sitios de unión al anticuerpo. Debido a que las cantidades de Ac y Ag* son mantenidas en un inmunoanálisis, la inhibición de la unión Ag* al Ac está relacionada a la concentración del Ag en las soluciones estándar y las muestras. Por lo tanto, la cantidad de hormona marcada (Ag*), unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la cantidad de hormona presente en las soluciones estándar y muestras desconocidas (Ag). Este proceso se puede ver como una simple competencia, es decir, a medida que la concentración de Ag aumenta en las soluciones estándar o las muestras, el porcentaje de Ag* que se une al Ac disminuye. Entonces se genera una curva de inhibición de las soluciones estándar y así se determina la concentración de la hormona en la muestra desconocida (Matamoros *et al.*, 2002).

1.3.3 Técnicas de Medición de Hormonas.

1.3.3.1 Enzimoimmunoanálisis (ELISA).

Esta técnica se basa en el principio de que un antígeno puede unirse a una enzima y retener tanto la actividad inmunológica como la enzimática en el conjugado resultante.

Los componentes del ELISA, son (Brown *et al.*, 1999):

- Fase Sólida: son las microplacas de poliestireno.
- Anticuerpo: es la inmunoglobulina producida contra un antígeno específico.
- Anticuerpo marcado (conjugado): es el componente del ensayo que permite detectar la concentración del antígeno.
- Antígeno estándar: usualmente es el mismo antígeno que fue usado para la elaboración del anticuerpo y el mismo al conjugado enzima o es estructuralmente similar para que puede tener reacción cruzada con el primer anticuerpo.
- Substrato: es aquel que reacciona con el conjugado y cambia el color. Consiste de una sustancia buffer, un cromógeno y catalizador.

Típos de ensayos ELISA (Brown *et al.*, 1999):

- ELISA directo: las placas se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados. Indican la presencia de antígeno en la solución analizada. Es necesario incluir controles negativos que serán muestras del mismo tipo de las analizadas pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos (soluciones en las que se encuentra el antígeno buscado o bien se le ha añadido).
- ELISA indirecto: las placas se preparan igual al directo. Los controles positivos y negativos son los mismos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos, uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario.
- ELISA de sándwich: se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno,

herramienta para evaluar procedimientos de reubicación, reintroducción, interacciones agresivas e incluso para identificar poblaciones vulnerables a los impactos humanos, o a condiciones ambientales (Brousset *et al.*, 2005).

Uno de los mayores problemas en la implementación de programas de conservación *in situ* y *ex situ* es la falta de disponibilidad de material biológico el cual es requerido para un mejor entendimiento de los patrones reproductivos así como maximizar la eficiencia reproductiva (Andrabi y Maxwell, 2007).

1.4.1 Monitoreo no Invasivo

Desde hace mucho tiempo está bien establecido que las hormonas esteroides sexuales regulan no sólo el patrón copulatorio del macho y del estro en la hembra sino también otros aspectos de la conducta sexual; por lo que es importante determinar los perfiles hormonales al desarrollar programas de conservación de especies que se encuentren amenazadas o en peligro (Soto *et al.*, 2004).

En cuanto a animales silvestres o de zoológico, existe una necesidad crítica de desarrollar estrategias para evaluar exactamente el estatus endocrino. La determinación del estatus reproductivo es uno de los principales factores para un efectivo manejo, los esfuerzos para usar técnicas de reproducción asistida dependen del conocimiento de la fisiología reproductiva básica de dichas especies (Schwarzenberger *et al.*, 1996).

El monitoreo de metabolitos hormonales fue originalmente desarrollado en zoológicos. Durante los últimos diez años, se han publicado más de 100 reportes en relación a la biología reproductiva de especies silvestres. Inicialmente dichas investigaciones estuvieron enfocadas en el desarrollo de técnicas de sexado de aves monomórficas, detección de gestación y su consecutivo parto y la evaluación del potencial reproductivo. Más recientemente, el refinamiento de métodos han permitido la caracterización de ciclos reproductivos y el monitoreo de terapias de tratamiento y esto ha revelado mecanismos asociados con hormonas, comportamiento y estacionalidad (Lasley y Kirkpatrick, 1991).

Los primeros estudios se llevaron a cabo en la medición de las concentraciones urinarias de dos grupos de metabolitos, conjugados de estrona (gluconatos y sulfatos) y pregnadiol-3-glucoronido para caracterizar los ciclos estrales, estacionalidad reproductiva y potencial reproductivo de diversas especies exóticas (Lasley y Kirkpatrick, 1991).

Uno de los principales problemas que se enfrenta al estudiar procesos endocrinos de la biología reproductiva de mamíferos silvestres, es la obtención de muestras de sangre, que implica serios problemas de manejo de los animales. Además, estos procedimientos pueden intensificar el estrés en los individuos, dando como resultado una alteración en las concentraciones de hormonas esteroides (Soto *et al.*, 2004).

Por todo esto se han desarrollado técnicas no invasivas, es decir, metodologías que no provocan estrés en los individuos para la valoración de indicadores de su fisiología. Entre estas técnicas se encuentra la cuantificación de hormonas esteroides extraídas de heces, la cual ha permitido describir procesos endocrinos durante la reproducción de diversas especies como el lobo mexicano (Soto *et al.*, 2004).

El desarrollo de métodos no invasivos ha permitido llevar a cabo estudios y/o evaluaciones sin provocar cambios no deseados en la fisiología de los animales. Estos métodos de estudio de la reproducción y del estrés, de interés en colecciones de animales en cautiverio, han resultado aplicables a la evaluación de estas variables en poblaciones silvestres de vertebrados. Sin embargo, la obtención de muestras de sangre generalmente va precedida de la captura e inmovilización de los animales, lo que les provoca estrés y una modificación no deseable en las concentraciones de las hormonas relacionadas con la reproducción, y obviamente con el estrés (Valdespino *et al.*, 2007).

Los esteroides una vez que han llegado a su célula blanco y han afectado su fisiología y el comportamiento de un organismo, pierden su capacidad de acción notablemente. Sin embargo el órgano principal de desactivación y catabolismo de los esteroides (al igual que otras hormonas) es el hígado. Los esteroides parentales o metabolizados, libres y/o unidos a proteínas acarreadoras, pasan entonces al intestino emulsificados en los ácidos biliares, lo cual permiten que sean eliminados en la materia fecal. Otras porciones de los esteroides son eliminados en la orina después de ser filtrados en los riñones. Las hormonas esteroides se eliminan como tal o como metabolitos y su tasa de excreción y metabolismo varía de acuerdo con la fisiología de cada especie. Es justo, esta ruta fisiológica la que permite determinar el funcionamiento gonádico y adrenal de un organismo por métodos no invasivos. En la actualidad, existen suficientes datos de numerosas especies, en apoyo de la posibilidad de generalizar que los perfiles hormonales obtenidos evaluando esteroides fecales, reflejan la actividad gonádica y adrenal reflejando el estado endocrino de un individuo (Valdespino *et al.*, 2007).

El beneficio mayor de utilizar excretas para hacer seguimientos de perfiles hormonales es que el procedimiento de colecta puede extenderse por periodos largos sin necesidad de manipular a los animales. Otra ventaja, es que la concentración de metabolitos, es en general de 2 a 4 veces mayor que la de los esteroides sexuales parenterales en

que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran sensibilidad y especificidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.

- ELISA competitivo: se utiliza un anticuerpo específico unido a la fase sólida y el conjugado está compuesto de antígeno unido covalentemente a la enzima. Se ponen a reaccionar una cantidad fija de antígeno conjugado con enzima y cantidades variables de antígeno libre. El antígeno libre inhibirá la unión del antígeno conjugado, haciendo que la actividad enzimática unida a la fase sólida del ensayo, sea menor cuanto mayor sea la concentración del antígeno libre en el medio de la reacción.

1.4 Técnicas de Reproducción en Fauna Silvestre

La extinción de especies de mamíferos es parte de un proceso natural de evolución y es irreversible, pero actualmente está ocurriendo a una tasa mucho mayor a la esperada debido a las actividades humanas como destrucción del hábitat, sobrecacería o competencia con especies introducidas. La meta de la conservación animal es el mantener la biodiversidad ya que el remover una sola especie puede afectar el funcionamiento global del ecosistema. Los programas de conservación *in situ* y *ex situ* para especies en peligro de extinción se pueden beneficiar por las modernas biotecnologías o técnicas de reproducción asistida que incluyen la inseminación artificial, transferencia de embriones, fertilización *in vitro*, micromanipulación de gametos/embriones, sexado de semen/embriones y bancos de recursos genómicos. Se cree que las modernas biotecnologías permitirán obtener una mayor cantidad de descendencia de individuos seleccionados para asegurar la diversidad y tal vez reducir el intervalo entre generaciones (Andrabi y Maxwell, 2007).

La medición del impacto negativo que pueden tener diferentes factores sobre la homeostasis animal tiene amplia aplicación en la biología de la conservación, manejo de fauna silvestre, ecología conductual, bienestar animal y biomedicina. En animales mantenidos en cautiverio se ha utilizado para evaluar procedimientos veterinarios y manejos anestésicos, el impacto de diferentes tipos de instalaciones e incluso técnicas de reproducción asistida; con la ventaja de que obtener muestras de orina o heces puede ser relativamente sencillo. En animales de vida libre se ha propuesto como

sangre. Por otro lado, la secreción de hormonas por parte de las glándulas es generalmente de naturaleza pulsátil, con lo cual, a lo largo del día, muestras de sangre reportarán variación en la concentración; sin embargo, las cantidades en excretas corresponden a la producción acumulada a través del tiempo con lo cual se elimina esta variación circadiana (Valdespino *et al.*, 2007).

Los métodos usados actualmente para la medición de hormonas esteroidales son relativamente simples y pueden ser fácilmente adaptadas de una especie a otra y proveen datos comparables entre especies cercanamente relacionadas (Lasley y Kirkpatrick, 1991).

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a la situación de riesgo que presenta el zacatuche (*Romerolagus diazi*) y a la poca información que sustente programas de manejo y conservación de la especie acordes con las particularidades en su fisiología reproductiva, es necesario generar conocimiento básico sobre la técnica de cuantificación de testosterona para determinar una probable época reproductiva, lo cual permitirá desarrollar programas que favorezcan la conservación de esta especie endémica mexicana. Por lo anterior, es importante desarrollar estrategias que permitan conocer los niveles de testosterona y la influencia de ésta sobre una posible estacionalidad reproductiva de la especie.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Valorar la concentración de testosterona en heces del Zacatuche (*Romerolagus diazi*) en cautiverio durante dos periodos: Otoño – Invierno y Primavera – Verano.

3.2 Objetivos Especificos

Determinar la concentración de testosterona en heces en el Zacatuche (*Romerolagus diazi*) durante el periodo Otoño – Invierno.

Determinar la concentración de testosterona en heces en el Zacatuche (*Romerolagus diazi*) durante el periodo Primavera – Verano.

Establecer si existen diferencias significativas en la concentración de testosterona en heces entre los dos periodos.

3.3 Objetivo Secundario

Registrar el número de crías nacidas en la colonia de zacatuche durante todo el periodo de estudio.

4. HIPÓTESIS

El macho de zacatuche presenta niveles de testosterona constantes a lo largo del año, luego entonces, no presenta una etapa reproductiva definida.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Animales

Se emplearon 11 machos de zacatuche pertenecientes a la colección del Zoológico de Chapultepec "Alfonso L. Herrera" (Cuadro 1), que se mantuvieron en jaulas individuales metálicas (baterías) con dimensiones de 60 x 43 x 40 cm. En el interior cuentan con un resguardo metálico de 25 x 40 x 15 cm, además se les proporciona un comedero y bebedero de torre empotrados en la puerta de malla metálica.

Cuadro 1: Identificación de los machos en donde se midieron los niveles de testosterona.

Individuo	Sexo	Identificación	Fecha de Nacimiento
1	M	AVID 021*286*046	Visto 25/08/03, Nac. Ap. 04/03
2	M	AVID 015*876*628	Visto 22/08/05, Nac. Ap. 02/05
3	M		
4	M	AVID 067*842*526	Visto 03/08/07, Nac. Ap. 12/06
5	M	AVID 021*295*332	Visto 21/03/07, Nac. Ap. 10/06
6	M	AVID 068*818*297	Visto 01/04/08, Nac. Ap. 01/08
7	M	AVID 021*055*330	Visto 18/01/06, Nac. Ap. 10/05
8	M	AVID 016*317*781	Visto 22/08/05, Nac. Ap. 05/05
9	M	AVID 067*848*380	Visto 01/04/08, Nac. Ap. 05/07
10	M	AVID 020*811*366	Visto 18/01/06, Nac. Ap. 10/05
11	M	AVID 016*319*269	Visto 22/08/05, Nac. Ap. 04/05

M= macho, AVID= marca comercial de los microchips con los que se identifican a los ejemplares. Nac. Ap.= nacimiento aparente.

5.2 Procesamiento de las muestras

5.2.1 Muestreo

El muestreo se realizó durante dos periodos: el primero de octubre de 2009 a febrero de 2010 (Otoño - Invierno) y el segundo, de marzo a julio de 2010 (Primavera - Verano), cada periodo tuvo una duración de 17 semanas.

Se recolectaron muestras de heces de los zacatuches machos alojados en baterías individuales en bolsas de plástico.

De cada macho, se tomaron 3 muestras durante la semana y para su cuantificación se hizo de manera conjunta; es decir, las tres muestras por semana de cada individuo se juntaron previo a la cuantificación para la obtención de un promedio semanal de la concentración de la hormona por individuo.

Las muestras fueron identificadas y se almacenaron en el Laboratorio de Reproducción de la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre (DGZVS) en congelación a -20 °C, para su posterior análisis.

5.2.2 Secado de las muestras

Las muestras se descongelaron minutos antes y se desecaron en un horno a 60°C por 3 a 4 horas, hasta que el peso era constante.

5.2.3 Extracción total de esteroides

Se pesaron 0.3 g de heces en base seca y se les agregaron 6 ml de solución etanólica al 80 %, se agitaron por 10 seg en vortex y después se dejaron en agitación constante por 12 horas en un agitador de tubos para hematología. Posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos para obtener el sobrenadante el cual se colocó en viales de polipropileno de 1.5 ml y se mantuvieron en congelación a -20°C hasta su evaluación.

5.2.4 Cuantificación de esteroides

La cuantificación de esteroides se realizó por el método de ELISA utilizando *kits active DSL* para testosterona; siguiendo las instrucciones del fabricante. Los extractos se diluyeron 1:10 y sin diluir con agua destilada para su análisis. La cuantificación se realizó por medio de un fotolorímetro *Biotec LX 800* utilizando una longitud de onda de 450 nm y mediante el programa *Ridawin* (Roa, *et al.* 1997; Palme *et al.*, 2005; Touma y Palme, 2005).

5.3 Registro de nacimientos

Se realizó el conteo de las crías nacidas durante cada mes, desde septiembre 2009 a julio 2010 en la colonia de zacatuches del Zoológico de Chapultepec.

5.4 Análisis Estadístico

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza mediante un modelo anidado con covariable. Los datos fueron transformados a logaritmo base 10 por no presentar una distribución normal.

Se utilizaron procedimientos de ANOVA y una prueba de F para detectar significancia a un nivel de $P < 0.05$. El modelo usado fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + P_j + S_k(P_j) + \epsilon_{ijkl}$$

Donde Y_{ijkl} es la variable de respuesta; μ es la media general; A_i es el efecto aleatorio del animal; P_j es el efecto fijo del periodo; $S_k(P_j)$ es el efecto de la semana como covariable dentro del periodo y ϵ_{ijkl} es el error aleatorio de estos. Para ello se utilizó el programa JMP, Versión 8 (2008).

6. RESULTADOS

La concentración promedio de testosterona en heces de zacatuche durante el periodo de evaluación fue de 111.01 +/- 27.31 ng/g de heces secas (Fig. 1).

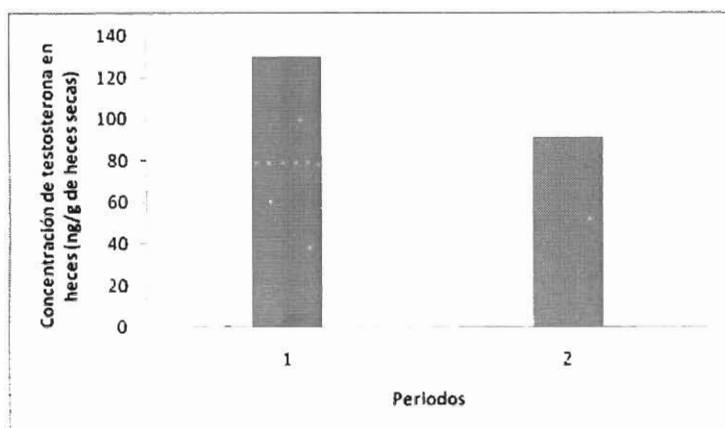


Figura 1: Concentración de testosterona en heces de Zacatuche en los periodos de Otoño-Invierno (1) y Primavera-Verano (2).

Para el periodo de otoño – invierno (octubre a febrero), se obtuvo una media de 130.32 ± 59.47 ng/g de heces secas con valores entre los 20.4 y 1030.2 ng/g de heces. En el Cuadro 2, se muestran los resultados obtenidos para dicho periodo.

Cuadro 2: Concentraciones de testosterona por semana y por individuo para el periodo Otoño – Invierno.

S	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	104.8	148.8	66.6	76	50.2	133.4	78.4	108.4	80.8	63.2	154.4
2	311	25.4	275.2	346.6	38.4	40.8	30	69.6	77.2	78.4	94.4
3	237.6	148.8	519.2	113.4	22.6	73.6	39.2	95	60.6	120	111
4	195.2	137.8	113.4	112	27	128.8	43.4	39.2		120	36.2
5	128.8	224.2	224.2	35	66.6	70.8	104.8	46.8	162.6	28	86.8

6	666.4	156.2	102.6	83.2	534.6	60.6	26.8	34.8	61.2	45.6	196.2
7	646.6	83.4	72	182	133.6	53.4		23.8	104	148.8	114.6
8	295	108.4	65.2	113.4	135.2	80.8	21.2	23.2	88.4	75.8	86.8
9	162.4	44	211.4	86.2	28.4	61.2	23	100.8	59.4	107.4	165
10	157.4	21	23.8	38.4	23.8	22.4	20.4	44.2	29.2	31.2	97.4
11	542.8	39.2	22.6	46	46	25.2	24.4	36	55.2	45.6	25.4
12	40.8	205.2	25.2	125.2	77.4	37	138.2	20.6	108.4	71.4	35
13	86.2	86.2	51.2	72	106.2	154.4	79.8	57.8	116	40.4	162.6
14	95	138.6	219.4	30	80.8	89	180.2	78.2	80.8	118.6	97.8
15	101	230.2	253	247.2	80.8	58.8	318.2	189.4	104	1030.2	107.2
16	80.8	573.6	138.6	89	194.2	78.2	792	189.4	253	48	348
17	56.4	184.8	83.4	30	175.6	363.8	573.6	265.2	325.4	107.2	113.8

I= Individuo, S= Semana

En la Figura 2 se muestra las variaciones en la concentración de testosterona para el periodo Otoño – Invierno.

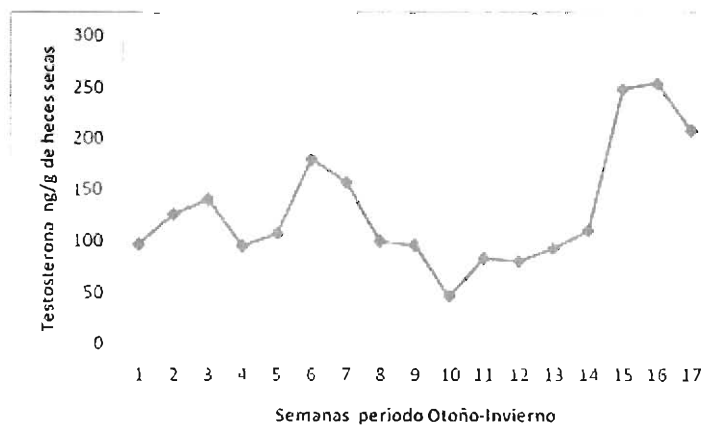


Figura 2: Concentración de testosterona en heces durante el periodo Otoño – Invierno.

Durante dicho periodo, se observa un incremento en la concentración de testosterona en las semanas 15 y 16, que corresponden al final del invierno.

Para el periodo de Primavera – Verano (marzo a julio), se obtuvo una media de 91.69 ± 58.0 ng/g de heces secas con valores entre los 2.10 y 416.2 ng/g de heces. En el Cuadro 3, se muestran los resultados obtenidos para dicho periodo.

Cuadro 3: Concentraciones de testosterona por semana y por individuo para el periodo Primavera – Verano.

I S	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	49	40.2	69.8	163.4	45	59.6	80.6	147.8	48.4	74.4	31.6
2	58.6	41.8	77	51.2	38.8	86.2	30.4	26.6	124	55.6	115.2
3	53.6	54.8	52	97.2	53.4	33	63.6	144.2	209	117.2	37.2
4	193.6	59.6	99.6	43.8	71.8	7.64	15.52	16.84	8.64	3.5	5.6
5	76.4	163.2	243.4	163.2	137.4	90.4	86.6	28.6	3.78	96.2	27.8
6	315	57.6	200.6	10.66	10.48	4.34	5.6	13.8	2.76	49.8	18.84
7	5.94	12.56	124.4	24.2	25	80	11.2	17.52	18.24	39.4	54.4
8	10.48	41.8	75.8	32.6	25	13.7	11.5	80	37	26.6	23.8
9	17.52	15.52	39.4	44.4	186.2	18.24	112.4	31.6	12.56	12.16	71.8
10	41.8	34.8	416.2	20.2	14.9	68	35.8	38.2	118.2	22.2	
11	357.6	118	327	76.4	365.8	155.4	216.8	216.8	109.2	279.2	98.2
12	151.6	334.4	68	365.8	342	305.6	46.6	202.2	327	254.8	312.6
13	2.1	21.8	7.02	15.56	37.8	98.2	193	130.6	53.2	36.4	155.4
14	149.6	110	71.4	128	128	76.6	91.6	123.2	123.2	102.2	118.6
15	143.8	138.2	114.2	138.2	176	118.6	208.8	106	95	114.2	118.6
16	79.4	128	133	95	128	51.17	58.61	47.99	60.49	38.73	168.72
17	57.72	68.86	29	40.84	55.99	52.7	46.26	111.52	58.61	61.44	83.38

I= Individuo, S= Semana

En la Figura 3 se muestra las variaciones en la concentración de testosterona para el periodo Primavera – Verano.

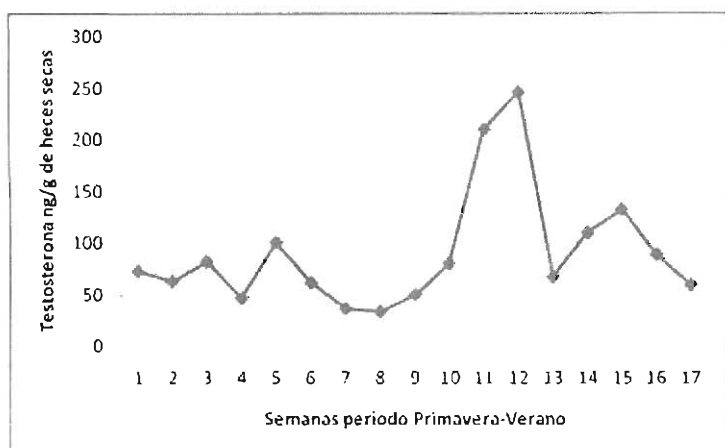


Figura 3: Concentración de testosterona en heces durante el periodo Primavera - Verano.

Así mismo, en este periodo se observó un incremento en la concentración de testosterona en las semanas 11 y 12; correspondientes con el inicio del verano.

Se registró el número de crías nacidas por mes durante el periodo de estudio, ocurriendo nacimientos durante todos los meses. Cabe hacer mención, que las crías son producto del apareamiento de machos diferentes a los del estudio hormonal del presente trabajo.

Cuadro 4: Número de crías registradas por mes durante el periodo de estudio.

Sept. 2009	Oct. 2009	Nov. 2009	Dic. 2009	Ene. 2010	Feb. 2010	Mar. 2010	Abr. 2010	Mayo 2010	Jun. 2010	Jul. 2010
24	8	19	24	22	14	20	20	48	10	9

Por otra parte, en el presente estudio en ambos periodos se observa un amplio rango de la concentración de la hormona. Al respecto, Castro *et al.* (2002) mencionan que la concentración de testosterona plasmática y testicular en conejos adultos presentan un amplio rango de variación, esto es similar a lo observado en conejos de la raza Nueva Zelanda por Moor y Younglai (1975), donde de igual manera encontraron variaciones amplias en la concentración de testosterona y lo atribuían a la presencia de factores estresantes; sin embargo no pudieron correlacionarlo. También, Jackson *et al.* (2008) encontraron un amplio rango en la concentración plasmática de testosterona y de dihidrotestosterona en conejos domésticos. Por lo cual, se puede inferir que en lagomorfos como en otras especies es normal encontrar un amplio rango en los valores de la concentración de testosterona. Razón por la cual, los resultados encontrados en este estudio; corresponden con lo observado con anterioridad en otras especies de lagomorfos.

En diversos estudios realizados en conejos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) se han hecho mediciones de testosterona en sangre donde se han registrado concentraciones de dicha hormona en plasma, desde 3.76 ng/ml (Haltmayer y Eik-Nes, 1969), 0.5 a 10 ng/ml (Moor y Younglai, 1975), 4.97 +/- 0.99 ng/ml (Castro *et al.*, 2002), 2.79 ng/ml en verano (Okab, 2007), 1.0 y 0.5 ng/ml (Jackson *et al.*, 2008); en estos estudios se ha demostrado que la secreción de testosterona está influenciada por varios factores como son el fotoperiodo, estrés calórico y cópulas, por mencionar algunos.

Con relación a la variación tan amplia entre los valores de testosterona fecal con respecto a los encontrados en sangre, se debe considerar que los niveles de testosterona en heces presentan un factor acumulativo, por lo tanto son mayores a los encontrados en sangre en una relación de 2 a 4 veces mayor (Valdespino *et al.*, 2007), incluso 10 veces mayor, esto reportado en borrego cimarrón (Soto, 2006). Por lo cual, se puede inferir que los valores encontrados en heces de zacatuche durante la realización del presente estudio, son congruentes a los reportados en plasma en el conejo doméstico.

8. CONCLUSIONES

Con lo observado en el zacatucho (*Romerolagus diazi*) durante el desarrollo de este estudio; se puede concluir que esta especie puede reproducirse durante todo el año en cautiverio y posiblemente en vida libre también, aunque presenta etapas con mayor actividad sexual.

Los resultados encontrados en este estudio, son los primeros reportados para la especie y constituyen un importante acercamiento al entendimiento de su fisiología reproductiva.

Por otra parte, se comprobó que el uso de metodologías no invasivas como la medición de hormonas esteroidales en heces, es una técnica adecuada para el monitoreo de la actividad reproductiva del zacatucho.

Es necesario el desarrollo de nuevos estudios complementarios, donde se pueda evidenciar el efecto de diversos factores como son la estimulación por hembras, cópulas previas y estrés calórico con los niveles de testosterona tanto séricos como fecales. Así como realizar un estudio comparativo entre los niveles fecales y séricos de testosterona por un periodo mayor y así obtener una visión general del comportamiento reproductivo del macho de zacatucho.

9. REFERENCIAS

- Andrabi S.M.H. y Maxwell W.M.C. 2007. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science*. 99: 223-243.
- Brown, J.L., Graham, L.H., Wielebnowski, N., Swanson, W.F., Wildt, D.E. y Howard, J.G. 2001. Understanding the basis reproductive biology of wild felids by monitoring of faecal steroids. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement. 57: 71-82.
- Brown J., Walker S. y Steinman K. 1999. *Endocrine Manual for Reproductive Assessment of Domestic and Non-domestic Species*. Conservation and Research Center. Smithsonian's National Zoological Park. USA: 1-69.
- Brousset D., Galindo F., Valdez F., Romano M. y Schuneman A. 2005. Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. *Veterinaria México*, 36 (3): 325-337.
- Castro, A.C.S, Berndtson, W.E. y Cardoso, F.M. 2002. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 35: 493-498.
- Cepeda, R., Adaro, L. y Peñailillo, P. 2006. Variaciones morfométricas de la próstata de *Chinchilla laniger* (MOLINA, 1982) y de la concentración de testosterona plasmática durante un ciclo reproductivo anual. *International Journal of Morphology*. 24(1): 89-97.
- Cervantes A. 1992. Doñana, *Acta Vertebrata*, 9: 416-420.
- Cervantes A., González F. 1996. I Los conejos y liebres de México. En: Velázquez A., Romero F., López-Paniagua J. (Comp.) *Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat*. Fondo de Cultura Económica. México: 19-25.
- Cervantes F., Lorenzo C. y Hoffman R. 1990. *Romerolagus diazi*. *Mammalian Species*, 369: 1-7
- Cervantes F. y Martínez J. 1996. II Historia natural del conejo zacatuche o teporingo (*Romerolagus diazi*). En: Velázquez A., Romero F., López-Paniagua J. (Comp.) *Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat*. Fondo de Cultura Económica. México: 29-40.
- Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora [homepage on the Internet]. Ginebra: CITES 2006 [actualizado 2006 Jun 14] Disponible en: <http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>

Dirección General de Zoológicos de la Ciudad de México. 2006. Programa Institucional de Conservación por Especie (PICE). México: 1-19.

Guyton, A., Hall, J.E. 2006. Textbook of Medical Physiology. 11ª ed. Elsevier Saunders. USA: 1003-1008.

Hafez. 1996. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 6ª ed. McGraw Hill Interamericana. México: 169, 383, 402-408.

Haltmayer, G. y Eik-Nes, K. 1969. Plasma levels of testosterone in male rabbits following copulation. *Journal of Reproduction and Fertility*. 19: 273-277.

International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. Red List of Threatened Species [homepage on the internet]. United Kingdom: IUCN c 1995-2006. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/search/details.php/1974/summ>

Jackson, R.H., Lukefahr, S.D., Stanko, R.L. y Flores, D.O. 2008. Testosterone and dihydrotestosterone production in genetically furless and furred male rabbits and effects on growth. 9th World Rabbit Congress. Italia: 137-141.

Knobil E. y Neil J. 1994. The Physiology of Reproduction. Vol. I, 2ª ed. Raven Press. USA: 1335-1357.

Lasley, B. L. y Kirkpatrick, J.F. 1991. Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 22(1): 23-31

López-Paniagua, J., Romero, F. y Velázquez, A. 1996. IX Las actividades humanas y su impacto en el hábitat del conejo zacatuche. En: Velázquez A., Romero F., López-Paniagua J. (Comp.) *Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat*. Fondo de Cultura Económica. México: 119-132.

Marai, I.F.M., Zaiden, A.E.B., Abdel-Samee, A.M., Abizaid, A. y Fadiel, A. 2009. Camel's reproductive and physiological traits as affected by environmental conditions. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 10: 129-149.

Matamoros R., Gómez C. y Andaur M. 2002. Hormonas de utilidad diagnóstica en medicina veterinaria. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 34(2): 167-182.

Matsuzaki T., Kamiya M., Suzuki H., Nomura T y Velázquez A. 1996. IV Reproducción en el laboratorio del conejo zacatuche. En: Velázquez A., Romero F., López-Paniagua J. (Comp.) *Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat*. Fondo de Cultura Económica. México: 51-66.

Moor, B.C. y Younglai, E.V. 1975. Variations in peripheral levels of LH and testosterone in adult male rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility*. 42: 259-266.

Nalbandov A.V. 1976. Reproductive Physiology of Mammals and Birds. 3^a ed. W. H. Freeman and Company. USA: 225-233.

Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección Ambiental-Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio-Lista de especies en Riesgo. Marzo, 6, 2002.

Norman, A.W. y Litwack, G. 1997. Hormones. 2^a ed. Academic Press. USA: 49-86.

Okab, A.B. 2007. Semen characteristics and plasma testosterone of New-Zealand male rabbits as affected by environmental temperatures. Slovak Journal Animal Science. 40: 161-167.

Payne, A.H. y Hales, D.B. 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. Endocrine Reviews. 25(6): 947-970.

Roa N, Linares T, Morella R, y Tamasaukas R. 1997. Comparación de la técnica de ELISA vs RIA en la determinación de progesterone plasmática en bovinos. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. 5 (Supl.1): 412-414.

Rodríguez-De Lara, R., Fallas-López, M., Rangel-Santos, R., Mariscal-Aguayo, V., Martínez-Hernández, P.A. y García-Muñiz, J.G. 2008. Influence of Doe Exposure and Season on Reaction Time and Semen Quality of Male Rabbits. 9th World Rabbit Congress. Italia: 443-447.

Romero F. y Velázquez A. 1994. El conejo zacatuche. Tan lejos de Dios y tan cerca de la Ciudad de México. Instituto Nacional de Ecología. Consejo Nacional de la Fauna. México: 7-24.

Ruckebush Y, Phaneulf L.P. y Dunlop R. 1994. Fisiología de Pequeñas y Grandes Especies. Manual Moderno. México: 689-697.

Salame-Méndez, A., Castro-Campillo, A., Salgado-Ugalde, I., Mandieta-Márquez, E. Herrera-Muñoz, J. y Ramírez-Pulido, J. 2004. Evaluación estacional de la producción de esteroides sexuales en testículos del ratón de orejas oscuras (*Peromyscus melanoti*, ALLEN y CHAPMAN, 1897), de diferentes clases de edad. Acta Zoológica Mexicana. 20(2): 103-114.

Santiago, J., Colome, M.A., Toledano, A., Gómez, A., Pulido, A. y López, A. 2010. Métodos de estudio de la actividad reproductiva de ungulados de interés cinegética. En: Santiago, J. y López, A. (Coord.) Ungulados Silvestres de España: Biología y Tecnologías Reproductivas para su Conservación y Aprovechamiento Cinegético. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Agroalimentaria. España: 41-62.

Soto-Gamboa, M. 2005. Free and total testosterone levels in field males of *Octodon degus* (Rodentia, Octodontidae): accuracy of the hormonal regulation of behavior. *Revista Chilena de Historia Natural*. 78: 229-238.

Soto, S. 2006. Monitoreo no invasivo de las etapas reproductivas en borregas cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*) en cautiverio mediante la observación conductual reproductiva y la cuantificación de esteroides fecales. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Soto M., Salame A., Ramírez J., Yañez L. y Armella M.A. 2004. Valoración de hormonas esteroides en heces de una pareja de lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) en cautiverio. *Acta Zoológica Mexicana*. 20 (002): 187-196.

Schwarzenberg, F. Möstl, E., Palme, R. y Bamberg, E. 1996. Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive status in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science*. 42: 515-526.

Touma C. y Palme R. 2005. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. *Annals of New York Academic of Science*. 1041: 54-75.

Trigg, T.E., Doyle, A.G., Walsh, J.D. y Swangchon-uthai, T. 2006. A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in cortisol of reproduction. *Theriogenology*. 66: 1507-1512.

Valdespino C., Martínez R., García L.M. y Martínez L. E. 2007. Evaluación de eventos reproductivos y estrés fisiológico en vertebrados silvestres a partir de sus excretas: Evolución de una metodología no invasiva. *Acta Zoológica Mexicana*. 23(3): 151-180.

Velázquez A., Romero F y León L. 1996. VI Fragmentación del hábitat del conejo zacatucho. En: Velázquez A., Romero F., López-Paniagua J. (Comp.) *Ecología y conservación del conejo zacatucho y su hábitat*. Fondo de Cultura Económica. México: 73- 86.